



**CLAUDIA CONTI MEDUGNO**

**Fases de membranas fluidas - L<sub>3</sub> a partir de lipídio sintético e pentanol na região diluída – e o respectivo dialisado.**

**CAMPINAS**

**2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**CLAUDIA CONTI MEDUGNO**

**Fases de membranas fluidas - L<sub>3</sub> a partir de lipídio sintético e pentanol na região diluída – e o respectivo dialisado.**

**Orientador/Supervisor: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora.**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida do aluna Claudia Conti Medugno e orientata pelo Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "E. Tambourgi", is positioned above the name of the supervisor.

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi - Orientador

Campinas – São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M469f

Medugno, Claudia Conti

Fases de membranas fluidas- L3 a partir de lipídio sintético e pentanol na região diluída e o respectivo dializado / Cláudia Conti Medugno. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Membranas (Tecnologia). 2. Membranas líquidas.  
3. Físico - Química. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Phases membrane fluid-L3 from synthetic lipid and pentanol and diluted in the region corresponding dialyzed

Palavras-chave em Inglês: Membranes (Technology), Liquid membranes, Physical-chemistry

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Iracema de Oliveira Moraes, Patricia Bernardi Leite da Silva, Ana Paula Brescancini Rabelo, Edgar Silveira Campos

Data da defesa: 31-07-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

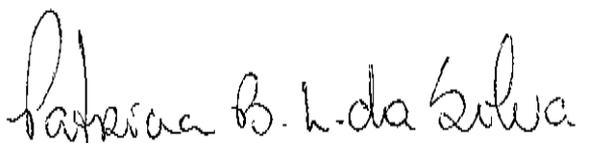
Tese de Doutorado defendida por Claudia Conti Medugno ,em 31 de julho de 2012 ,  
e aprovada pela banca examinadora composta pelos doutores:



Elias Basile Tambourgi



Iracema de Oliveira Moraes



Patricia Bernardi Leite da Silva



Ana Paula Brescancini Rabelo



Edgar Silveira Campos

Para minha avó, Maria D'Assumpção Braz Berruto.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Elias Basile Tambourgi, por acreditar e tornar possível este trabalho;  
Às Dras. Helloise de Oliveira Pastore e Érica Oliveira, pela colaboração;  
À Deise Maria Fontana Capalbo, amiga de todas as horas;  
Ao Ricardo Antônio Almeida Pazianotto, e as discussões sobre geometria diferencial;  
À Rosângela Mauri Quintino, por nossos resultados improváveis;  
Ao Diego de Souza Verri, pela arte gráfica;  
A todos que, de uma forma ou outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A fase  $L_3$  (esponja) foi observada no final dos anos 80 e representa uma nova classe de auto moldagem para sistemas surfactantes em água. Esse trabalho descreve a descoberta e a posterior caracterização de uma fase ternária composta do lipídio sintético catiônico brometo de dioctadecildimetil amônio (DODAB), pentanol e água, em uma região diluída. Esta é a primeira descrição de uma fase  $L_3$  preparada com um lipídio com uma cabeça polar relativamente pequena e duas cadeias de hidrocarboneto com 18 carbonos cada. A região no diagrama triangular pentanol/água/DODAB na qual a fase existe foi caracterizada utilizando as técnicas de isotropia óptica e anisotropia em relação a uma sonda de espectroscopia de ressonância paramagnética do elétron. A proposta de uma fase  $L_3$  foi feita por comparação com um sistema similar relatado pelo grupo de Montpellier. A descrição aceita é que, em uma relação estreita de concentração surfactante e co-surfactante, ocorre fusão de membrana com a formação de uma rede de bicamadas altamente interligadas e distribuídas aleatoriamente no espaço. A hipótese de formação da fase  $L_3$  é que o grupo hidroxila do pentanol se pareie com as cabeças de lipídios e esse fato é capaz de alterar a curvatura das bicamadas. As várias preparações de DODAB e pentanol mantiveram-se inalteradas durante pelo menos cinco anos apenas até 3 mM, a concentração máxima que pode ser chamada de  $L_3$ , que é termodinamicamente estável. Para tornar o sistema mais atraente para muitos usos potenciais, é necessário aumentar a concentração do lipídio. Concentrações até 10 mM decompõem-se após algumas horas em pequenas gotas e cristais, a chamada multifase. O passo seguinte foi remover completamente o álcool por diálise contínua. O resultado foi o aparecimento de uma fase semelhante à água, que não pode ser obtida de outro modo. Uma sequência de medidas espectroscópicas e cromatográficas demonstrou que o álcool foi eliminado totalmente por diálise e o lipídio permanece retido. Há uma notável diferença com outros sistemas binários água/DODAB. Na mesma concentração, todos têm acentuada turbidez. A hipótese é que a presença de álcool na bicamada promove uma reorganização capaz de transformar um sistema particulado em bicontínuo. Está agora bem aceito que a força motriz dessas transformações são as mudanças de curvatura na bicamada. Os esforços para caracterizar esses sistemas são justificados, uma vez que são fáceis de preparar e têm utilizações potenciais como a síntese de compostos com poros mesoestruturados, transporte de drogas e cristalização de proteínas.

## ABSTRACT

The amphiphilic  $L_3$  (sponge) phase was observed in the late 80's and represents a new class of self-assembly for surfactant-water systems. This work describes the discovery and subsequent characterization of a ternary phase composed of synthetic cationic lipid dioctadecildimethyl ammonium bromide (DODAB), pentanol and water in a diluted region. This is the first description of a  $L_3$  phase prepared from a lipid with a relatively small polar head and two hydrocarbon chains with 18 carbons each one. The region of the triangle diagram in which there is  $L_3$  phase was characterized using optical isotropy and anisotropy to a probe with electron paramagnetic resonance spectroscopy technique. The proposal of an  $L_3$  phase was made by comparison with a similar system reported by the group of Montpellier. The description accepted is that in a narrow close ratio of surfactant/cosolvent concentrations, membrane fusion occurs with the formation of a highly interconnected and randomly distributed network of bilayers in space. The assumption of formation of the  $L_3$  phase is that the hydroxyl group of pentanol pairs with the lipid heads and this fact is able to change the bilayer curvature. The various DODAB/pentanol preparations remained unchanged and stable for five years only up to the concentration of 3 mM of lipid, the maximum concentration that can be called  $L_3$  phase, which is thermodynamically stable. To make the system more attractive for many potential uses it was necessary to increase the weight of the lipid. Concentrations up to 10 millimolar, after a few hours, break down into tiny droplets and small crystals, so-called multiphase. The next step was to completely remove the alcohol by continuous dialysis. The result was the appearance of a phase similar to water, which cannot be obtained otherwise. A sequence of spectroscopic and chromatography measurements showed that the alcohol was entirely eliminated by dialysis as the lipid was retained. There is a notable change when compared with other DODAB/water binary preparations. In the same concentration, all of them have pronounced turbidity. The hypothesis is that the presence of alcohol in the bilayer promotes reorganization, transforming a particulate into a bicontinuum system. Efforts to characterize these systems are justified because they are easy to prepare and have potential uses in the synthesis of inorganic solid new materials with nanostructured pores, and as drug carriers and vehicles for the crystallization of proteins.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Brometo de dioctadecildimetilamônio .....	2
2.2 Vesículas de “água quente” (VAQs).....	3
2.3 Transição de fase $T_m$ .....	5
2.4 Fase L <sub>3</sub> (esponja).....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
3.1 Double-Chain Cationic Surfactant and n-Pentanol: An L <sub>3</sub> Phase in the Rich- Water Domain?	
3.2 Supramolecular Assembling of Cationic Synthetic Lipid In A Diluted Region	
4. CONCLUSÕES.....	13
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	14
5.1 - Moldes surfactantes para a deposição de silicatos e aluminosilicatos.....	14
5.2 - Fase L <sub>3</sub> e o transporte de anfotericina B.....	15
5.3 - Investigação de isotropia para outros alcoóis.....	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1: Lipídio catiônico sintético brometo de dioctadecil dimetilamônio (DODAB).....	2
Figura 2.2.1: Micrografia eletrônica de transmissão (Cryo TEM) de uma dispersão de 1,0 mM de DODAB preparada pela adição do lipídio em água a 55 °C (VAQs). Barra = 200 nm (FEITOSA et al., 2006) .....	4
Figura 2.3.1: Desenho representativo de bicamadas no estado gel, cadeias paralelas (congeladas) e no estado líquido cristal, cadeias enrodilhadas (fundidas).....	5
Figura 2.4.1: a) duas bicamadas próximas na fase $L_{\alpha}$ ; b) a formação de uma “passagem” elementar; c) um desenho esquemático da estrutura $L_3$ (PORTE, 1992).....	9
Figura 2.4.2: Cantos e costuras - típicos defeitos que não são permitidos para uma fase esponja (ROUX et al., 1992).....	10
Figura 2.4.3: corte bidimensional de uma organização longo alcance para superfícies embebidas em 3D: a) fase lamelar na qual as membranas são empacotadas em uma fase uni-dimensional de longo alcance ( $L_{\alpha}$ ); b) fase líquida de dispersão de vesículas esféricas; c) fase líquida de bicamadas conectadas ao acaso ( $L_3$ ) (ROUX et al., 1992).....	10
Figura 5.1.1: Isoterma de adsorção física de nitrogênio na amostra silícica $L_3$ .....	15
Figura 5.2.2: Estrutura molecular da Anfotericina B.....	16
Figura 5.2.2: Espectros na faixa de absorção de UV, os perfis de anfotericina B (30 $\mu$ l) em água, controle (A); anfotericina B em pentanol, (B); no seu melhor solvente (dimetil sulfóxido:metanol, para 20 $\mu$ l (C) e 40 $\mu$ l (D); e na fase $L_3$ , nas adições sucessivas de 20 $\mu$ l, 40 $\mu$ l, 60 $\mu$ l e 80 $\mu$ l de anfotericina B (E).....	16
Figura 6.3.1: À esquerda está apresentado o gráfico do número de carbonos versus o volume necessário para a obtenção de isotropia óptica; à direita, os dados em escala logarítmica [DODAB] = 3 mM.....	18

## TABELAS

Tabela 5.1. 1: Parâmetros da análise textural da amostra silícica L<sub>3</sub>.....15

Tabela 5.3.1: Relação entre o volume ( $\mu\text{l}$ ) necessário para a obtenção de uma fase com isotropia óptica e o número de átomos de carbono de cada álcool.....17

# 1. INTRODUÇÃO

Em uma longa história de pesquisa com surfactantes, só no final da década de 80 a fase  $L_3$  (esponja) foi descoberta como uma nova forma de auto moldagem. Nos círculos acadêmicos as primeiras observações confundiram de tal forma os pesquisadores que ela foi chamada de fase anômala. Sua descrição tardia pode ser creditada ao fato que a fase aparece em uma região muito fina dos diagramas, no canto água.

Trata-se de uma fase diluída de cristais líquidos, na qual as moléculas estão frouxamente empacotadas, e as transformações morfológicas são difíceis de medir sem ambiguidade. O fato intrigante dessas membranas fluidas que perambulam em meio a tanta água é a persistência da ordem de longo alcance quando comparada com o alcance de interações moleculares diretas (forças fracas).

Segundo Wennerström, (1997), a fase esponja é a preferida em relação aos seus concorrentes em uma região estreita do diagrama onde ela preenche melhor a restrição energética de curvatura gaussiana negativa. Agora é bem aceito que alterações na curvatura e a obtenção de fases  $L_3$  podem ser conseguidas a partir de sistemas que variam de binários até cinco componentes, alterando-se parâmetros como temperatura, força iônica e presença de co-solventes.

A presente tese trata da descoberta e caracterização de uma nova fase  $L_3$  preparada com lipídio sintético e pentanol, a primeira a ser descrita com moléculas de cadeia dupla.

O conceito de topologia é importante para este trabalho: as estruturas se sucedem a partir de grandes vesículas ocas do lipídio, que se fundem por ação do co-solvente (pentanol) passando de unidades particuladas para uma em rede bicontínua surfactante/cosurfactante. Grandes mudanças morfológicas ocorrem, mas a bicamada é sempre preservada.



Quando introduzidas em um meio aquoso, as moléculas de DODAB se agregam espontaneamente em duas camadas monomoleculares, mantidas juntas por forças fracas não covalentes, principalmente devido ao efeito hidrofóbico.

É esperado que algumas das propriedades singulares dessa molécula possam ser úteis para elucidar mecanismos de organização de bicamadas. Lipídios sintéticos positivamente carregados são usadas para testar modelos teóricos de estabilidade coloidal, condensar moléculas de DNA e estudar a auto moldagem de anfifílicos e sua interação com membranas biológicas de carga oposta (CARMONA-RIBEIRO, 2001).

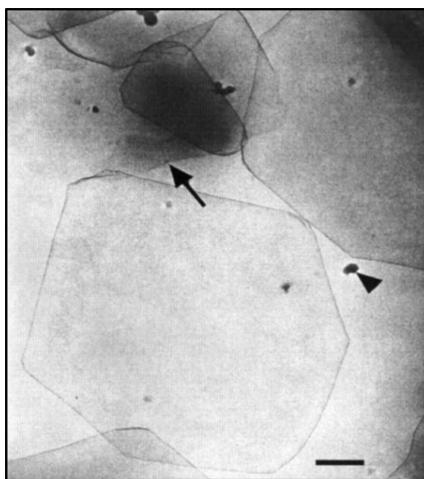
Frequentemente presume-se que as características e comportamento do DODAB possam ser comparáveis às dos fosfolipídios. No entanto, uma cuidadosa avaliação da literatura mostra um quadro diferente e menos ideal. Bicamadas de DODAB são altamente carregadas devido à sua alta densidade de carga superficial. Em contraste, a maioria dos fosfolipídios tem baixa densidade de carga devido à sua natureza não iônica ou zwitteriônica e comparativamente maior tamanho do grupo cabeça. Essas características podem responder por uma rápida reunião de seus fragmentos quando sonicadas, que resulta na formação de vesículas fechadas (PANSU et al., 1990).

## **2.2 Vesículas de “água quente” (VAQs)**

Os modelos geométricos têm sido bem sucedidos para explicar a organização de surfactantes em água (PANSU et al., 1990). Dependendo da forma da molécula, mais especificamente, da relação da superfície da cabeça polar com o volume das cadeias hidrocarboneto, haverá a formação de micelas esféricas, micelas cilíndricas ou bicamadas. Israelachvili et al., (1976), definiram um parâmetro geométrico que permite prever a estrutura mais provável a partir das dimensões do anfifílico. Um parâmetro relativamente alto requer uma molécula com um pequeno grupo cabeça e partes hidrofóbicas volumosas. Essa é a situação típica para anfifílicos com cadeia hidrocarboneto dupla (p.ex. fosfolipídios normais e DODAB). Tipicamente, para sistema anfifílico formador de

bicamada, observa-se que, com o aumento da concentração, existe uma progressão estrutural de acordo com a concentração: vesículas unilamelares → vesículas multilamelares → bicamadas planares.

As assim chamadas vesículas de “água quente” (VAQs) (FEITOSA et al., 2006b) são um exemplo de vesiculação espontânea. A simples adição do lipídio em água, seguida de aquecimento acima da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ), faz com que as moléculas se auto moldem em grandes vesículas unilamelares estáveis e fechadas.



**Figura 2.2.1:** Micrografia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo TEM) de uma dispersão de 1,0 mM de DODAB preparada pela adição do lipídio em água a 55 °C (VAQs). Barra = 200 nm (FEITOSA et al., 2006b)

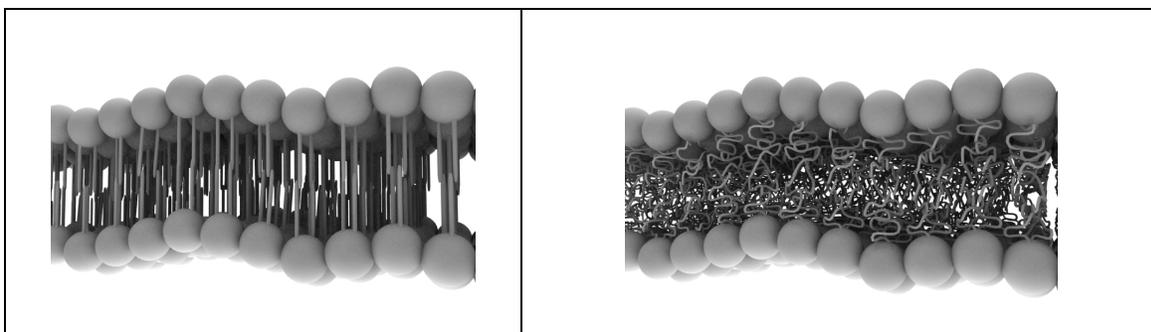
A Figura 2.2.1 mostra micrografias das estruturas VAQs com Cryo-Tem. É possível a observação de ângulos acentuados, que não existem em vesículas de fosfolipídios. Ainda não há uma explicação clara para a angularidade, mas a rigidez das bicamadas no um estado gel, muito empacotado, parece impedir uma curvatura mais suave (LAUGHLIN et al., 1992)

Em resumo, as VAQs são grandes “sacos” encapsulados chamados vesículas ou liposomas, que consistem de uma bicamada lipídica fechada circundando um núcleo aquoso, na região coloidal (< 1% em peso do lipídio).

A formação de fases vesiculares estáveis, sem recorrer a métodos altamente energéticos tais como sonicação e extrusão, é uma importante característica do comportamento de fase desses anfifílicos, na região diluída. Devido à característica de escala de comprimento muito maior que a espessura, as bicamadas podem ser consideradas como superfícies bidimensionais, praticamente planares, embebidas em um espaço 3D. A elasticidade dessas membranas não é determinada por tensão superficial, mas pelo módulo de elasticidade de dobramento, conceito introduzido por Helfrich, (1973). Essa diferença fundamental é a razão para a grande variedade de formatos de vesículas não esféricas, em contraste com as características das formas de equilíbrio esféricas de líquidos simples, que são governados pela tensão superficial. Flutuações de formas por excitação térmica são fortes e lentas o suficiente para serem visíveis pelo microscópio óptico (SEIFERT, 1997).

As VAQs são estruturas altamente dinâmicas para as quais podem existir pronunciadas flutuações, ou seja, com o tempo, elas podem agregar, fundir ou precipitar. Em concentrações mais altas que 10 mM, as vesículas se tornam multilamelares (MLV), formadas por várias camadas concêntricas.

### 2.3 Transição de fase $T_m$



**Figura 2.3.1:** Desenho representativo de bicamadas no estado gel, cadeias paralelas (congeladas) e no estado líquido cristal, cadeias enrodilhadas (fundidas).

Vesículas de um só componente, formadas por lipídios naturais ou surfactantes dupla cadeia, sofrem transição de fase. A temperatura de transição ( $T_m$ ) de fase gel-líquido cristal é uma importante propriedade característica de cada lipídio e pode ser usada como “finger

print” no controle da qualidade de dispersões (FEITOSA et al., 2006a). A  $T_m$  é a temperatura onde as cadeias de hidrocarbonetos altamente ordenadas se fundem em um fluido (Fig. 2.3.1). No estado gel elas se apresentam altamente ordenadas, similares a um sólido, e o movimento molecular está severamente restrito (BRITO; MARQUES, 2005). A fase líquido-cristalina é mais flexível e desordenada, com muitos diferentes arranjos moleculares, como movimentos translacionais e “flip-flop”. A  $T_m$  é uma transição de fase de primeira ordem, com uma *descontinuidade*, isto é, uma mudança acentuada em uma quantidade mensurável, por exemplo, a turbidez. É importante ressaltar que, mesmo na fase líquido cristalina as cadeias estão distantes de apresentar o movimento randômico livre que é encontrado, por exemplo, em parafina fundida ou em moléculas dissolvidas em uma solução orgânica.

Para a maioria dos sistemas conhecidos, a transição ocorre na faixa de temperatura de 10-60 °C, e a mudança da entalpia calorimétrica associada com essa transição é da ordem de 25 a 30 kJ/mol. A análise térmica permite avaliar mudanças na transição de fase e propriedades termodinâmicas relacionadas (“patch number” e calor de transição).

Tendo em vista que a temperatura de transição de fase gel-líquido cristalina  $T_m$  para o DODAB está entre 44.8 e 45.5° C, as vesículas estão no estado gel a temperatura ambiente (NASCIMENTO et al., 1998). Assim, uma vez formadas a temperaturas mais altas, as membranas das vesículas podem permanecer em um estado gel ao serem resfriadas, com as cadeias bem empacotadas.

Diferentes valores para  $T_m$  de DODAB em água são encontrados na literatura (PANSU et al., 1990; BLANDAMER et al., 1992). A  $T_m$  pode ser medida através de métodos como fluorescência, espalhamento de luz, EPR, calorimetria, e os valores dependem do método usado; tipicamente, valores de  $T_m$  para vesículas de DODAB estão entre 35° e 45° C para a pré-transição e a transição principal, respectivamente. Abaixo da  $T_m$ , os surfactantes são fracamente solúveis em água e, dessa forma, não podem (pelo menos espontaneamente) moldar-se como vesículas. Uma vez preparadas na fase líquido cristalina ( $> T_m$ ), as vesículas permanecem estáveis por meses, mesmo quando estocadas na fase gel (abaixo do

$T_m$ ) (FEITOSA; BROWN, 1997; FEITOSA et al., 2000). A estabilidade das vesículas depende também da concentração do surfactante. Por exemplo, até 1,0 mM, as vesículas de DODAB quando preparadas por aquecimento a 60° C permanecem estáveis por meses, mesmo quando estocadas a 5 °C (bem abaixo da  $T_m$ ).

A estrutura das vesículas depende do protocolo de preparação e da quantidade e natureza dos anfífilicos e aditivos. Para anfífilicos sintéticos, os primeiros registros de vesículas sonicadas mostram que essa técnica foi usada com o propósito de produzir vesículas de tamanho bem definido. Os primeiros registros das características físico-químicas foram baseados em vesículas preparadas por sonicação (FEITOSA; BROWN, 1997).

No início dos anos 90 discutiu-se a natureza ideal e fechada das estruturas obtidas por sonicação do homólogo cloreto de DODAB, o cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC). Porém, evidências experimentais foram apresentadas que a sonicação produz também estruturas tipo disco. A ineficiência do método de sonicação para preparar vesículas esféricas/fechadas de DODAB foi adicionalmente confirmado por medidas de Cryo-TEM. Dispersões sonicadas consistem de estruturas mistas em suspensão, enquanto as dispersões não sonicadas contem somente estruturas de vesículas (VAQs). A transição de fase gel/líquido cristal é cooperativa para vesículas não sonicadas (VAQs) e não cooperativa para vesículas pequenas (sonicadas) (BENATTI et al. 2001).

## **2.4 A fase $L_3$ (esponja)**

Moléculas anfífilicas são bem conhecidas por suas propriedades de agregação em água, ou seja, pela capacidade de se auto moldar em uma variedade de estruturas reversíveis com organização espacial. Dependendo da concentração, formam-se micelas esféricas, cilíndricas ou estruturas líquido cristalinas (CHARVOLIN, 1985).

A primeira descrição de cristais líquidos na região diluída foi feita por Benton e Miller (1983), trabalhando com surfactantes aniônicos e álcoois, misturas usadas na indústria do petróleo. Três diferentes fases mostraram-se sucessivamente estáveis com o aumento do

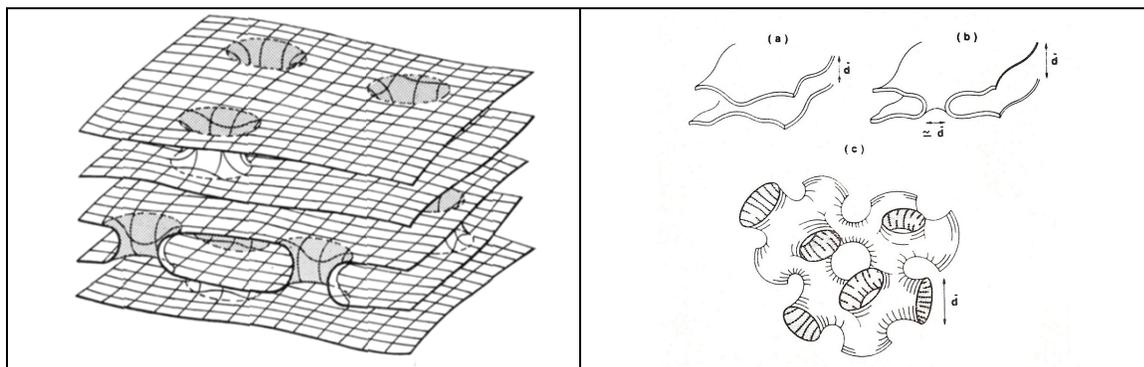
teor relativo do álcool, e a presença de estruturas liotrópicas foi confirmada por turbidez, colocando-se as amostras entre polarizadores cruzados.

A descoberta da fase esponja é creditada ao grupo de Gregoire Porte, sediado em Montpellier (LARCHE et al., 1986; GOMATI et al., 1987; PORTE et al., 1986; PORTE et al., 1988), ao lado da proposição teórica de Cates et al., (1988). Em uma sequência de trabalhos, os autores apresentam o diagrama de misturas ternárias surfactante cloreto e/ou brometo de cetilpiridinium (CpCl/CpBr) e álcoois (n-pentanol e n-hexanol) de cadeia linear. Resumidamente, os primeiros resultados foram expressos em um diagrama radial na região altamente diluída, com diversas fases se sucedendo em função da relação estequiométrica entre o álcool e o surfactante. Mantendo-se constante a concentração do detergente, as moléculas se organizam, no início, como micelas. Com a adição progressiva de álcool, as micelas crescem de tamanho e mudam de forma; aquelas de cloreto de cetilpiridinium (CpCl) permanecem pequenas e globulares, enquanto as de brometo de cetilpiridinium (CpBr) crescem para formar grandes cilindros flexíveis. Mais álcool, e formam-se lamelas inchadas (fase  $L_a$ ). A seguir, em uma estreita faixa do diagrama, observa-se isotropia óptica e baixa viscosidade. Trata-se da fase esponja  $L_3$ . Os padrões de espalhamento de raios-x e neutrons mostram um máximo bem definido, que corresponde a um comprimento estrutural que os autores identificaram com o diâmetro médio das “conexões” ou “passagens”.

A fase  $L_3$  é descrita como uma formação randômica de poros (pescoços) de tal forma que a posição desses defeitos produz uma estrutura opticamente isotrópica (PORTE, 1992; McGRATH et al., 1997). A fase pode ser confirmada por birrefringência de fluxo e costuma ser vista em certas soluções nas quais o surfactante está presente em pouco por cento em peso. Ocorre em sistemas que se oponham a qualquer dobramento local (por exemplo, moléculas com formato cilíndrico), dobramento esse que seria necessário para a formação de micelas compactas (ROUX et al., 1992). Como alternativa forma-se uma superfície randômica altamente conectada.

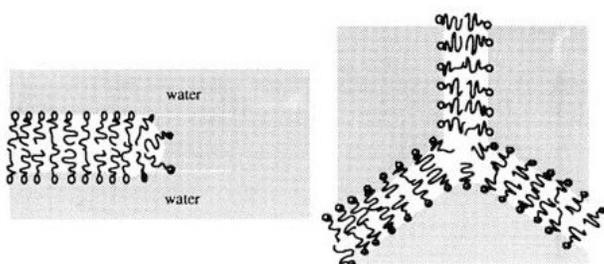
O aumento da flexibilidade das membranas ocorre pela adição de um co-solvente capaz de se inserir na bicamada e, em uma estequiometria específica, inicia-se um processo de fusão. A inserção do cosolvente altera de maneira significativa os parâmetros elásticos da bicamada. Particularmente os álcoois, têm uma poderosa capacidade de controlar as interfaces anfífilas e, como consequência, a forma dos agregados (HENDRIKX et al., 1984). A progressiva adição de álcool corresponde a uma curvatura cada vez menor para o filme surfactante - cosurfactante, e está de acordo com o princípio segundo o qual essa adição diminui a curvatura (módulo de dobramento) Gaussiana. As mudanças observadas por métodos macroscópicos como, por exemplo, absorvância, viscosidade e condutividade, correspondem a relevantes transformações morfológicas dos agregados.

A proliferação espontânea de conexões em ambos os lados da membrana, tem, como primeiro efeito, destruir a ordem esmétrica da fase lamelar inchada  $L_{\alpha}$ , inicialmente em alguns pontos. A proliferação resulta na estrutura apresentada na Figura 2.4.1. Esse modelo é suportado por um grande número de resultados experimentais, combinando espalhamento de raios-X e nêutrons, medidas de transporte (condutividade e auto difusão de componentes) (PORTE, 1996). Como resultado, a bicamada está dobrada quase em toda a parte, e suas principais curvaturas se apresentam com sinais opostos. A superfície randômica da fase  $L_3$  divide o espaço em dois labirintos de solvente que se interpenetram (dentro e fora).

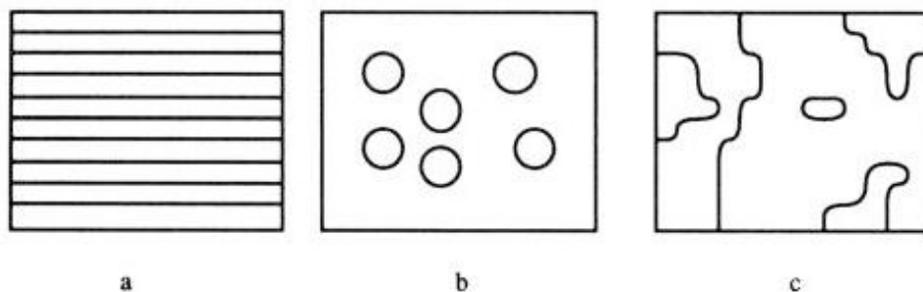


**Figura 2.4.1:** a) duas bicamadas próximas na fase  $L_{\alpha}$ ; b) a formação de uma “passagem” elementar; c) um desenho esquemático da estrutura  $L_3$  (PORTE, 1992).

A distância característica no sistema varia linearmente com o inverso da fração de volume de anfifílico (PORTE, 1992). As fases  $L_3$  e  $L_a$  são as duas únicas fases líquido cristalinas que seguem a lei da diluição universal, pela qual a topologia da fase permanece inalterada sobre a inteira fração de volume para a qual a lei é válida. A Figura 2.4.2 mostra defeitos que não são permitidos (cantos e costuras), e a rede bicontínua da esponja ocorre pela necessidade de evitá-los. O custo na energia de dobramento de tais defeitos é assumido ser proibitivo porque o filme surfactante é dobrado em uma escala molecular, dobramentos esses não permitidos (ISRAELACHVILI et al., 1976)



**Figura 2.4.2:** Cantos e costuras - típicos defeitos que não são permitidos para uma fase esponja (ROUX et al., 1992).



**Figura 2.4.3:** corte bidimensional de uma organização longo alcance para superfícies embebidas em 3D: a) fase lamelar na qual as membranas são empacotadas em uma fase uni-dimensional de longo alcance ( $L_a$ ); b) fase líquida de dispersão de vesículas esféricas; c) fase líquida de bicamadas conectadas ao acaso ( $L_3$ ) (ROUX et al., 1992).

A figura 2.4.3 mostra um corte bidimensional: a) fase lamelar na qual as membranas estão empacotadas em uma fase unidimensional de longo alcance; b) fase líquida de dispersão de vesículas esféricas; c) fase líquida de bicamadas conectadas ao acaso (ROUX et al., 1992).

Os conceitos mais importantes para a descrição da fase  $L_3$  referem-se à teoria da elasticidade para fluidos bidimensionais que é a resistência que é oferecida frente à deformação a partir de uma curvatura espontânea preferida da bicamada. As propriedades de dobramento são descritas por dois módulos elásticos, o módulo médio e o módulo Gaussiano (HELFRICH, 1973).

O sinal e tamanho da constante de dobramento Gaussiano desempenham um importante papel para o entendimento da fase  $L_3$ , que tem curvatura média igual a zero e módulo Gaussiano negativo. Considerando uma aproximação harmônica, a energia livre elástica de uma superfície pode ser descrita por

$$E = \int [2 \kappa_m (H - H_0)^2 + \kappa_g K] dA$$

onde  $H$  é a curvatura média,  $K$  é a curvatura Gaussiana,  $H_0$  é a curvatura espontânea da superfície,  $\kappa_m$  e  $\kappa_g$  são os módulos elásticos de curvatura médio e gaussiano e  $dA$  é o elemento de área.  $H$  é igual a  $(C_1 + C_2)/2$  e  $K$  é igual a  $C_1 C_2$ , onde  $C_1$  e  $C_2$  são as curvaturas principais da superfície. Para uma bicamada formada por duas monocamadas idênticas,  $H_0$  é igual a zero por simetria.

As constantes  $\kappa_m$  e  $\kappa_g$  têm unidade de energia. Quando  $\kappa_m$  é bem maior do que  $\kappa_B T$  ( $\kappa_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura absoluta), a membrana é rígida e as flutuações térmicas terão pouco efeito na forma da membrana. Por outro lado, quando  $\kappa_m$  tem a ordem de grandeza de  $\kappa_B T$ , flutuações tornam-se importantes e a superfície torna-se mais flexível. A situação acima pode tem um caráter mais quantitativo calculando-se o comprimento de persistência de uma bicamada o qual e definido como a escala de comprimento (distância) na qual as flutuações térmicas levam a um afastamento da forma plana, ou seja, a superfície deixa de ser plana a partir dessa distância. O comprimento de persistência ( $\xi$ ) é uma função exponencial de  $\kappa_m$

$$\xi = a \exp[4 \pi \kappa_m / (3 \kappa_B T)]$$

onde  $a$  é um comprimento molecular.

Pelo teorema de Gauss-Bonnet, temos:

$$\int K dA = 2 \pi \chi = 4 \pi [1 - g(\chi)]$$

onde  $\chi$  é a característica de Euler-Poincaré e  $g(\chi)$  é genus da superfície (“medida do número de alças e furos da superfície”). Assim, a curvatura Gaussiana é uma função da topologia da superfície e o valor de  $\kappa_g$  deve influenciar a estrutura da superfície. Por razões de estabilidade,  $\kappa_m$  deve ser positivo e  $\kappa_g$  deve obedecer a condição  $-2 \kappa_m \leq \kappa_g \leq 0$ . Quando o valor de  $\kappa_g$  está bem próximo de zero, estruturas com alto genus, como a fase esponja, por exemplo, terão energia livre mais favorável quando comparadas a fase lamelar ou vesículas.

Leis de escala surgem da observação que a energia livre elástica de uma superfície é invariante sobre a operação matemática da dilatação. Elas descrevem como as propriedades termodinâmicas de uma fase variam com a diluição e temperatura.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Double-Chain Cationic Surfactant and *n*-Pentanol: An $L_3$ Phase in the Rich-Water Domain?**

#### **3.2 Supramolecular Assembling of Cationic Synthetic Lipid in a Diluted Region**

## 4. CONCLUSÕES

A presente dissertação descreve dois sistemas originais, estáveis e reprodutíveis, preparados com o lipídio sintético DODAB em uma região altamente diluída: a fase ternária  $L_3$  com pentanol e o sistema binário obtido pela diálise de uma fase isotrópica de DODAB e n-pentanol.

*Fase  $L_3$* : a isotropia óptica aparece na construção do diagrama ternário como um triângulo radial encostado no canto água. A presença de bicamadas foi demonstrada por duas técnicas, microcalorimetria diferencial de varredura e espectroscopia de ressonância paramagnética do elétron. A sugestão de uma fase esponja foi feita por similaridade com os resultados de outros grupos de pesquisa. A conclusão inequívoca sobre a existência de uma fase  $L_3$  exige medidas adicionais, como o espalhamento de nêutrons baixo ângulo.

*Dialisado*: até 10 mM de DODAB, em uma relação molar de pentanol 15 vezes maior, observa-se isotropia óptica. A fase é altamente instável e se decompõe em multifase após algumas horas. A rápida retirada do cosolvente por diálise contínua resulta em uma fase em tudo similar à água pura. É possível afirmar, com as técnicas utilizadas, que todo o pentanol é retirado do saco de diálise enquanto o lipídio permanece. Comparativamente às vesículas de água quente, o *dialisado*, de mesma composição química, revela que o pentanol promoveu uma profunda transformação morfológica, inserindo-se na bicamada e alterando a sua curvatura. A hipótese é que ocorre um ajuste de curvatura em uma estreita relação molar entre os dois componentes, que permite a formação de superfícies mínimas cuja unidade de repetição é a sela. Uma vez formada, o álcool pode sair, deixando um sistema impossível de ser obtido de outra forma. Medidas de Ressonância Magnética Nuclear sugerem a existência de uma estrutura supramolecular. Afirmações sobre a real estrutura do dialisado exigem técnicas adicionais, como espalhamento de nêutrons baixo ângulo.

## 5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

## 5.1 Moldes surfactantes para a deposição de silicatos e aluminosilicatos

A malha randômica de bicamadas multiplamente conectadas da fase esponja já foi usada para a síntese de sólidos com mesoporos bicontínuos (McGRATH et al., 1997). Esses materiais são importantes porque possuem poros de tamanho sem análogos na natureza, compreendidos entre 2 e 50 nanômetros. A habilidade de controlar tamanho de poros com o uso de anfifílicos tem permitido a produção de uma variedade de estruturas, incluindo lamelar, hexagonal, tubular e cúbica.

Resultados preliminares foram obtidos através de uma parceria com o Laboratório de Peneiras Moleculares Micro e Mesoporosas, do Instituto de Química da Unicamp. A hipótese é que o molde nemático  $L_3$ , preparado com DODAB e pentanol, permite a síntese de silicatos com mesoporos bicontínuos.

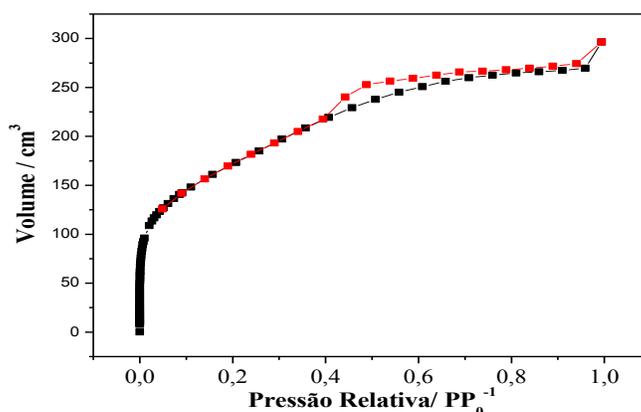
Há uma vasta possibilidade de aplicação deste material, como em processos de remoção de metais pesados e pesticidas em solos contaminados (WANG et al., 2009). A peculiar morfologia dos poros bicontínuos agrega inúmeras vantagens sobre os materiais que existem no comércio. São descritas aplicação em peneiras moleculares, suporte para enzimas, sensores e componentes ópticos, separação de moléculas biológicas, catalisadores, materiais cromatográficos empacotados, remoção de metais pesados e pesticidas, etc.

A fase silícica  $L_3$  foi obtida a partir de uma solução de DODAB na qual se adicionou HCl concentrado e tetraetoxisilano, e em seguida a mistura foi submetida a aquecimento. O material obtido foi centrifugado e lavado até pH neutro, e então seco em dessecador. O material foi calcinado a 650 °C durante 5 horas sob atmosfera de oxigênio, e submetido à análise de adsorção de nitrogênio para avaliar a área e a possibilidade de existência de poros. As medidas de adsorção de nitrogênio foram realizadas em um analisador volumétrico de adsorção Quantachrome Autosorb-1.

A isoterma de adsorção/ dessorção de nitrogênio e os parâmetros calculados a partir desta podem ser analisados na Figura 5.1.1 e na Tabela 5.1.1.

Amostra	Área específica – BET (m <sup>2</sup> /g)	Contribuição de microporos - t-plot (m <sup>2</sup> /g)	Diâmetro de poro (nm)	Volume de poro (cm <sup>3</sup> /g)
LS003c	623	59,2	3,5	0,41

**Tabela 5.1.1:** Parâmetros da análise textural da amostra silícica L<sub>3</sub>.



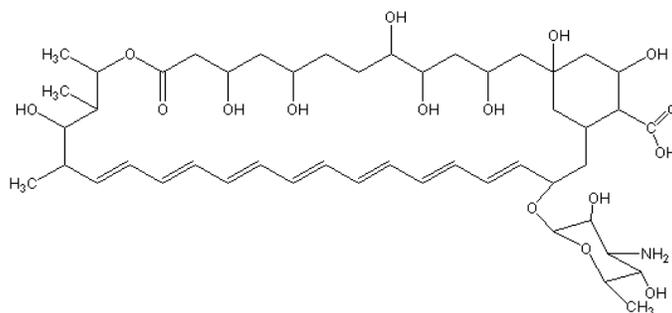
**Figura 5.1.1:** Isoterma de adsorção física de nitrogênio na amostra silícica L<sub>3</sub>.

A isoterma obtida para o material silícico L<sub>3</sub> é do tipo IV característico de materiais mesoporosos. No entanto, em pressões relativas ( $P/P_0$ ) próximas de zero, a isoterma tem a forma característica de materiais microporosos. Assim, pode-se concluir que o material obtido apresenta tanto micro quanto mesoporos, sendo que a área de microporos corresponde a aproximadamente 10% da área total, Tabela 5.1.1.

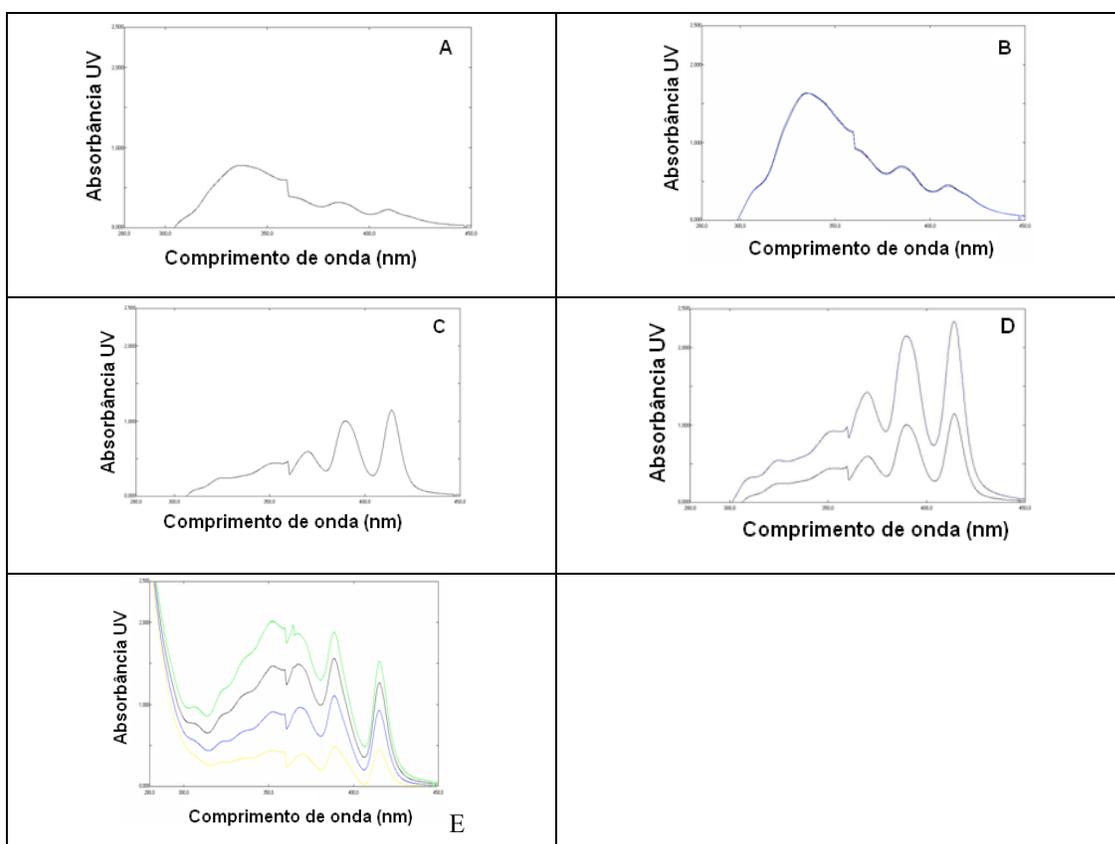
## 5.2 Fase L<sub>3</sub> e o transporte de anfotericina B.

O sistema L<sub>3</sub> DODAB/pentanol foi testado como carregador de drogas e a molécula escolhida foi a anfotericina B (Fig. 5.2.1). Trata-se de um antibiótico poliênico, um dos mais velhos e amplamente usados no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Esse fármaco age na divisão celular, e é uma das poucas opções de tratamento. As medidas

foram feitas traçando-se o espectro da droga em seu melhor solvente e nos diversos sistemas controle.



**Figura 5.2.1** : Estrutura molecular da Anfotericina B.



**Figura 5.2.2:** espectros na faixa de absorção de UV, os perfis de anfotericina B (30 µl) em água, controle (A); anfotericina B em pentanol, (B); no seu melhor solvente (dimetil sulfóxido:metanol, para 20 µl (C) e 40 µl (D); e na fase L<sub>3</sub>, nas adições sucessivas de 20 µl, 40 µl, 60 µl e 80 µl de anfotericina B (E).

A anfotericina B é praticamente insolúvel em água, de forma que a sua solubilização depende estritamente da presença de bicamadas. A anfotericina B é também pouco solúvel em vesículas fechadas (VIEIRA; CARMONA-RIBEIRO, 2001). O ambiente poliênico da droga interage com as bordas hidrofóbicas (no caso dos fragmentos de vesículas sonicadas), e a parte hidroxila fica na face exposta à água.

A solubilização foi seguida por espectroscopia óptica, com a observação do desaparecimento dos grandes agregados. Os resultados podem ser vistos na Fig. 5.2.2. Em água, o espectro é mal resolvido porque a Anfotericina B forma grumos que não se dissolvem, enquanto a fase L<sub>3</sub> permite uma resolução similar ao melhor solvente. Os resultados permitem concluir que na fase L<sub>3</sub> a droga está presente em sua forma monomérica. Fica assim evidente a capacidade de solubilização e, portanto, de transporte da anfotericina B pelo sistema esponja.

### 5.3 Investigação de isotropia para outros alcoóis

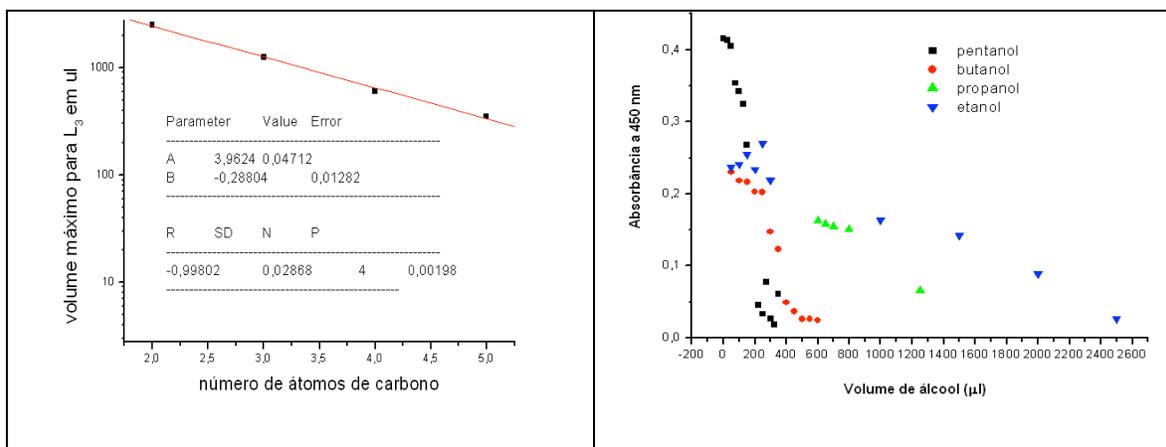
A possibilidade da existência de uma fase com isotropia óptica similar à descrita para o pentanol foi investigada com alcoóis de 1 até 6 carbonos. Na tabela 5.3.1 está representada o volume (em microlitros) de álcool para a qual se observou transparência.

Nº de carbonos do álcool	Volume em ul
2	3000
3	1250
4	600
5	275
6	120

**Tabela 5.3.1:** Relação entre o volume ( $\mu\text{l}$ ) necessário para a obtenção de uma fase com isotropia óptica com o número de átomos de carbono do álcool.

As concentrações de álcool necessárias para a obtenção de amostras transparentes mostram um comportamento exponencial em função do número de carbono. O gráfico semi log da

quantidade mínima de cada álcool capaz de formar uma fase com isotropia óptica, à uma concentração constante de DODAB, é uma linha reta (Figura 5.3.1).



**Figura 5.3.1:** À esquerda está apresentado o gráfico do número de carbonos versus o volume necessário para a obtenção de isotropia óptica; à direita, os dados em escala logarítmica [DODAB] = 3 mM.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENATTI, C. R.; FEITOSA, E.; FERNANDEZ, R. M.; LAMY-FREUND, M. T. Structural and thermal characterization of dioctadecylammonium bromide dispersions by spin labels. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 111, n. 2, p. 93-104, 2001.

BENTON, W. J.; MILLER, C. A. Lyotropic liquid crystalline phases and dispersions in dilute anionic surfactant-alcohol-brine systems: 1. patterns of phase behavior. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 87, n. 24, p. 4981-4991, 1983.

BLANDAMER, M. J.; BRIGGS, B.; CULLIS, P. M.; P. M.; GREEN, J. A.; WATERS, M.; SOLDI, G.; ENGBERTS, J. B. F. N.; HOEKSTRA, D. Differential scanning microcalorimetric study of vesicles in aqueous solutions formed by-dimethyldioctadecylammonium bromide. **Journal of the Chemical Society**. Faraday Transactions II, London, 1992, v. 88, n. 23, p. 3431-3434, 1992.

BRITO, R. O.; MARQUES, E. F. Neat DODAB vesicles: effect of sonication time on the phase transition thermodynamic parameters and its relation with incomplete chain freezing. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 137, n. 1-2, p. 18-28, 2005.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer vesicles and liposomes as interface agents. **Chemical Society Reviews**, London, v. 30, p. 241-247, 2001.

CATES, M. E.; ROUX, D.; ANDELMAN, D.; MILNER, S. T.; SAFRAN, S. A. Random surface model for the L<sub>3</sub>-phase of dilute surfactant solutions. **Europhysics Letters**, Paris, v. 5, n. 8, p. 733-739, 1988.

CHARVOLIN, J. Crystals of interfaces: the cubic phases of amphiphile water-systems. **Journal de Physique**, Paris, v. 46, n. 3, p. 173-190, 1985.

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 105, n. 2, p. 201-213, 2000.

FEITOSA, E.; BROWN, W. Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide. **Langmuir**, Washington, D.C., v. 13, n. 18, p. 4810-4816, 1997.

FEITOSA, E.; JANSSON, J.; LINDMAN, B. The effect of chain length on the melting temperature and size of dialkyldimethylammonium bromide vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 142, n. 1-2, p. 128-132, 2006a.

FEITOSA, E.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Unilamellar vesicles obtained by simply mixing dioctadecyldimethylammonium chloride and bromide with water. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 140, n. 1-2, p. 66-74, 2006b.

GOMATI, R.; APPELL, J.; BASSEREAU, P.; MARIGNAN, J.; PORTE, G. Influence of the nature of the counterion and of hexanol on the phase-behavior of the dilute ternary-systems: cetylpyridinium bromide or chloride hexanol brine. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, D.C., v. 91, n. 24, P. 6203-6210, 1987.

HELFRICH, W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. **Zeitschrift fur Naturforschung**. Section C: Journal of Biosciences, Tubingen, v. 28, n. 11, p. 693-703, 1973.

HENDRIKX, Y.; CHARVOLIN, J.; RAWISO, M. Segregation of 2 amphiphilic molecules within nonspherical micelles: a neutron-scattering study. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 100, n. 2, p. 597-600, 1984.

ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal of the Chemical Society**. Faraday Transactions II, London, v. 72, p. 1525-1568, 1976.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y. Totally synthetic bilayer membrane. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, D.C., v. 99, n. 11, p. 3860-3861, 1977.

LARCHE, F. C.; APPELL, J.; PORTE, G.; BASSEREAU, P.; MARIGNAN, J. Extreme swelling of a lyotropic lamellar liquid-crystal. **Physical Review Letters**, New York, v. 56, n. 16, p. 1700-1703, 1986.

LAUGHLIN, R. G.; MUNYON, R. L.; BURNS, J. L.; COFFINDAFFER, T. W.; TALMON, Y. Physical science of the dioctadecyldimethylammonium chloride-water system. 3. Colloidal aspects. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, D.C., v. 96, n. 1, p. 374-383, 1992.

MARSH, D. **Handbook of lipid bilayers**. Boca Raton: CRC, 1990. 387 p.

McGRATH, K. M.; DABBS, D. M.; YAO, N.; AKSAY, I. A.; GRUNER, S. M. Formation of a silicate  $L_3$  phase with continuously adjustable pore sizes. **Science**, Washington, D.C., v. 277, n. 5325, p. 552-556, 1997.

NASCIMENTO D. B.; RAPUANO R.; LESSA M.M.; CARMONA-RIBEIRO A.M. Counterion effects on properties of cationic vesicles. **Langmuir**, Washington, D.C., v. 14, n. 26, p. 7387-7391, 1998.

PANSU, R. B.; ARRIO, B.; RONCIN, J.; FAURE, J. Vesicles versus membrane-fragments in DODAC suspensions. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, D.C., v. 94, n. 2, p. 796-801, 1990.

PORTE, G. Lamellar phases and disordered phases of fluid bilayer membranes. **Journal of Physics: Condensed Matter**, Bristol, v. 4, n. 45, p. 8649-8670, 1992.

PORTE, G.; GOMATI, R.; ELHAITAMY, O.; APPELL, J.; MARIGNAN, J. Morphological transformations of the primary surfactant structures in brine-rich mixtures of ternary-systems (surfactant alcohol brine). **Journal of Physical Chemistry**, Washington, D.C., v. 90, n. 22, p. 5746-5751, 1986.

PORTE, G.; MARIGNAN, J.; BASSEREAU, P.; MAY, R. Shape transformations of the aggregates in dilute surfactant solutions: a small-angle neutron-scattering study. **Journal de Physique**, Paris, v. 49, n. 3, p. 511-519, 1988.

ROUX, D.; COULON, C.; CATES, M. E. Sponge phases in surfactant solutions. **Journal of Physical Chemistry**, Ithaca, v. 96, n. 11, p. 4174-4187, 1992.

SEIFERT, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. **Advances in Physics**, London, v. 46, n. 1, p. 13-137, 1997.

VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid & Interface Science**, London, v. 244, n. 2, p. 427-431, 2001.

WANG, P.; SHI, Q.; SHI, Y.; CLARK, K. K.; STUCKY, G. D.; KELLER, A. A. Magnetic permanently confined micelle arrays for treating hydrophobic organic compound contamination. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, D.C., v. 131, n. 1, p. 182-188, 2009.

WENNERSTRÖM, H.; DAICIC, J.; OLSSON, U.; JERKE, G.; SCHURTENBERGER, P.  
Sponge phases and balanced microemulsions: what determines their stability? **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 72, n. 1-3, p. 15-30, 1997.

## Double-Chain Cationic Surfactant and *n*-Pentanol: An L<sub>3</sub> Phase in the Rich-Water Domain?

Claudia C. Medugno,<sup>\*,§</sup> Marina de M. Lessa,<sup>§</sup> Tiago R. Oliveira,<sup>‡</sup> and M. Teresa Lamy<sup>‡</sup>

Embrapa Meio Ambiente, Rodovia Campinas Mogi Mirim, Tanquinho Velho, CP 69, BR-13820000 Jaguariúna, SP Brazil, and Instituto de Física, Universidade de S. Paulo, CP 66318, CEP 05315-970 S. Paulo, SP, Brazil

Received: June 20, 2007; In Final Form: August 20, 2007

A ternary system containing water, pentanol and a quaternary cationic surfactant, dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) was investigated. We present the phase diagram and ESR studies that demonstrate the existence of the well-known L<sub>3</sub> or sponge phase in the water-rich domain of the diagram. The remarkable fact is the existence of some kind of order in such diluted conditions.

### Introduction

Dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) is one of the most investigated vesicle-forming cationic synthetic lipids.<sup>1</sup> Above its chain melting temperature ( $T_m$ ), these double C18, very low soluble species spontaneously form closed stable bilayer structures<sup>2–3</sup> when dispersed in water. The thickness of vesicle membranes in the radial direction is bimolecular (3–5 nm), and they may have dimensions and structures similar to those of living cell membranes ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ).<sup>4</sup> In addition, they exhibit some functional characteristics of natural membranes such as permeability and the ability to accommodate some compounds. The presence of these compounds in the bilayer membrane affects properties such as viscosity, permeability, and curvature. Changing the composition, temperature, and preparation procedure, structures with different properties can be obtained for surfactant/cosurfactant/water systems.<sup>5</sup>

For swollen surfactant systems, two well-characterized phases exist, having a surfactant bilayer as their basic unit. The first, a lamellar phase ( $L_\alpha$ ), is a birefringent one-dimensional array of indefinite bilayers stacked with smectic order. The second, the sponge phase ( $L_3$ ), in contrast, is an optically isotropic three-dimensional random multiple connected bilayer. Both were soon suspected to be a diluted phase of fluid bilayers.<sup>6</sup>

Since the pioneering observations of Per Ekwall,  $L_\alpha$  and  $L_3$  have been observed in a large number of systems, ranging from the simplest binary non-ionic surfactant solutions to the most complex system involving up to five components. The assessment of these structures is generally made by a combination of techniques such as neutron and X-ray scattering.<sup>7</sup>

Few studies exist on the behavior of standard organic compounds in bilayer vesicles in diluted colloidal domains ( $< 1 \text{ wt/wt amphiphile}$ ),<sup>8–10</sup> but instead most focus on relatively concentrated lipid phases.<sup>11</sup>

Here we report on phase evolution in the ternary system DODAB/water/pentanol in the water-rich corner of the phase

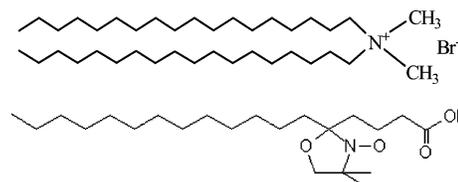


Figure 1. Synthetic cationic lipid DODAB and 5-SASL.

diagram. With increasing amounts of *n*-pentanol, the following phases appear successively: vesicles ( $L_4$ ), lamellar swelling ( $L_\alpha$ ),  $L_3$ , and a multiphase. The phases, characterized by a combination of techniques, have aggregate morphologies governed by the pentanol/DODAB ratio. This sequence has some analogy with other anionic surfactant–alcohol–water systems.<sup>12–14</sup> Evidence of the lamellar phase is currently under investigation.

### Experimental Section

**Chemicals.** DODAB (Figure 1a), with  $a \geq 99\%$  and 5-doxy stearic acid spin labels (5-SASL with the doxyl group at the fifth C-atom) (Figure 1b) were used as purchased from Sigma Chemical Co. Water (Milli-Q quality) and *n*-pentanol (spectroscopic grade; Merck), were used without further purification.

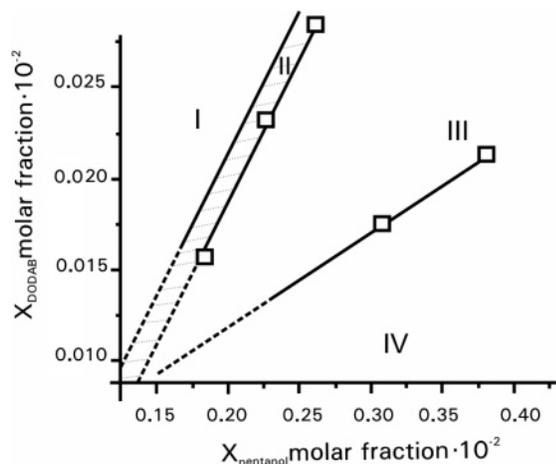
**Phase Diagram.** The three components were weighed in Falcon tubes with 50 mL of capability, gently stirring at 65 °C (above  $T_m$ ) for 2 h and then cooled to 30 °C, the storage temperature. The phase behavior was determined by direct optical observations and by polarized light observation. All dispersions were prepared in a water-rich region (volume fraction of water  $> 99\%$ ). Equilibration for three weeks was necessary for an accurate phase boundary determination. Some samples were characterized by turbidity at 450 nm, in a UV/vis Perkin-Elmer Lambda 20 spectrometer.

**Dynamic Light Scattering (DLS).** Mean-average diameters ( $D$ ) were carried out using Brookhaven equipment (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY), equipped with a 570-nm laser and DLS at 90°, for particle sizing. Samples were read without dilution, at 25 °C. Typically, five independent measure-

\* Corresponding author.

§ Embrapa Meio Ambiente.

‡ Universidade de S. Paulo.



**Figure 2.** Phase diagram of the DODAB/*n*-pentanol/water system for a small surfactant concentration at 30 °C. Phase I: vesicles; phase II: assumed to be an  $L_{\alpha}$  phase (under investigation); phase III: isotropic phase  $L_3$ ; phase IV: multiphase.

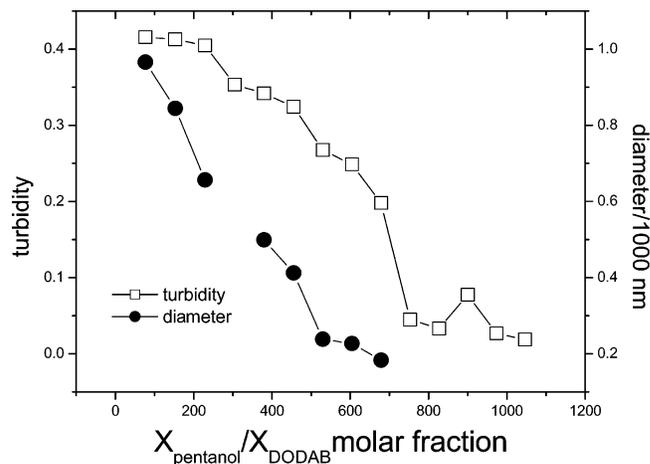
ments were taken to obtain a mean hydrodynamic diameter and a mean variance. Data analyses were carried out by second-order cumulant analysis according to the software.

**Electron Spin Resonance Spectroscopy (ESR).** Measurements were performed with a Bruker EMX spectrometer with field-modulation amplitude of 1 G and microwave power of 5 mW. Temperature was controlled to  $\pm 0.2$  °C with a Bruker BVT-2000 variable temperature regulator. The magnetic field was measured with a Bruker ER 035 NMR Gaussmeter. Spin-labeled sample preparations: films were formed from chloroform solutions, dried under a  $N_2$  stream, and left under reduced pressure for at least 2 h to remove all traces of the organic solvent. Spin-labeled dispersions of DODAB were prepared by adding the amphiphilic dispersion to the dried film (to a final concentration of no more than 0.8 mol % of label relative to amphiphile, to avoid spin–spin interactions), and the sample was smoothly stirred for 5 min. ESR measurements were initiated within 1 h of the spin-label addition to the mixture dispersions.

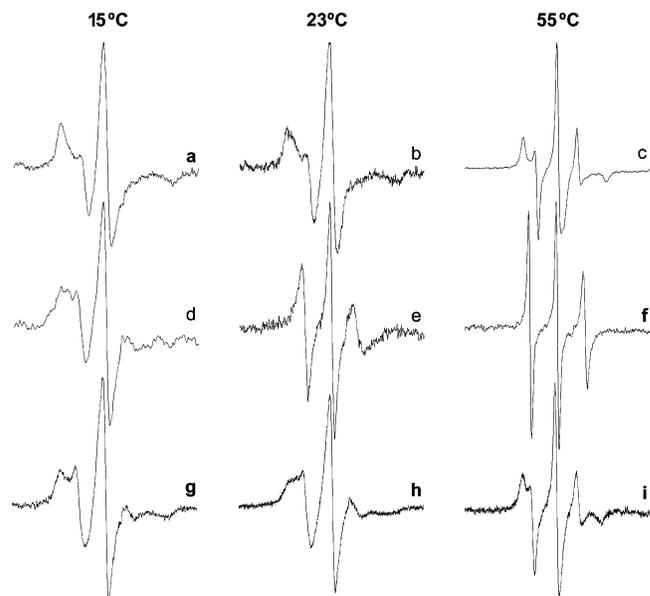
## Results and Discussion

**Phase Diagram.** A preliminary phase diagram characterization was done by changing the composition of the ternary system water/DODAB/pentanol. The water-rich region was initially mapped on the basis of visual inspection of the macroscopic properties (phase number, homogeneity, and birefringence) at 30 °C. Figure 2 shows a phase diagram where only molar fractions of DODAB and pentanol are shown. Four different phases were observed. The first (region I) is the well-known classical vesicles, obtained in the absence of alcohol. Preparations with higher alcohol content produce transparent samples (absorbancy measurements close to zero), which were stable for several weeks (region III). These morphological changes with increasing *n*-pentanol addition in a constant DODAB concentration can be observed in Figure 3: the variations of the apparent hydrodynamic diameter (DLS) and turbidity indicate very strong transformations in the size and shape of the structures. The diameter decreases to a limit value of ca. 200 nm, from which the transparency of the samples prevents any DLS measurements.

**ESR.** The ESR spectra yielded by the 5-SASL incorporated in DODAB vesicles (region I), in the isotropic phase (region



**Figure 3.** DODAB dispersion mean diameter ( $D$ ) decreases in water as a function of the ratio between molar fractions of *n*-pentanol and DODAB  $X_{\text{pentanol}}/X_{\text{DODAB}}$ . In ratios higher than 700, the transparency of the samples prevents light scattering measurements. Circle: mean diameter ( $D$ ) in nm; squares: turbidity at 450 nm.



**Figure 4.** ESR spectra of 5-SASL incorporated in a DODAB aqueous dispersion: signals indicate the presence of lipid bilayer gel and fluid phases, both in DODAB vesicles (a and b, gel; c, fluid) and in the optically isotropic phase (g and h, gel; i, fluid). In the middle, for comparison, in a sample with 5 mM DODAB saturated with *n*-pentanol, relatively isotropic 5-SASL ESR signals are observed at 23 and 55 °C, indicating the presence of micelle-like aggregates.

III), and in DODAB vesicles saturated with pentanol, at three temperatures, are shown in Figure 4.

The approach of comparing ESR spectra at three temperatures in defined compositions of the phase diagram allows the assessment of the degree of organization of DODAB chains in the membrane, the membrane bilayer fluidity state, and the occurrence of fluidity states transitions, an event possible only in ordered bilayers. Bilayers of DODAB in water at temperatures below 42 °C ( $T_m$ ) are in a rigid gel state; in other words, the mobility of chains in the membrane is very low.<sup>15</sup> Above a given temperature  $T_m$  (melting temperature) DODAB chains have a higher mobility; the membrane is in a fluid state. The transition from gel to fluid can only be observed in organized systems, and cannot be detected in structures such as mixed micelles, for instance. The gel and fluid vesicle bilayer phases can be

well characterized by the ESR spectra of the 5-SASL incorporated in the membrane. At 15 and 23 °C (Figure 4a,b), the broad features of the 5-SASL ESR signals indicate the presence of a highly packed environment, typical of membranes in the gel phase.<sup>15</sup> At 55 °C (Figure 4c), the ESR is rather anisotropic, but with much narrower features, indicating fast movement for the probe, characteristic of the highly ordered but much less packed microenvironment of DODAB in the membrane fluid phase at the fifth C-atom position.<sup>16</sup> With isotropic samples, the 5-SASL signals at 15 and 23 °C (Figure 4g,h) are typical of a membrane gel phase, whereas the signal at 55 °C (Figure 4i) clearly indicates the presence of fluid bilayers.<sup>17</sup> In the middle (Figure 4e,f) turbid samples (DODAB saturated with pentanol), relatively isotropic 5-SASL ESR signals, at 23 and 55 °C, indicate the presence of micelle-like aggregates, probably DODAB/pentanol mixed micelles.

The combination of visual observations, turbidity, size particle measurements, and ESR signals of a probe allow us to assign Region III to the following characteristics: low viscosity, optical isotropy, and ordered surfactant arrangement. This group of properties points to an L<sub>3</sub> phase. The argument that pentanol is a reasonably water-soluble molecule, and thus could act as a cosolvent for DODAB, is not compatible with the highly packed environment of an ESR probe. Another important observation is that dilution of any sample with composition lying in Region III does not cause changes in its optical properties, indicating that the existence of this phase is governed by the ratio of DODAB/pentanol. When observed between crossed polarizers with gentle stirring, the phase displays a Tyndall effect. Samples with compositions lying in a narrow band (region II) show a subtle opalescence. Careful observation is necessary at this point because of the discreteness of the effects, which we believe is

a consequence of the low surfactant concentration. Compositions lying in Region IV display multiphase behavior. It is possible to observe in the turbid samples skin-like structures, sediments, and many indications of the presence of several types of phases.

**Acknowledgment.** This work was supported by EMBRAPA, FAPESP, CNPq, and USP. The authors are indebted to Dr. Gaspar Gonzalez (Petrobrás) for his valuable discussions.

## References and Notes

- (1) Carmona-Ribeiro, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 241.
- (2) Feitosa, E.; Karlsson, G.; Edwards, K. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *140*, 66.
- (3) Feitosa, E.; Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *105*, 201.
- (4) Laughlin, R. G. *Colloids Surf. A* **1997**, *128*, 27.
- (5) Feitosa, R.; Bonassi, N. M.; Loh, W. *Langmuir* **2006**, *22*, 4512.
- (6) Mahjoub, H. F.; McGrath, K. M.; Kléman, M. *Langmuir* **1996**, *12*, 3131.
- (7) Porte, G. *J. Phys. Cond. Mat.* **1992**, *4*, 8649.
- (8) Jung, M.; Hubert, D. H. W.; Van Veldhoven, E.; Frederik, P. M.; Blandamer, M. J.; Briggs, B.; Visser, A. J. W. G.; Van, Herk, A. M.; German, A. L. *Langmuir* **2000**, *16*, 968.
- (9) Nagarajan, R. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, *2*, 282.
- (10) Inoue, T. In *Vesicles*; Rosoff, M., Ed.; Marcell Dekker: New York, **1996**; Chapter 5, pp 151–195.
- (11) Lohner, K. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 341.
- (12) Benton, W. J.; Miller, C. A. *J. Phy. Chem.* **1983**, *87*, 4981.
- (13) Gomati, R.; Appell, J.; Bassereau, P.; Marnigian, J.; Porte, G. *J. Phy. Chem.* **1987**, *91*, 6203.
- (14) Hoffmann, H.; Thunig, C.; Munkert, U. *Langmuir* **1992**, *8*, 2629.
- (15) Yagle, P. L. *The Structure of biological membranes*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2005; p 58.
- (16) Benatti, C. R.; Feitosa, E.; Fernandez, R. M.; Lamy-Freund, M. T. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *111*, 93.
- (17) Berliner, L. J. *Spin Labeling: Theory and Applications*; Academic Press: New York, 1976.

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

ARTICLE TYPE

# Supramolecular Assembling of a Cationic Synthetic Lipid in a Diluted Region

Claudia C. Medugno<sup>a</sup>, Sonia C. N. Queiroz<sup>a</sup>, Fred Y. Fujiwara<sup>b</sup>, Watson Loh<sup>b</sup>

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

We report on the formation of a novel transparent lipid phase with high kinetic stability. Starting from a phase with lipid and pentanol in a water-rich region, we perform the total removal of alcohol by extended dialysis. The bicontinuous features after pentanol removal display stability upon heating-cooling cycles. We propose that the lipids remain as a fused and wrapped bilayer.

The amphiphilic sponge-phase ( $L_3$ ) represents a new class of self-assembly for surfactant-water systems.<sup>1</sup>  $L_3$  appears as an isotropic phase generally in a narrow region of a phase diagram and can be tuned by ionic strength, temperature or interfacial composition.<sup>2</sup>  $L_3$  is much more common than originally thought and is described as a minimal surface, structured as a multiple connected bilayer.

Dimethyldioctadecylammonium bromide (DODAB) is a synthetic double-tailed cationic lipid with a vesicle-forming property as first observed by Kunitake and Okahata.<sup>3</sup> These long double C18 species consist of a relatively small polar head group attached to two hydrocarbon tails. Among various preparation methods, that of "hot-water"<sup>4</sup> offers a simple procedure to prepare closed large unilamellar vesicles (LUVs) with an average diameter of 800 nm, being enough mixing the powder with water above 50 °C, the (main) chain melting transition, ( $T_m$ ).

Recently, the formation of an  $L_3$  phase with DODAB and pentanol in the water-rich corner of their phase diagram has been reported.<sup>5</sup> This system can be described as  $L_3$  up to a lipid concentration of 3 mM, when the samples proved to be stable for up to five years. Efforts to increase lipid concentration showed that the highest possible concentration able to form a transparent phase with pentanol was 10 mM (99.34%) which lasts only a few hours, breaking down into the so-called "multiphase" – a turbid phase with tiny drops and needles.<sup>6</sup>

Here, we describe the results obtained upon the withdrawal of alcohol by dialysis. After cooling the DODAB (10 mM) pentanol (0.15 M) ternary phase from 65 to 30 °C, continuous dialysis was carried out on the isotropic mixture until the alcohol was completely removed. The dialyzed solution showed remarkable transparency and stability. The techniques and results used to prove the removal of the alcohol are described in Supplementary Information.

Lipids usually form lamellar bilayer structures over most of their phase diagram and in diluted solutions vesicles are formed.

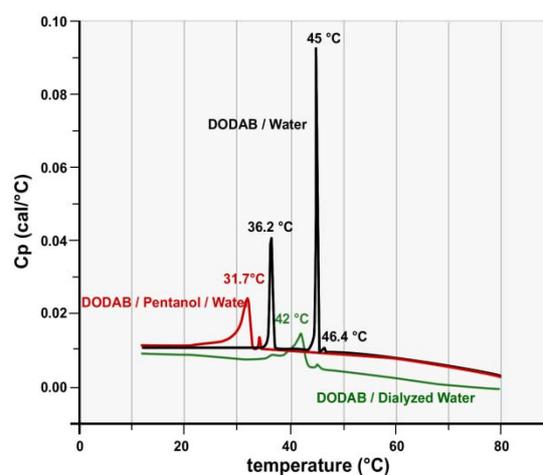
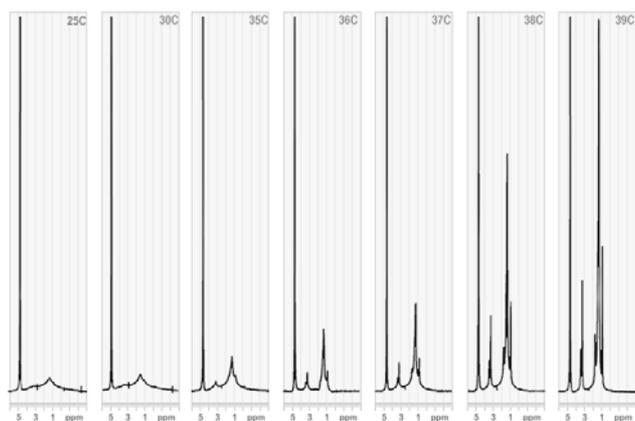


Fig. 1 DSC thermograms of 10 mM DODAB samples.

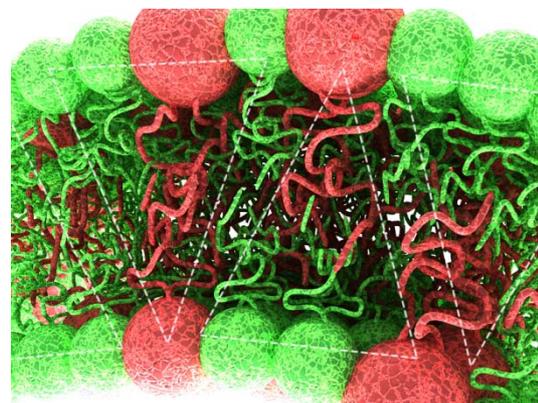
Differential scanning calorimetry (DSC) is a useful tool to investigate the thermotropic phase behavior and to determine the main transition temperature,  $T_m$ , of amphiphiles in vesicles from a gel to liquid-crystalline state (order-disorder transition). DSC measurements have been previously applied to investigate the DODAB water binary system.<sup>7</sup> Pure DODAB dispersions display two transition temperatures, typically referred to as pre- and main transition, the latter associated with the disordering of the alkyl chains.<sup>8</sup> It is known that addition of small solutes (or compounds with shorter alkyl chains) favors the disordered bilayer state, with consequent decrease in the transition temperature,  $T_m$ .

This fact can be clearly observed in Fig. 1, where a decrease of more than 10 °C in transition temperature of DODAB dispersion occurs upon addition of pentanol. This DSC trace also shows a broader peak, as an indication of decreasing cooperativity for this transition. When the system is dialyzed, the DSC corresponding trace still bears resemblance to the curve obtained in the presence of pentanol, although with a temperature shift of only a few degrees. This indicates that the bilayer structure is retained in this state, and its thermotropic properties remain somewhat intermediary between the pure and pentanol-containing bilayer. It is interesting to mention that the





**Fig. 2**  $^1\text{H}$  NMR variable temperature spectra of the dialyzed DODAB/pentanol/ $\text{D}_2\text{O}$  system.



**Fig. 3** Model for the formation of a cone from the inclusion of pentanol (green) in the lipid bilayer (red).

thermotropic behavior displayed by these samples is fully reversible, as long as heating-cooling cycles allow enough time for the system to equilibrate (typically, each cycle is repeated after ca. 60 min). The smaller transition temperature of the dialyzed dispersion may reflect that, in this system, DODAB alkyl chains remain in a less ordered state than in the pure binary mixture.

Calorimetric data are rarely capable of providing molecular information, but it is clear from the traces shown in Fig. 1 that the three systems are different and that the dialyzed sample conforms to neither the pentanol-containing nor to the pure DODAB dispersion. Interfacial curvature is an important issue with respect to these bicontinuous structures and some authors have related curvature effects to changes in thermotropic behavior of similar dispersions, in addition to the above comment on the order state of the alkyl chains.<sup>9</sup>

Very few experimental observations make possible a distinction between discrete and connected structures. However, bicontinuous nature could easily be provided support by self-diffusion NMR.<sup>10</sup> Fig. 2 shows the variable temperature NMR spectra of the dialyzed DODAB phase containing  $\text{D}_2\text{O}$ . Below 35 °C, these spectra exhibited a broad unresolved peak, while above 39 °C, the peaks became sharp and well-resolved. These spectra were reproducible during several heating-cooling cycles and no spectral changes were observed over a month. At 25°C, the apparent relaxation times  $T_1$  and  $T_2$  of the unresolved peak of DODAB were 0.6 s and 0.3 ms, respectively.

**Table 1** NMR relaxation times at 40 °C

Group	$T_1$ /s	$T_2$ /ms
$\alpha\text{-CH}_2$	0.46	8
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	0.44	15
$\beta\text{-CH}_2$	0.50	8
$(\text{CH}_2)_n$	0.74	7
$\text{CH}_3$	1.13	19

The relaxation times at 40°C are presented in Table 1. At 40°C,  $T_1 > T_2$  indicates that the relaxation correlation times,  $\tau_c$ , are long (*i.e.*  $\omega_0\tau_c > 1$ ) and that there is a restricted rotational diffusion. The

translational diffusion coefficient of DODAB at 40°C was  $6.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ; the relatively fast diffusion for a molecule the size of DODAB is consistent with the presence of a bicontinuous structure and rules out the possibility of closed aggregates such as vesicles. It is important to note that pentanol was not detected in the dialyzed DODAB/pentanol/water system sample as analyzed by  $^1\text{H}$  NMR spectrum whereas in the non-dialyzed system, pentanol was observed as a series of sharp peaks superimposed on the broad signal of DODAB.

According to the *surfactant parameter*,<sup>11</sup> DODAB has a cylindrical shape resulting in highly packed structures. The alcohol acts as a head spacer<sup>12, 13</sup> and alters the bilayer geometry to a cone-shape (Fig 2) and thus the surface can be curved. The evolution of the structure is driven by increasing bending (Fig. 3).<sup>14</sup> The curvature is related to the surfactant packing parameter by<sup>15</sup>

$$v/al = 1 + Hl + Kl^2/3$$

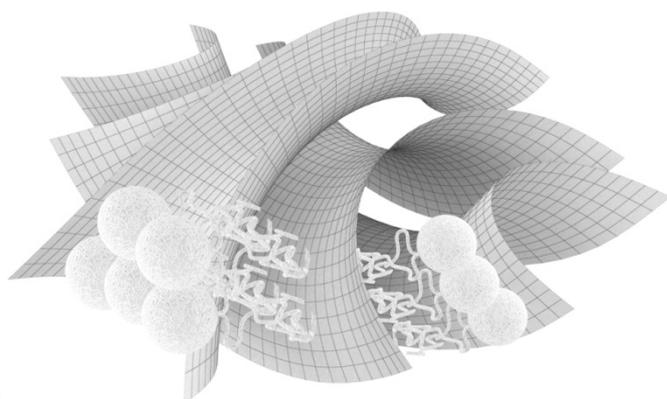
$H$  is the mean curvature and  $K$  is the Gaussian,  $v$  is the hydrophobic volume,  $a$  the interfacial area and  $l$  the chain length normal to the interface. The molecular shape is accommodated within the bilayer by tuning the Gaussian curvature.

The “fine tuning” allows the increase of interconnectivity, surface wandering and formation of a porous structure. Minimal surfaces are those where the  $H$  value at each point is zero, and the Gaussian curvature is negative (Fig. 4). In periodical minimal surfaces the finite surface element building block, which is repeated periodically throughout space, plays a role analogous to the unit cell in a crystal structure.<sup>16</sup>

The role of pentanol in the formation of the  $L_3$  phase is to increase flexibility and to increase the curvature of the bilayers into saddle-like morphologies, allowing the achievement of a minimal surface.

*Periodic minimal surfaces*, first suggested to describe microemulsions by Scriven<sup>18</sup>, have recently been revived due to potential applications in nanostructure formation<sup>19</sup> and protein crystallization.<sup>20</sup>

In summary, a novel transparent lipid phase with high kinetic stability is reported. Formation of this bicontinuous bilayer requires alcohol scaffolding that adjusts the supramolecular



**Fig. 4** Modified from Ref.<sup>17</sup> with permission. A local view of a bilayer interface: the center of the free chain-ends lies on a minimal surface. The midsurface provides a convenient locus for the bicontinuous description of the structure.

structure. After alcohol removal, lipids remain as a fused bilayer organized as a minimal surface. The main assumption is that the saddle-like bilayer is maintained even without the cosurfactant, *i.e.*, once both local and global restrictions<sup>15</sup> are met, the structure does not depend on the alcohol to persist.

At this stage, we cannot confirm the equilibrium nature of this system because this phase was not detected in the phase diagram of DODAB-water mixtures<sup>21</sup>, but it is remarkable that the phase persists over a long period of time and displays reversible thermotropic behavior when submitted to heating-cooling cycles.

The authors gratefully acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and São Paulo State Research Foundation (FAPESP) for financial support. W. L. thanks CNPq for a research productivity grant.

## Notes and references

<sup>a</sup> *Embrapa Environmental, Jaguariúna, SP, Rod. SP 340 km 127.5, 13820-000 Brazil. Fax: (55) 19 33112640; Tel: (55) 19 33112682; E-mail: medugno@cnpmembrapa.br*

<sup>b</sup> *Institute of Chemistry, University of Campinas, UNICAMP, SP 13083-970, Campinas, Brazil. Fax: (55) 19 35213023; Tel: (55) 19 35213001; E-mail: wloh@iqm.unicamp.br*

<sup>†</sup> Electronic Supplementary Information (ESI) available: [Details of materials and methods; results of chromatographic techniques for dialysis monitoring]. See DOI: 10.1039/b000000x/

- 1 D. Roux, C. Coulon and M. E. Cates, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 4174-4187; b) H. Hoffmann, C. Thunig, U. Munkert, H. W. Meyer and W. Richter, *Langmuir*, 1992, **8**, 2629-2638.
- 2 a) H. Wennerström, J. Daicic, U. Olsson, G. Jerke and P. Schurtenberger, *J. Mol. Liq.*, 1997, **72**, 15-30; b) R. Strey, R. Schomäcker, D. Roux, F. Nallet and U. Olsson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1990, **86**, 2253-2261.
- 3 T. Kunitake and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 3860-3861.

- 4 M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Cullis, J. A. Green, M. Waters, G. Soldi, J. B. F. N. Engberts and D. Hoekstra, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1992, **88**, 3431-3434.
- 5 C. C. Medugno, M. D. M. Lessa, T. R. Oliveira and M. T. Lamy, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 11892-11894.
- 6 G. Porte, R. Gomati, O. El Haitamy, J. Appell and J. Marignan, *J. Phys. Chem.*, 1986, **90**, 5746-5751.
- 7 E. Feitosa, P. C. A. Barreleiro and G. Olofsson, *Chem. Phys. Lipids*, 2000, **105**, 201-213.
- 8 R. O. Brito and E. F. Marques, *Chem. Phys. Lipids*, 2005, **137**, 18-28.
- 9 P. Saveyn, P. Van der Meeren, M. Zackrisson, T. Narayanan and U. Olsson, *Soft Matter*, 2009, **5**, 1753-1742.
- 10 O. Söderman and B. Lindman, in *Bicontinuous Liquid Crystals*, ed. M. T. Lynch and P. T. Spicer, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005, p. 214
- 11 J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell and B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, 1976, **72**, 1525-1568.
- 12 a) A. Benschaul, D. H. Rorman, G. V. Hartland and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem.*, 1986, **90**, 5277-5286; b) Y. Hendrix, J. Charvolin and M. Rawiso, *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, **100**, 597-600.
- 13 C. R. Safinya, E. B. Sirota, D. Roux and G. S. Smith, *Phys. Rev. Lett.*, 1989, **62**, 1134-1137.
- 14 S. M. Gruner, *J. Phys. Chem.*, 1989, **93**, 7562-7570.
- 15 S. T. Hyde, *J. Phys.*, 1990, **51**, C7209-C7228.
- 16 T. Landh, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 8453-8467.
- 17 S. Hyde, Z. Blum, T. Landh, S. Lidin, B. W. Ninham, S. Andersson and K. Larsson in *The Language of Shape*, Elsevier Science, Amsterdam, 1997, p. 150.
- 18 L. E. Scriven, *Nature*, 1976, **263**, 123-125.
- 19 Y. Han, D. Zhang, L. L. Chng, J. Sun, L. Zhao, X. Zou and J. Y. Ying, *Nat. Chem.* 2009, **1**, 123-127.
- 20 L. C. Johansson, A. B. Wöhri, G. Katona, S. Engstrom and R. Neutze, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2009, **19**, 372-378.
- 21 R. G. Laughlin, R. L. Munyon, Y.C.Fu and A. J. Fehl, *J. Phys. Chem.* 1990, **94**, 2546-2552.

# Supramolecular Assembling of a Cationic Synthetic Lipid in a Diluted Region

*Cláudia C. Medugno, Fred Yukio Fujiwara, Sonia C. N. Queiroz, Watson Loh*

## Table of Contents

1. Materials
2. NMR Method
3. Preparation and monitoring of ternary phase (H<sub>2</sub>O/DODAB/Pentanol)
4. Continuous dialysis of the Isotropic phase
5. Analysis carried out on the dialyzed liquid

1. Materials

Diocetadecyldimethylammonium bromide (DODAB), with purity (assayed by TLC) of 99.5% from Sigma Chemical Co. and spectroscopic grade (Merck) n-pentanol were used without further purification. Deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) was provided by *CIL*—Cambridge Isotope Laboratories, Inc., isotope D, 99 %, and Milli-Q® water was used in all sample preparations.

Dialysis bags, with an average width of 2.5 cm, were purchased from Sigma and retain proteins such as 90% cytochrome C (MW 12400) or higher. Glycerol was removed by washing the bags in running water for 3-4 hours, and then the dialysis bags were heated at 70 °C for 30 min in 200 mL of EDTA 10 mM and washed several times with Milli-Q® water.

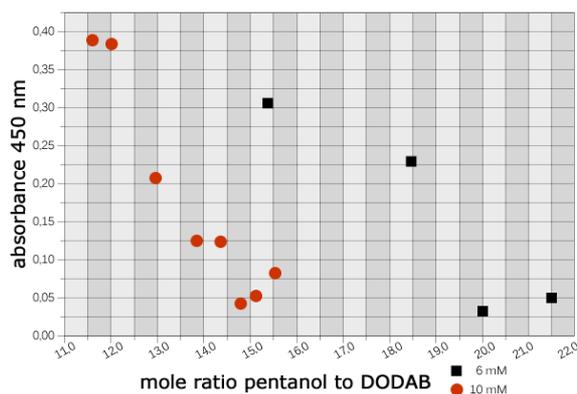
2. NMR Method

The <sup>1</sup>H NMR spectra were obtained on a Varian Inova spectrometer at 500 MHz in 5 mm sample tubes. The T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> measurements were obtained by the inversion-recovery and CPMG methods, respectively. The bipolar pulse stimulated echo (Dbppste) sequence supplied by Varian was used to measure the diffusion coefficient.

3. Preparation and monitoring of ternary phase (H<sub>2</sub>O/DODAB/Pentanol)

Large Unilamellar Vesicles (LUV) were prepared by mixing sufficient amounts of DODAB to 10 mM solutions in 25 mL of water in 50 mL Falcon tubes. The mixture was gently stirred at 65° C (above T<sub>m</sub>) for 1 h and then cooled to 30° C, the storage temperature. The ternary phase was prepared in the same way with pentanol addition.

All samples were prepared in a water-rich region (volume fraction of water > 99%) and phase behavior was determined by following the turbidity at 450 nm, with a Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS spectrometer. The transition from LUV dispersion (turbid) to a transparent phase can be visualized by the results shown in Fig. 1. One can notice that the turbidity decrease occurs at a small pentanol concentration for the system with less DODAB, indicating that the alcohol to lipid molar ratio needed for this transition lies within 12-16 (10 mM) and 17-22 (6 mM). Interestingly, in the optically isotropic samples, at temperature near 50-60 °C, tiny air bubbles were observed when this critical molar ratio is attained, probably as a consequence of the reduced interfacial tension of this system. Addition of excess pentanol leads to disruption of the isotropic phase which is accompanied by a turbidity increase (not shown). In this work, optically isotropic samples with 10 mM DODAB and pentanol were dialyzed after reaching 30 °C.



**Fig. 1:** The turbidity of solutions containing a constant amount of DODAB and varying amounts of pentanol.

#### 4. Continuous Dialysis of the Isotropic Phase

*Dialysis Equipment:* An approximately 8.0 cm length of dialysis bag was filled with at most 10 mL of freshly prepared  $L_3$  phase and both ends were carefully tied with multiple nodes of cotton thread. The dialysis bag was placed at the bottom of an Erlenmeyer flask which was maintained at 30°C. Water was forced with the aid of a peristaltic pump through a tube to the bottom of an Erlenmeyer with an average flow of 1 mL/min. Samples were collected from a glass tube connected to the top of the Erlenmeyer.

*Dialyses with  $D_2O$  for NMR measurements:* the dialysis was performed as routine and after removal of all pentanol, a continuous dialysis was carried out overnight to replace  $H_2O$  with  $D_2O$  in a sample of 1 mL.

#### 5. Analysis carried out on the dialyzed liquid

##### 5.1 Analysis for the presence of pentanol

Analysis of alcohols in aqueous samples was carried out by GC / FID in a Shimadzu GC-2010 equipment. A 10 mL volume sample was added to headspace vials (20 mL). Sealed bottles remained at 60 °C with stirring at 500 rpm for 30 minutes in an AOC-5000 Shimadzu (Combi Pal) auto injector. 1 mL samples were injected into a Gas Chromatograph with FID detector (Flame Ionization Detector). Conditions of GC / FID: Column DB-624 30.0 mx0.250 mmx1.4  $\mu$ M J & W Scientific Column; flow: 1.0 mL / min; Oven: 40 °C for 3 minutes - 5 °C / min up to 180 °C hold for 3 minutes - 15 °C / min up to 200 °C for 3 minutes. Injection Mode: Split Ratio was about 1:30; Injector temperatures: 200 °C; Detector temperature: 230 °C; Gas Detector:  $H_2$  40 mL/min and synthetic air 400 mL/min.

Calibration: 50  $\mu$ L of methanol, ethanol, n-propanol, butanol, and pentanol were added to a 20 mL flask. A sample with 10 mL was added to the headspace vial. According to the manufacturer's information, the limit of detection for pentanol with this technique is estimated at 0.00005%.

No sign of pentanol was observed after overnight continuous dialysis. Additionally, no sign of pentanol appears after submitting the dialyzed mixture to freezing and thawing cycles when the clear solution produces "solid-like pieces". No trace of pentanol could be detected in the  $^1H$  NMR spectrum after dialysis either, suggesting its practically complete removal.

After pentanol removal, samples of these dialyzed were stored at room temperature with no sign of turbidity developing even after 5 months. These samples undergo a phase separate upon cooling, as mentioned above, but heating/cooling cycles within 20-80 °C do not affect its appearance, nor, as discussed in more detail in the accompanying paper, its microstructure.

##### 5.2 Lipid Analysis

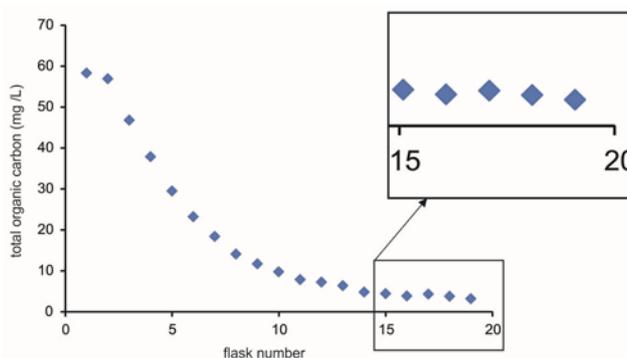
The bromide concentration in the completely dialyzed mixture was monitored by total organic carbon (TOC) analysis.

TOC-V CPN Shimadzu - Total carbon was determined through a catalytic oxidation at 68° C and all forms of carbon were converted to CO<sub>2</sub> which was then detected by a cell of non-dispersive infrared (NDIR). The observed peak area is proportional to the concentration of Total Carbon in the sample, which is then quantified by interpolation of a previously determined calibration curve. Table 1 shows average recovery of DODAB in the dialyzate

**Table 1** -The average recovery of DODAB in the dialyzate was 92, 3 %.

Initial [DODAB] mM by weighing	[DODAB] mM by TOC after dialysis
2.9	2.83
2.9	2.63
3.2	2.84

### 5.3 Measurements in the liquid that comes out of the overall dialysis



**Fig. 2.** The total carbon content in the dialyzate of a 3 mL sample. The fractions were collected in 10 mL aliquots. After 7 h, the TOC was below 3.4 mg/L total organic carbon, indicating negligible pentanol content.