

Samosličnost molekuskoga organiziranja u dvoslojeve

Suzana Šegota ^{1*}, Nenad Jalšenjak ², Đurđica Težak ¹

¹ Institut Ruđer Bošković, Bijenička c. 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

² Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Autor za korespondenciju. E-pošta: ssegota@irb.hr

Izvorni znanstveni rad

UDK 544.432.2:544.77

Prispjelo: kolovoz 2010.

Asocijacija molekula površinski aktivnih tvari (PAT), rast i agregacija samoasocijata u lamelarne dvoslojeve (fleksibilne i zatvorene), micelle, vezikule i tekuće kristale, predstavljaju važna temeljna istraživanja s primjenom – između ostalog – na transmembranska svojstva vezikula u prijenosu i enkapsulaciji lijekova. Među mnogim praktičnim upotrebama amfifilni agregati predstavljaju mogućnost primjene dobro definiranih dvoslojeva i multislojeva liootropnih mezofaza za kozmetičku i farmaceutsku industriju. Asocijati katanionskih PAT pokazuju široku raznovrsnost oblika, veličina i strukture čestica pa je moguće proizvesti nove materijale različitih svojstava. Vezikule mogu nastajati spontano kao rezultat samo-nakupljanja fleksibilnih monoslojeva u jednoslojne i višeslojne meke čestice sa zatvorenim dvoslojevima. U ovom radu istraživanja su provedena u katanionskim smjesama natrijevoga n-dodecilbenzensulfonata (SDBS) i didodecildimetil amonijevoga bromida (DDAB) u vodi te u vodenim otopinama neionskoga dvolančanog PAT, 4-(1-pentilheptil)benzensulfonata (6SDBS). Određivanje faznoga dijagrama, područja stvaranja micela i vezikula te faznih prijelaza, određivanje unutarnjih i vanjskih struktura čestica, provedeno je s pomoću metode raspršenja svjetlosti, raspršenja X-zraka pod malim kutom te drugih komplementarnih metoda, npr. reoloških mjerenja u pseudo-izotropnim područjima koja dobro indiciraju stvaranje micela i vezikula karakterizirano kritičnim micelizacijskim i vezikularnim koncentracijama. Dodatno, mezofaze su istraživane polarizacijskom i elektronskom mikroskopijom.

Ključne riječi: Agregacija; Asocijacija; Katanionske površinski aktivne tvari; Površinski aktivne tvari - kemijske, klasifikacija; Raspršenje svjetlosti; Micelle; Samosličnost; Raspršenje-difrakcija X-zraka; Vezikule

UVOD

Istraživanje dinamike nastajanja i ravnotežnih struktura vezikula i liposoma u otopinama, transformacija faza te njihove strukture, temeljni su procesi u biomedicini. Treba istaknuti da je polje istraživanja vezikula i liposoma golemo i brzo se razvija.

Struktura i geometrija molekule može se smatrati presudnim faktorom pri stvaranju vezikularnih asocijata pa se zato i istražuju modelni sustavi, koji se mogu korelirati s biološki važnim molekulama. U ovisnosti o strukturi molekule u vodenoj otopini PAT osim sfernih oblika nastaju micelle različitih oblika (sferoidne, cilindrične, crvolike), otvoreni i zatvoreni (vezikule) dvosloji, koji mogu biti jednoslojni i višeslojni (1). Karakteristika vodenih otopina smjesa ionskih PAT suprotnoga naboja spontano je nastajanje vezikula, ali ovisno o ukupnoj koncentraciji i omjeru suprotno nabijenih PAT nastaju miješane micelle, miješane vezikule (2), slijepljivanje vezikula, stabilne višelamelarne vezikule u smjesi amfifila i kosurfaktanta (3) i nova, katanionska PAT. Novi je spoj slabo topljiv i taloži kod niskih koncentracija.

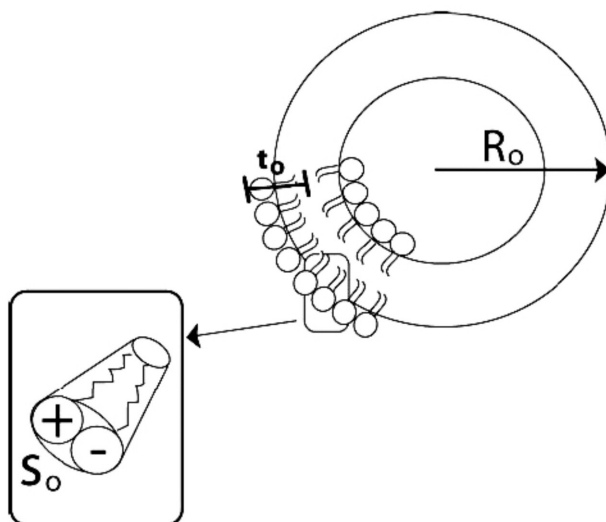
Prijelaz vezikula/micela induciran je odnosom miješanja surfaktanata. Temperaturno i koncentracijsko djelovanje na prijelaze micela/vezikula praćeno je pri prijelazima izotropna otopina → lamelarna disperzija koja sadrži male unilame-

larne vezikule (4). Svojstva takvih agregata, te usto smanjenje toksičnosti, ako se ona uspoređuje s ostalim konvencionalnim sustavima, čini ih pogodnim kandidatima za in vivo primjene i moguće korištenje u prijenosu lijekova u genskoj terapiji (5). Strukturna sličnost vezikula s biološkim stanicama čini vezikularne faze korisnima kao modele za biološke membrane i nosače za prenošenje lijekova, odnosno nanopregrade za nastajanje biomaterijala (6,7,8). Modelni sustavi permeabilnih bioloških membrana u koje se ugrađuju različiti lijekovi (9), liposomalna enkapsulacija (10), kao i nastajanje stanica i fluktuacije njihovih oblika (11), istražuju se intenzivno s naglaskom na zainteresiranost farmaceutske i kozmetičke industrije. Ako lijek može biti smješten u vezikulu, može se kontrolirati njegovo djelovanje na određenom mjestu u tijelu. Osim toga, proizvodnja ultra-finih vezikula korisna je za membranske mikro-reatore (12,13).

Molekule koje tvore vezikule

S obzirom na molekularnu strukturu mogu se razlikovati nekoliko glavnih vrsta molekula koje tvore vezikule (14), odnosno liposome ako se radi o lipidnim molekulama:

- vezikule koje se stvaraju iz vodenih disperzija fosfolipida ili njihovih smjesa koje se nazivaju liposomi ili lipidne vezikule (15)



SLIKA 1.

Shematski prikaz geometrijskih parametara vezikule: R_0 je radijus vanjskoga sloja vezikule, t_0 debljina vanjskoga sloja, S_0 vanjska površina hidrofilne skupine molekule.

FIGURE 1

Schematic presentation of the geometric parameters of the vesicle: R_0 is the radius of the vesicle outer layer; t_0 is the outer layer thickness; S_0 stands for the outer surface area.

- vezikule iz glikolipida koje su uglavnom prirodni ekstrakti (20), a postoje i sintetični glikolipidi (16,17,18,19). Glikolipidi su jedna od glavnih komponenti stanične membrane (20) i predstavljaju ključ za arhiviranje primjene glikolipida u sustavima prijenosa lijekova (21), a postoje i drugi biotehnoški aspekti
- vezikule iz dvolančanih dialkildimetilamonijevih PAT s hidroksidnim, acetatnim ili halidnim protuionima (22,23,24,25,26)
- vezikule stvorene u vodenim smjesama suprotno nabijenih ionskih PAT s jednim ili više repova, nazvane katanionske vezikule (18,27,28,29,30)
- vezikule stvorene u višekomponentnim sustavima koji sadrže neionski PAT/ kosurfaktant/vodu (ponekad morsku vodu) i konstituiraju grupu PAT vezikula s ugrađenim polimerima koji utječu na porast njihove termodinamičke stabilnosti kao i postizanje monodisperzne populacije vezikula (14,31,32).

O spontanom nastajanju vezikula može se detaljnije pročitati u preglednom radu (33).

Koncept molekularnoga parametra pakiranja

Samo-asocijacija amfifilnih molekula u otopini spontano je i termodinamički uvjetovana te ovisi o strukturi molekule. Ti su fenomeni opisani parametrom molekularnoga pakiranja, koji su uveli Israelachvili, Mitchell i Ninham (34,35). Pomoću koncepta, koji se bazira na geometrijskim razmatranjima, moguće je pretpostaviti oblik i veličinu ravnotežnih asocijata. Oblici spontano nastalih asocijacijskih koloida mogu se pretpostaviti računajući s tri nominalna geometrijska parametra amfifilne molekule:

- površina polarne glave, a
- volumen repa, v
- duljina lanca, l .

Parametar pakiranja, p , definira se kao omjer volumena hidrofobnoga dijela molekule PAT (ugljkovodičnoga repa) u jezgri (v_c) i produkta optimalne površine hidrofilne skupine (a_h) i kritične duljine lanca u repu (l_c) (efektivna duljina ugljkovodičnoga lanca u tekućini):

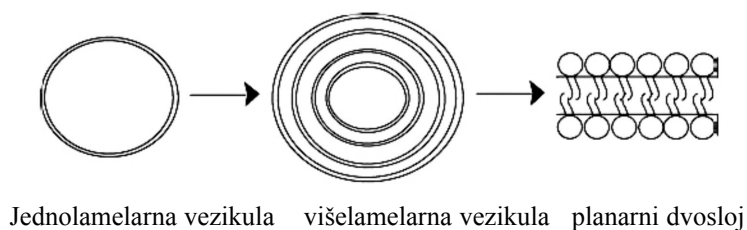
$$p = v_c / a_h l_c \quad (1)$$

Iz tako izračunatoga parametra pakiranja moguće je pretpostaviti najvjerojatniji oblik asocijata u katanionskoj smjesi (36). Dodatno su značajni faktori u pretpostavljanju struktura asocijata temperatura, ionska jakost i pH. Molekularni klasteri asocijacijskih koloida mogu se formirati kao micelle, obrnute micelle, dvoslojevi – lamele, vezikule, liposomi, tekući kristali, mikroemulzije (37,38). Na međupovršinama zrak/voda, molekule PAT stvaraju monoslojeve zbog specifične adsorpcije na međupovršini. Koloidne strukture nastale u vodenim otopinama PAT pokazuju fizička, ali ne kemijska međudjelovanja molekula.

Interpretacija za vezikule složenija je nego za micelle jer vezikule imaju vanjski i unutarnji sloj. Geometrijski parametri vezikule prikazani su na slici 1.

Za vezikulu koja ima N_0 molekula, volumen vanjskoga sloja, V_0 , i vanjska površina hidrofilne skupine molekule, S_0 , dani su izrazima:

$$V_0 = N_0 v_c = \frac{4}{3} \pi [R_0^3 - (R_0 - t_0)^3] \quad (2)$$

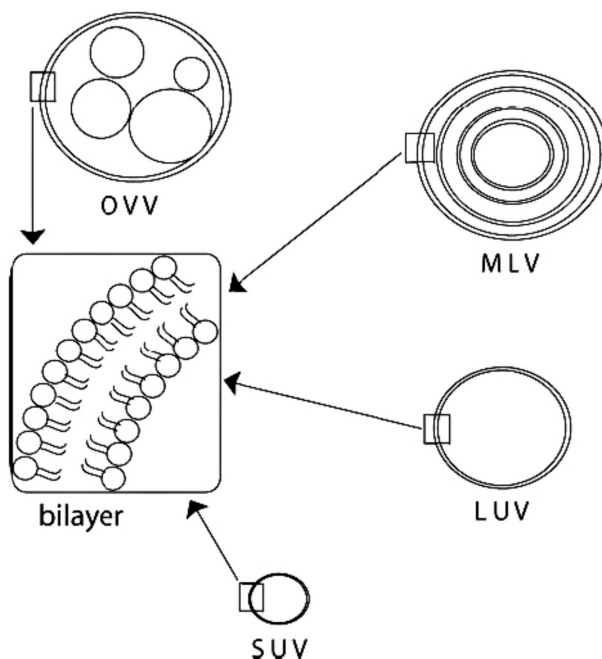


SLIKA 2.

Strukturni prijelazi uzrokovani rastućom koncentracijom shematski prikazuju:
 jednolamelarna vezikula → višelamelarna vezikula → planarni dvosloj.

FIGURE 2.

Structure transitions with increasing concentration schematically represent
 unilamellar vesicles → multilamellar vesicles → planar bilayers.



SLIKA 3.

Shematski prikaz vezikularnih struktura koje pokazuju oblik, veličinu i broj dvoslojeva; SUV = mala jednolamelarna vezikula, LUV = velika jednolamelarna vezikula, MLV = višelamelarna vezikula, OVV = oligovezikularna vezikula.

FIGURE 3

Schematic presentation of vesicle structures with respect to the shape, size and number of bilayers; SUV=small unilamellar vesicle, LUV=large unilamellar vesicle, MLV=multilamellar vesicle, OVV=oligovesicular vesicle.

$$S_0 = 4\pi R_0^2 \quad (3)$$

Strukturni prijelazi s rastućom koncentracijom PAT shematski su prikazani na slici 2.

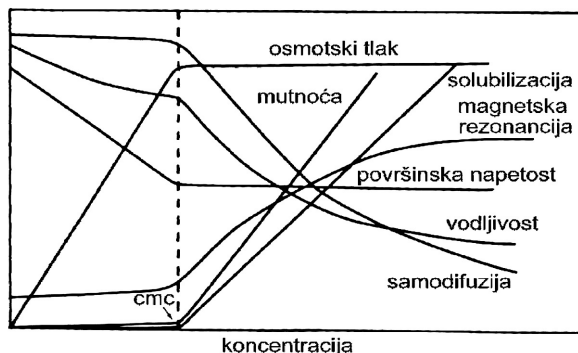
Iz toga izlazi da je aktualna površina jedne hidrofilne skupine, a , dana izrazom:

$$a = \frac{4\pi R_0^2}{N_0} = \frac{3v_c R_0^2}{[R_0^3 - (R_0 - t_0)^3]} \quad (4)$$

pa jednadžba (4) daje površinu kao funkciju dužine lanca, parametra pakiranja, vanjskoga radijusa vezikule, debljine vanjskoga sloja i vanjske površine pojedine molekule.

Na slici 3. shematski su prikazani različiti strukturni oblici vezikula. Skoro planarni dvosloj vrlo male zakrivljenosti tvori veliku jednolamelarnu vezikulu, koja je definirana produktom $cL < 1$, gdje je c zakrivljenost vezikule, a L maksimalna dimenzija amfifilne molekule. Faza koja sadrži takve jednolamelarne vezikule nastaje iz izotropne otopine i označava se kao L_4 faza, dok u visokim koncentracijskim područjima mogu nastati gelovi.

Jednolamelarne vezikule sastoje se od jednoga dvosloja i mogu biti raznih veličina: male jednolamelarne vezikule,



SLIKA 4.

Shematski prikaz ovisnosti nekih fizikalno-kemijskih svojstava otopina PAT o njihovoj koncentraciji. Dijagram konstruiran prema: Lindman B. i Wennerström H., *Topics in Current Chemistry*, 1980.

FIGURE 4

Schematic presentation of the dependence of some physico-chemical properties in surfactant solutions on their concentration. Diagram based on: Lindman B. and Wennerström H., *Topics in Current Chemistry*, 1980.

SUV, $r = 4-20$ nm, velike jednolamelarne vezikule, LUV, $r = 50$ nm-10 μ , kao i goleme jednolamelarne vezikule, GUV, $r > 10$ μ (39).

Oligovezikularne vezikule, OVV, pokazuju strukture s malim ugrađenim vezikulama u jednu veću. Zakrivljenost dvosloja može se mijenjati pod utjecajem kontroliranoga bubrenja, temperature i promjene pritiska (mehaničkoga, električkoga ili magnetskoga smicanja), dodatka raznih kosurfaktanata pa tako stvarati promijenjene vezikularne oblike.

Goleme jednolamelarne vezikule imaju savršen sferoidan oblik s velikom unutarnjom vodenom jezgrom. Fluktuirajući oblici mogu varirati od sferoidnih do tubularnih, tvoreći primjerke morske zvijezde, stomatocita, diskocita i druge (40,41,42,43).

Višelamelarne vezikule, MLV, koje su građene od fosfolipidnih molekula (liposomi) sastoje se od mnogo koncentričnih ljuski, strukturno sličnih luku, pa se zato takve faze nazivaju "faze luka" (44,45,46). Dok su jednolamelarne vezikule opažene redovito u razrijeđenim otopinama PAT, MLV su obično nađene u koncentriranim sustavima.

Asocijacijom amfifila i nastajanjem primarnih asocijata kod kritične koncentracije, karakteristične za svaku PAT, dolazi do promjena fizičko-kemijskih svojstava sustava. Metode određivanja kritičnih micelizacijskih koncentracija (cmc) prikazane su na shematskom dijagramu slike 4. Na isti se način mogu odrediti kritične vezikularne koncentracije (cvc). Iz konduktometrijskih podataka razvijena je i jednostavna metoda za određivanje agregacijskoga broja i s tim u svezi parametar vezanja protuiona na površini (47). Dodatno, primjena predložene metode ne zahtijeva poznavanje vrijednosti cmc.

Mjerenjem površinske napetosti jednokomponentne otopine (PAT + voda), osim kritičnih koncentracija, određuje se

površinska koncentracija PAT (Γ_{max}) i najmanja površina koju zauzima polarna skupina molekule (A_{min}) prema jednadžbama:

$$\Gamma_{max} = 1/2 \times 1/n \times 2,303 RT (-d\gamma/d \ln c)_T \quad (5)$$

$$A_{min} = 1 / N\Gamma_{max} \quad (6)$$

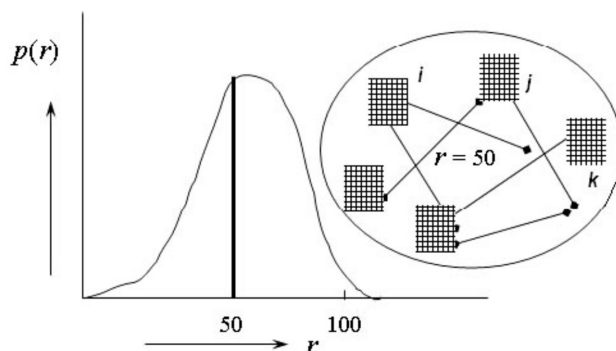
gdje je N Avogadrov broj, R plinska konstanta (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹), n je broj čestica (iona PAT i protuiona) po svakoj molekuli PAT čija se površinska koncentracija mijenja s promjenom koncentracije u otopini, γ površinska napetost i $(d\gamma/d \ln c)_T$ je nagib u dijagramu ' γ vs. $\ln c$ ' upravo ispod cmc pri konstantnoj temperaturi.

Intenzitet raspršenja

Metode koje daju podatke o veličini, disperzitetu, unutarnjoj i vanjskoj strukturi čestica u mediju jesu raspršenje svjetla (dinamičko, DLS i statičko, SLS), raspršenje X-zraka pod malim kutovima (SAXS) i raspršenje neutrona pod malim kutovima (SANS). Brzina kojom čestice difundiraju u otopini ovisi o njihovoj veličini i obliku pa je difuzijska konstanta povezana s hidrodinamičkim radijusom čestice.

Definicija funkcije raspodjele udaljenosti $p(r)$

Funkcija raspodjele udaljenosti, $p(r)$, može se karakterizirati kao histogram udaljenosti čestica u mediju kao na slici 5. Povezana je s mjerljivim intenzitetom raspršenja i daje broj različitih elektronskih parova s različitim udaljenostima između r i $(r+dr)$ unutar čestice. Za homogene čestice s konstantnom elektronskom gustoćom $p(r)$ funkcija ima geometrijsku definiciju. Čestica se podijeli u velik broj identičnih malih volumih elemenata (i, j, k, \dots). Funkcija $p(r)$ proporcionalna je broju linija duljine raspona između r i $(r+dr)$ koje su nađene u kombinaciji bilo kojeg volumnoga elemen-



SLIKA 5.

$p(r)$ funkcija u ovisnosti o radijusu čestice.

FIGURE 5

$p(r)$ function in dependence on the particle radius.

ta i s bilo kojim volumnim elementom k . Za $r = 0$ ne postoji drugi volumni element pa $p(r)$ mora biti jednaka 0. S porastom udaljenosti $p(r)$ funkcija raste, a broj mogućih susjednih volumnih elemenata proporcionalan je površini sfere radijusa r . Funkcija pada na 0 za sve vrijednosti $r > D$ pri čemu je D maksimalna dimenzija čestice.

Biološke makromolekule obično pokazuju tvorbu monodisperznih čestica iste veličine, oblika i unutarnje strukture. Čestice se mogu opisati parametrima određenim iz funkcije raspšenja. Funkcije raspdjelje udaljenosti $p(r)$ omogućuju jednostavnu interpretaciju svojstava čestica.

Određivanje fraktalne dimenzije

Osim mase agregata nameće se pitanje i dimenzije masenih čestica, tj. raspdjela masa unutar agregata. Područje unutar kugle agregata ne mora biti kompaktno popunjeno česticama pa sadrži prazan prostor pri čemu će masa agregata biti manja od mase kompaktne čestice. Metoda raspšenja omogućava računanje *masene fraktalne dimenzije* ili *vektora raspšenja*, q , (često se ova veličina naziva d_f) iz funkcija ovisnosti intenziteta raspšenja o vektoru raspšenja čija je veličina jednaka:

$$q = 4 \pi n / \lambda \sin (\theta/2) \quad (7)$$

gdje je q vektor raspšenja, n indeks loma otapala, λ valna duljina upadnoga zračenja i θ kut raspšenja.

Fraktalni objekti često se nazivaju samosličnim objektima. To je svojstvo kojim se opisuje sustav koji može biti rastavljen na dijelove, geometrijski slične cijelomu sustavu.

Fraktalna dimenzija jedna je od najvažnijih karakteristika fraktala i može se odrediti metodama SLS, SAXS i SANS.

EKSPERIMENTALNE METODE

Materijali

Analitički čiste kemikalije dobivene su kako slijedi: didodecildimetilamonijev bromid (DDAB) 99% čistoće od Acros Organics, SAD, natrijev n-dodecilbenzensulfonat (SDBS) 99% čistoće od Tokyo Kasei Co., Japan, 4-(1-pentilheptil)benzensulfonat (6SDBS) od Henkel Co., Njemačka. Kemikalije su korištene bez daljnega pročišćavanja. Svi su uzorci pripremani s redestiliranom vodom. Sva mjerenja provedena su pri radnoj temperaturi $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

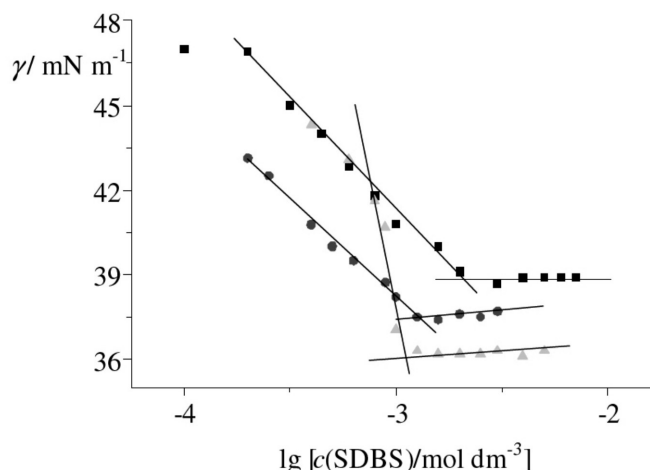
Metode

Procesi asocijacije molekula u otopini, tj. vrijednosti kritične micelizacijske i kritične vezikularne koncentracije određene su konduktometrijski.

Vanjska i unutarnja struktura amfifilnih klastera kao samosličnih objekata, istraživane su s pomoću tehnika statičkoga (SLS) i dinamičkoga raspšenja svjetla (DLS) (48) te raspšenja X-zraka pod malim kutom (SAXS). Micelarna masa i oblik micela, radijusi giracije, srednji radiusi molekularnih klastera, debljine lamelarnih dvoslojeva određeni su korištenjem ' $p(r)$ vs. r^6 ' funkcija.

Raspšenje svjetla provedeno je na Brookhaven BI-2000SM fotometru s laserskim izvorom valne duljine $\lambda = 514,3$. Mjerljivo područje vektora raspšenja bilo je $2,83 \times 10^{-3} \sqrt{\leq 3,20 \times 10^{-2} (q/\text{nm}^{-1})}$. Uzorci su bili uravnoteženi tjedan dana prije mjerenja raspšenja svjetla i zatim mjereni pri kutu raspšenja 90° .

Elastično raspšenje X-zraka pri malim kutovima korišteno je za istraživanje koloidnih sustava veličina čestica 1-100 nm i mjereno Kratky Compact kamerom (Anton Paar KG, Graz, Austrija) s Göbelovim zrcalom. Primarni intenzitet rentgenske cijevi (Philips PW 2253) s Cu-anodom ($U = 50\text{kV}$ i $I = 50\text{ mA}$) podešen je na 10^7 impuls $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Intenzitet raspšenja mjereno je u ovisnosti o kutu raspšenja. Intenzitetne funkcije dobivene su s pomoću indirektna Fourierove transformacije (Indirect Fourier Transformation, IFT).



SLIKA 6.

Površinska napetost (γ) vodene otopine SDBS u ovisnosti o logaritmu koncentracije SDBS (■), katanionske smjese SDBS/DDAB/H₂O uz $c(\text{DDAB}) = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (●) i iste katanionske smjese uz $c(\text{DDAB}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (▲). Pravci su određeni linearnom regresijom.

FIGURE 6

Surface tension (γ) of aqueous solution of SDBS in dependence of logarithm concentration of SDBS (■), and of cationic mixture of SDBS/DDAB/H₂O, $c(\text{DDAB}) = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (●), and $c(\text{DDAB}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (▲). Lines are determined by linear regression.

Strukture mekih čestica i lamelarnih faza tekućih kristala određene su s pomoću polarizacijske mikroskopije (LM), transmisijске elektronske mikroskopije ledenoga loma (FFTEM) i kriotransmisijске elektronske mikroskopije (Cryo-TEM).

REZULTATI

Istraživanje pojava micela i vezikula prikazano je na uzorcima binarnoga sustava dvolančane ionske PAT 6SDBS/H₂O i ternarnog sustava SDBS/DDAB/H₂O.

Micela i vezikule u katanionskoj smjesi SDBS/DDAB/H₂O

Spontano formiranje vezikula istraživano je u katanionskim smjesama SDBS i DDAB u vodi.

Utjecaj kationske PAT DDAB na površinsku napetost vodene otopine anionske PAT pri dvije stalne koncentracije DDAB i promjenljivoj koncentraciji SDBS prikazan je na slici 6.

Konduktometrijska mjerenja indicirala su proces micelizacije u čistim otopinama SDBS-a, kao i u otopinama SDBS-a uz malu količinu DDAB-a.

Suprotno su tome otopine DDAB-a sa SDBS-om ili bez SDBS-a pokazale dva strukturna prijelaza koji pripadaju nastajanju vezikula. Prvi prijelaz pokazuje kritičnu vezikularnu koncentraciju (cvc_1), dok je drugi pripisan procesu rasta vezikularnih agregata od jednolamelarnih do višelamelarnih vezikula (cvc_2). Prethodna faza vezikulama su koacervati.

Micela su karakterizirane kritičnim micelizacijskim, odnosno kritičnim vezikularnim koncentracijama, micelarnom masom

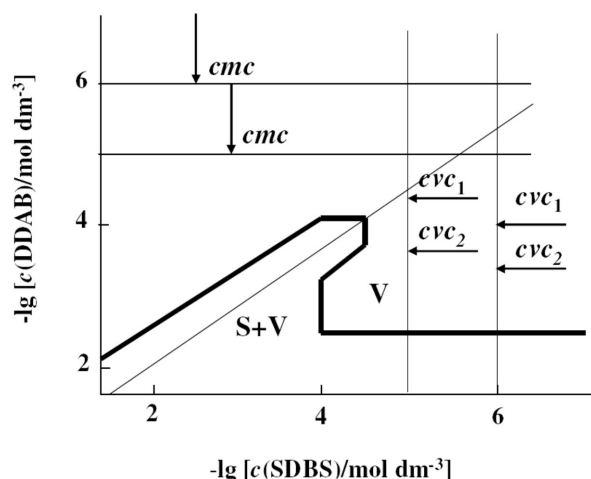
i oblikom, radijusima giracije, srednjim radijusima molekularnih klastera, debljinom lamelarnih dvosloja koristeći ' $p(r)$ ' vs. ' r^4 ' funkcije, fraktalnu dimenziju mekih čestica (micela, vezikula) i teksturu liotropnih faza tekućih kristala.

Na slici 7. prikazan je taložni dijagram katanionske smjese SDBS/DDAB/H₂O s područjima stvaranja vezikula (V) i mješavine čvrste faze i vezikula (S+V). Koacervati se stvaraju u koncentracijskom području suviška DDAB – manjem od koncentracija izlučivanja S+V.

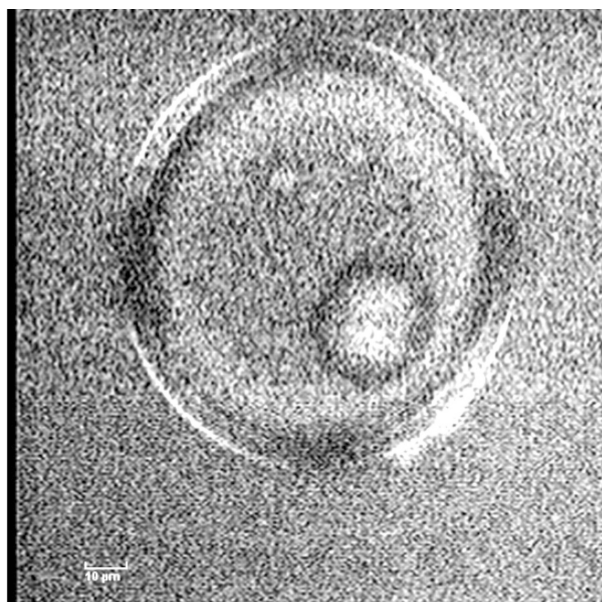
Granice odvajanja heterogene faze iz otopine nalaze se u višim koncentracijskim područjima katanionske smjese obje PAT, dok se u područjima razrijeđenih otopina sa suviškom SDBS-a stvaraju miješane micela kao i dva vezikularna oblika u koncentracijama suviška DDAB-a. Vrijednosti su sljedeće:

- kritične micelizacijske koncentracije u području suviška SDBS-a uz
 $[\text{DDAB}] = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $cmc = (1,8 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
 $[\text{DDAB}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $cmc = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
- kritične vezikulizacijske koncentracije u području suviška DDAB-a uz
 $[\text{SDBS}] = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $cvc_1 = (1,1 \pm 0,8) \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
 $cvc_2 = (5,8 \pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
 $[\text{SDBS}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $cvc_1 = (5,5 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$
 $cvc_2 = (1,9 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Na temelju molekularne strukture SDBS-a molekularno-mehaničkim proračunima izračunata je nominalna površina polarne skupine molekule SDBS-a i iznosi $A = 0,683 \text{ nm}^2$. Ta je vrijednost u skladu s eksperimentalno određenom vrijed-



SLIKA 7.
 Taložni dijagram smjese SDBS/DDAB/H₂O.
 FIGURE 7.
 Precipitation diagram of the mixture SDBS/DDAB/H₂O.



SLIKA 8.
 Optička mikrografija katanionske smjese SDBS/DDAB/H₂O ($\omega_{uk} = 0,003$, $x(\text{SDBS}) = 0,4$).
 Polarizirano svjetlo, bar = 10 μm .
 FIGURE 8
 Optical micrograph of the cationic mixture of SDBS/DDAB/H₂O ($\omega_{uk} = 0,003$, $x(\text{SDBS}) = 0,4$).
 Polarised light, bar = 10 μm .

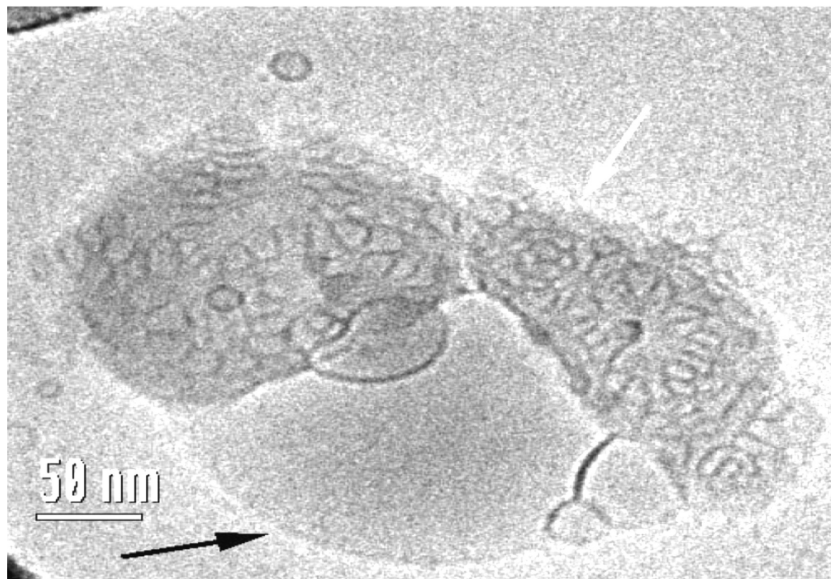
nošću za minimalnu površinu polarne skupine $A_{\min} = 0,689$ nm² te s literaturnom vrijednošću $A_{\min} = 0,690$ nm² (11). Maksimalna površinska koncentracija PAT $\Gamma_{\max}(\text{SDBS}) = (2,41 \pm 0,55) \times 10^{-6}$ mol m⁻³. Dijametar micela SDBS-a iznosi 6 nm.

Iz funkcije raspodjele udaljenosti, $p(r)$, u ovisnosti o radijusu određena je struktura vezikula u smjesi maksimalne debljine dvosloja 3 nm. SAXS eksperimenti potvrdili su rezultate DLS eksperimenata o prisutnosti jednododalne populacije

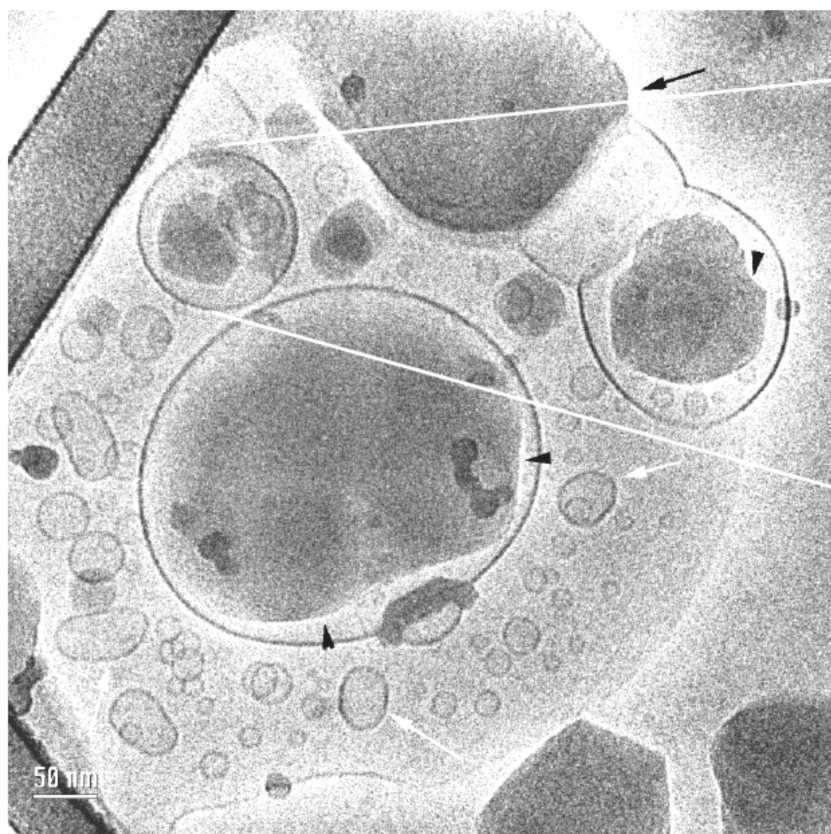
vezikula čija je veličina unutar raspona 23-37 nm.

Primjer oligovezikularne vezikule u katanionskoj smjesi DDAB/SDBS/H₂O na slici 8. (48) prikazuje ugrađene vezikule unutar velike vezikule kojoj su na površini adsorbirani tekući kristali (svjetleći dio na dvosloju). Disperzije vezikula u rasponu su veličina 20-200 nm.

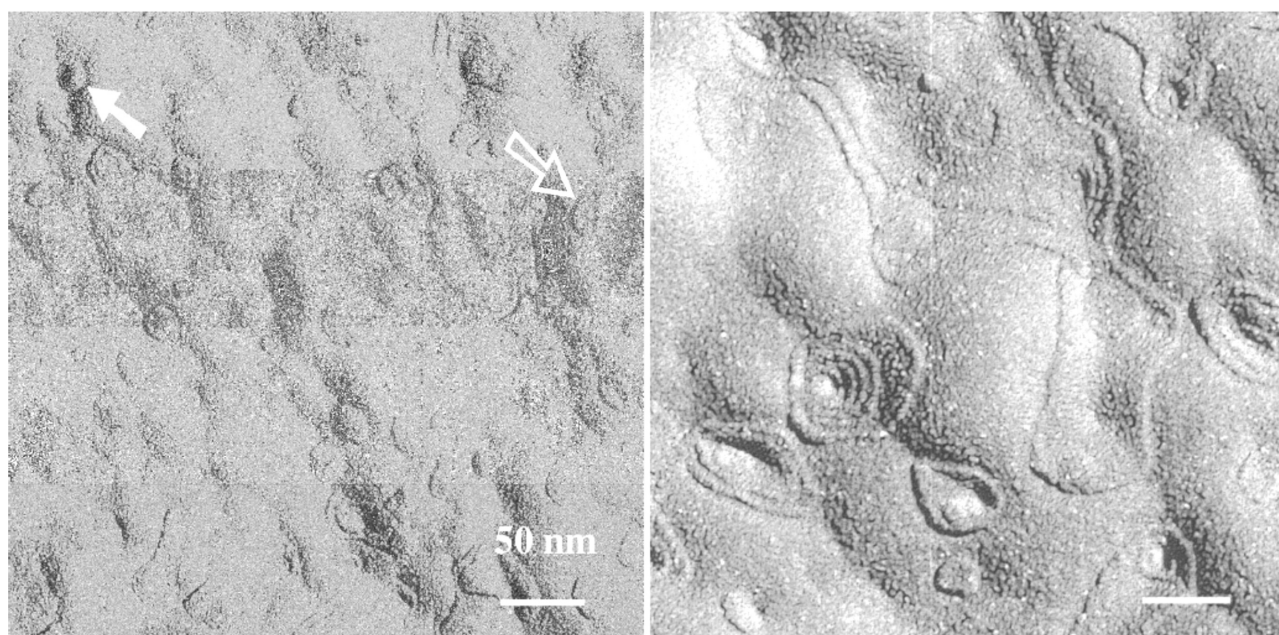
Mikrografije kriotransmisijske elektronske mikroskopije katanionske smjese SDBS/DDAB/H₂O s masenim udjelom



SLIKA 9.
Cryo-TEM mikrografija s vezikulom i fazom tekućih kristala.
FIGURE 9.
Cryo-TEM micrograph with vesicle and liquid crystal phase.



SLIKA 10.
Cryo-TEM mikrografija s vezikulama i kristalima. Mala slika obrubljena bijelim, strelicama prikazuje uvećani dio kompleksne strukture oligovezikularne vezikule s kristalom.
FIGURE 10
Cryo-TEM micrograph with vesicles and crystals. Small picture on the right-hand side within white arrows represents magnified part of the complex structure of oligovesicular vesicle with a crystal.

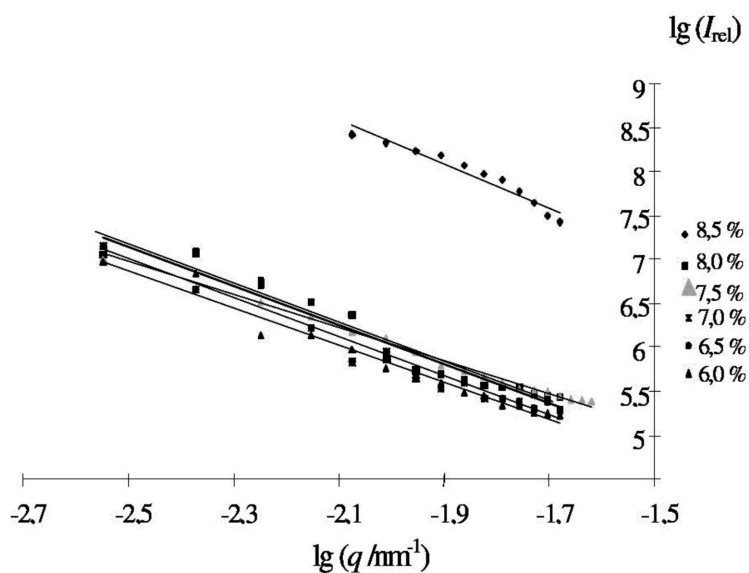


SLIKA 11.

FFTEM mikrografije 6,0 tež.% 6SDBS-a: na slici lijevo vidi se veliki broj oblatnih micela; neke su orijentirane okomito na reznju plohu (krugovi) - označene punom strelicom i neke leže svojom duljom osi u reznju plohi (elipse) - označene praznom strelicom te se vidi i poneki fleksibilan dvosloj; na slici desno prevladavaju fleksibilni dvoslojevi s tendencijom umotavanja u vezikule.

FIGURE 11.

FFTEM images of 6,0 wt.% 6SDBS on the left-hand side a great number of oblate micelles; some micelles are oriented perpendicularly to the cutting plane (circles) denoted by filled arrow, and some are lying by a longer axes in the cutting plane (ellipses) denoted by stroked arrow, and some flexible bilayer. In the right-hand side figure the spontaneous formation of vesicles from the flexible bilayers can be observed in the specimen.

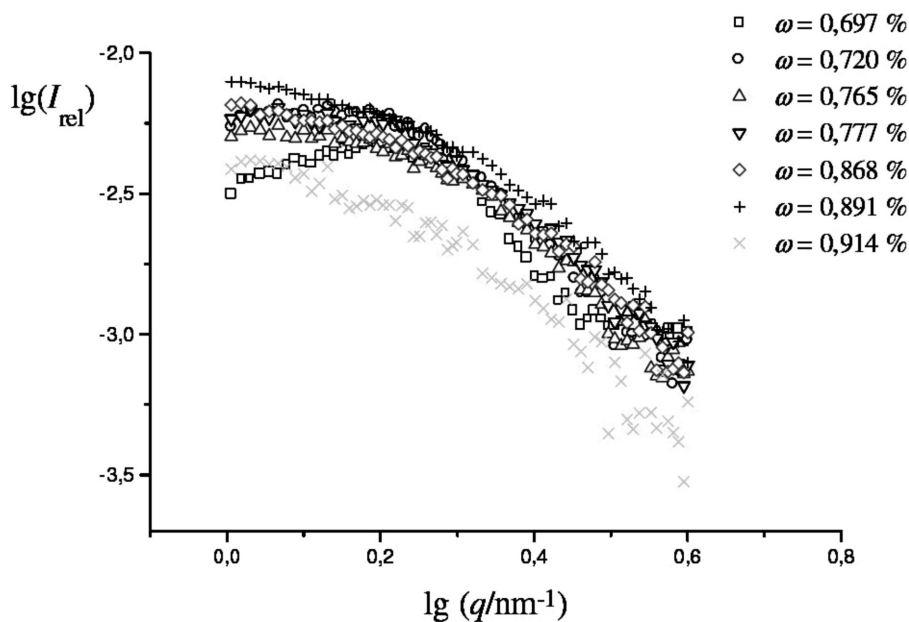


SLIKA 12.

Ovisnost intenziteta raspršenoga svjetla o vektoru raspršenja u vodenim otopinama 6SDBS.

FIGURE 12

Intensity of scattered light vs. scattering vector in aqueous solutions of 6SDBS.



SLIKA 13.

Ovisnost intenziteta raspršenoga svjetla o vektoru raspršenja u katanionskim smjesama SDBS/DDAB/H₂O.

FIGURE 13

Intensity of scattered light vs. scattering vector in cationic mixtures of SDBS/DDAB/H₂O.

$\omega_{6SDBS}/\%$	D_m	R^2
6,0	2,11	0,9716
6,5	2,22	0,9529
7,0	1,92	0,9915
7,5	1,89	0,9920
8,0	2,23	0,9440
8,5	2,51	0,9409

TABLICA 1.

Masene fraktalne dimenzije D_m u otopinama 6SDBS-a.

TABLE 1

Mass fractal dimensions, D_m , in aqueous solutions of 6SDBS.

PAT $\omega_{uk} = 0,0075$ i množinskim udjelom PAT $x(SDBS) = 0,6$ prikazane su na slikama 9. i 10. (49). Na slici 9. vidi se koegzistencija struktura neuređene lamelarne faze (bijela strelica) prikvačene na vezikulu (crna strelica). Na slici 10. nalazimo vezikule i oligovezikularne vezikule (bijele strelice na lijevoj slici), kristalnu fazu u otopini (tamni oblici – pri dnu slike šesterokuti); jedan od kristala spojen je s vezikulom (crna strelica pri vrhu slike), a neki su kristali uhvaćeni u velike vezikule (na slici označeno s glavama strelica). Na povećanoj slici vidi se savršeni sferoidan oblik vezikule dijametra 120 nm s ugrađenim kristalom i oligovezikularnim vezikulama. Iz slika se može zaključiti o miješanoj fazi s koegzistirajućim oblicima čvrste faze i mekih čestica.

Struktura agregata dvolančanoag PAT u vodi

Nastajanje vrlo fleksibilnih dvoslojeva i micela i u području između micelarne i lamelarne faze skoro simetrične dvolančane ionske PAT natrijevoga 4-(1-pentilheptil)benzen-sulfonata, 6SDBS, u vodenoj otopini prikazano je na slici 11. (50). Veličina i oblik oblatnih micela određene su i jasno prikazani na snimkama transmisijske elektronske mikroskopije ledenoga loma. Veličina micela pri 6,0 tež.% iznosi 10 nm i povećava se s većim koncentracijama. Maksimalna dimenzija oblatnih micela određena SAXS-om iznosi 10-12 nm što odgovara veličinama 12-16 nm iz FFTEM mikrografija. Aksijalni odnos oblatnih micela približno je 2:1.

Određivanje samosličnosti amfifilne agregacije

LITERATURA

(a) prijelaz micela/lamelarni dvosloj, odnosno tekući kristal

Mjerenja statičkoga raspršenja svjetla provedena su u vodenim otopinama 6SDBS-a. Na slici 12. iz linearne ovisnosti intenziteta raspršenja prema vektoru raspršenja u vodenim otopinama unutar područja masene frakcije 6SDBS-a 5,0-8,0 tež.% koje predstavlja područje stvaranja diskolikih oblatnih micela, nagibi pravaca odgovaraju masenoj fraktalnoj dimenziji micela. Rezultati jasno pokazuju sasvim različite podatke za uzorak 8,5 tež.% zbog početka formiranja faze tekućih kristala.

Korelacijski faktori R^2 pri određivanju fraktalne dimenzije za razne masene frakcije PAT pokazuju visoku pouzdanost u određivanju. Za micela srednja je vrijednost fraktalne dimenzije 2,07 uz najviši korelacijski faktor te se povećava pri prijelazu prema lamelarnoj fazi i iznosi 2,51 (tablica 1.) uz smanjeni korelacijski faktor za maseni udjel već pri $\omega = 8,0$ tež.%. Približavanje masene fraktalne dimenzije graničnoj vrijednosti 3,0 pri prijelazu micela/lamelarni dvosloj odgovara većoj kompaktnosti lamelarne faze tekućega kristala u usporedbi s micelarnom fazom pa je zbog toga veća vrijednost fraktalne dimenzije.

(b) prijelaz micela/vezikula

Pri prijelazu micela/vezikula u sustavu SDBS/DDAB/H₂O nije se pokazala skokovita promjena fraktalne dimenzije (slika 13.), nego fraktalne dimenzije kontinuirano padaju tijekom prijelaza micela u vezikule što indicira sve rahlije strukture, kakve su vezikule u usporedbi s micelama. Odgovarajuće su vrijednosti fraktalnih dimenzija za micela (2,67±0,08) ($\omega = 0,696$ tež.%) do (2,16±0,09) ($\omega = 0,914$ tež.%) za vezikule.

U ovom prikazu izneseno je samo nekoliko primjera spontanog stvaranja micela, fleksibilnih dvosloja i vezikula te prijelaz u liotropne tekuće kristale. Parametri koji iniciraju stvaranje takvih struktura jesu prvenstveno promjena koncentracija pojedinih amfifila u vodi kao i odnos koncentracija njihovih smjesa, geometrija molekula i drugo. Fascinacija samoasocijacije amfifila, tekstura, struktura, oblika i veličina vezikula kao i velika važnost vezikula, posebno u bioznanostima, dobri su razlozi velikoga istraživačkog interesa za njihovo istraživanje.

1. Agarwal V, Singh M, McPherson G, Vijay J, Bose A. Microstructure evolution in aqueous solutions of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and phenol derivatives. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2006;281:246-53.
2. Fan Y, Cao M, Yuan G, Wang Y, Yan H, Han CC. Aggregation behavior in mixed system of double-chained anionic surfactant with single-chained nonionic surfactant in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci.* 2006;299:928-37.
3. Singh K, Marangoni DG, Quinn JG, Singer RD. Spontaneous vesicle formation with an ionic liquid amphiphile. *J Colloid Interface Sci.* 2009;335:105-11.
4. Silva BF, Marques EF, Olsson U. Unusual vesicle-micelle transitions in a salt-free cationic surfactant: temperature and concentration effects. *Langmuir.* 2008;24:46-10754.
5. Marques EF, Brito RO, Silva SG, Rodrigez-Borges JE, do Vale ML, Gomes P, Araujo MJ, Soderman O. Spontaneous vesicle formation in cationic mixtures of amino acid-based surfactants: chain length symmetry effects. *Langmuir.* 2008;24:11009-17.
6. Caillet C, Hebrant M, Tondre C. Sodium octyl sulfate/cetyltrimethylammonium bromide cationic vesicles: aggregate composition and probe encapsulation. *Langmuir.* 2000;16:9099-102.
7. Elena B, Olsson U, Ruso JM, Schulz PC, Prietoa G, Sarmiento F. Phase behavior of semifluorinated cationic mixtures: head group dependence and spontaneous formation of vesicles. *J Colloid Interface Sci.* 2009;331:522-31.
8. Fischer A, Hebrant M, Tondre C. Glucose encapsulation in cationic vesicles and kinetic study of the entrapment/release processes in the sodium dodecyl benzene sulfonate/cetyltrimethylammonium tosylate/water system. *J Colloid Interface Sci.* 2002;248:163-8.
9. Hammond K, Lyle IG, Jones MN. Vesicle interaction and forces between bilayers in phospholipid systems incorporating phosphatidylinositol. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp.* 1987;23:241-57.
10. Deshmukha DD, Ravis WR, Betageri GV. Improved delivery of cromolyn from oral proliposomal beads. *Int J Pharm.* 2008;358:128-36.
11. Saiyad AH, Bhat SGT, Rakshit AK. Physicochemical properties of mixed surfactant systems: sodium dodecyl benzene sulfonate with triton X-100. *Colloid Polym Sci.* 1998;276:913-19.
12. Bhandarkar S, Bose A. Synthesis of submicrometer crystals of aluminum-oxide by aqueous intravesicular precipitation. *J Colloid Interface Sci.* 1990;135:531-8.
13. Kölchens S, Ramaswami V, Birgenheier J, Nett L, O'Brien DF. Quasi-elastic light-scattering determination of the size distribution of extruded vesicles. *Chem Phys Lip.* 1993;64:1-10.
14. Ma G, Cheng Q. Vesicular polydiacetylene sensor for colorimetric signaling of bacterial pore-forming toxin. *Langmuir.* 2005;21:6123-6.
15. Hauser H, Gains N, Müller M. Vesiculation of unsonicated phospholipid dispersions containing phosphatidic-acid by pH adjustment - physicochemical properties of the resulting unilamellar vesicles. *Biochemistry.* 1983;22:4775-81.
16. Baba T, Minamikawa H, Hato M, Motoki A, Hirano M, Zhou D, Kawasaki K. Synthetic phytanyl-chained glycolipid vesicle membrane as a novel matrix for functional reconstitution of cyanobacterial photosystem II complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265:734-8.
17. Polidoria A, Puccia B, Zarif L, Lacombea JM, Riess JG, Pavia AA. Vesicles and other supramolecular systems made from double-tailed synthetic glycolipids derived from galactosylated trihydroxymethylaminomethane. *Chem Phys Lip.* 1995;77:225-51.
18. Vautrin C, Zemb T, Schneider M, Tanaka M. Balance of pH and ionic strength influences on chain melting transition in cationic vesicles. *J Phys Chem B.* 2004;108: 7986-91.
19. Zheng LQ, Shui LI, Shen Q, Li GZ, Baba T, Minamikawa H, Hato M. pH and salt-induced reversible aggregation of nonionic synthetic glycolipid vesicles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2002;207:215-21.

20. Sundler R. Studies on the effective size of phospholipid headgroups in bilayer vesicles using lectin-glycolipid interaction as a steric probe. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1984;771:59-67.
21. Lasić DD. *Liposomes: from physics to applications.* Amsterdam: Elsevier; 1993.
22. Bumajdad A, Eastoe J, Griffiths P, Steytler DC, Heenan RK, Lu JR, Timminset P. Interfacial compositions and phase structures in mixed surfactant microemulsions. *Langmuir.* 1999;15:5271-8.
23. Filipović-Vinceković N, Bujan M, Šmit I, Tušek-Božić Lj, Štefanić I. Phase transitions from catanionic salt to mixed cationic/anionic vesicles. *J Colloid Interface Sci.* 1998;201:59-70.
24. Karukstis KK, Zieleniuk CA, Fox MJ. Fluorescence characterization of DDAB-AOT catanionic vesicles. *Langmuir.* 2003;19:10054-60.
25. Marques EF, Khan A, Lindman B. A calorimetric study of the gel-to-liquid crystal transition in catanionic surfactant vesicles. *Thermochim Acta.* 2002;394:31-7.
26. Marques EF, Regev O, Khan A, da Graça Miquel M, Lindman B. Vesicle formation and general phase behavior in the catanionic mixture SDS-DDAB-water. The cationic-rich side. *J Phys Chem B.* 1999;103:8353-63.
27. Chen WJ, Zhai LM, Li GZ, Li BQ, Xu J. Spontaneous vesicle formation and vesicle-tubular microstructure transition in aqueous solution of a poly-tailed cationic and anionic surfactants mixture. *J Colloid Interface Sci.* 2004;278:447-52.
28. Yan Y, Xiong W, Huang J, Li Z, Li X, Li N, Fu H. Organized assemblies in bolaamphiphile/oppositely charged conventional surfactant mixed systems. *J Phys Chem B.* 2005;109:357-64.
29. Da Graça Miquel M, Pais AACC, Dias RS, Leal C, Rosa M, Lindman B. DNA-cationic amphiphile interactions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2003;228:43-55.
30. Brasher LL, Herrington KL, Kaler EW. Electrostatic effects on the phase behavior of aqueous cetyltrimethylammonium bromide and sodium octyl sulfate mixtures with added sodium bromide. *Langmuir.* 1995;11:4267-77.
31. Roversi M, La Mesa C. Rheological properties of protein-surfactant based gels. *J Colloid Interface Sci.* 2005;284:470-6.
32. Robertson D, Hellweg T, Tiersch B, Koetz J. Polymer-induced structural changes in lecithin/sodium dodecyl sulfate-based multilamellar vesicles. *J Colloid Interface Sci.* 2004;270:187-94.
33. Šegota S, Težak Đ. Spontaneous formation of vesicles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2006;121:51-75.
34. Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces: with applications to colloidal and biological systems.* 2. izd. London: Academic Press; 1985.
35. Mitchell J, Ninham BW. Micelles, Vesicles and Micro-Emulsions. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1981;77:601-29.
36. Ninham BW, Evans DF. Vesicles and molecular forces. *Faraday Discuss Chem Soc.* 1986;81:1-17.
37. Regev O, Guillemet F. Various bilayer organizations in a single-tail nonionic surfactant: unilamellar vesicles, multilamellar vesicles, and flat-stacked lamellae. *Langmuir.* 1999;15:4357-64.
38. Tanford C. Micelle shape and size. *J Phys Chem.* 1972;76:3020-24.
39. Gradzielski M, Muller M, Bergmeier M, Hoffmann H, Hoinkis E. Structural and macroscopic characterization of a gel phase of densely packed monodisperse, unilamellar vesicles. *J Phys Chem.* 1999;103:1416-24.
40. Božić B, Gomišček G, Kralj-Iglic V, Svetina S, Žeks B. Shapes of phospholipid vesicles with beadlike protrusions. *Eur Biophys J Biophys Lett.* 2002;31:487-96.
41. Božić B, Svetina S. A relationship between membrane properties forms the basis of a selectivity mechanism for vesicle self-reproduction. *Eur Biophys J Biophys Lett.* 2004;33:565-71.
42. Kralj-Iglic V, Gomišček G, Majhenc J, Arrigler V, Svetina S. Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2001;181:315-18.
43. Lasić DD. Giant vesicles: a historical introduction. U: Luisi PL, Walde P, urednici. *Giant vesicles, perspectives in supramolecular chemistry.* Vol 6. Chichester: John Wiley & Sons; 2000.
44. Van der Linden E, Buytenhek CJ. Spontaneous formation of onion phases in a single surfactant system and their salt-induced transformation towards ordinary lamellar phases. *Physica A.* 1997;245:1-10.
45. Oliviero C, Coppola L, Gianferri R, Nicotera I, Olsson U. Dynamic phase diagram and onion formation in the system C10E3/D2O. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2003;228:85-90.
46. Panizza P, Colin A, Coulon C, Roux D. A dynamic study of onion phases under shear flow: size changes. *Eur Phys J.* 1998;4:65-74.
47. Jalšenjak N, Težak Đ. A new method for simultaneous estimation of micellization parameters from conductometric data. *Chem. Eur J.* 2004;10:5000-7.
48. Šegota S, Heimer S, Težak Đ. New catanionic mixtures of dodecyl-dimethyl ammonium bromide/sodium dodecylbenzenesulphonate/water: I. Surface properties of dispersed particles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2006;274:85-90.
49. Šegota S, Težak Đ, Talmon Y. New Catanionic mixtures of didodecyl dimethylammonium bromide/sodium dodecylbenzene sulfonate/water with special reference to spontaneous formation of vesicles. II. size and shape analysis by SAXS, light scattering, cryo-TEM, and light microscopy. *Soft Materials.* 2006;4:51-69.
50. Šegota S, Horbaschek K, Težak Đ. Structure of Sodium 4-(1-pentyl-heptyl) benzenesulphonate aggregates in water solutions by small angle X-ray scattering. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2001;193:109-16.

SELF-SIMILARITY OF MOLECULAR ASSOCIATION IN DOUBLE LAYERS

Suzana Šegota ¹ *, Nenad Jalšenjak ², Đurđica Težak ¹

¹ Ruđer Bošković Institute, Bijenička c. 54, 10000 Zagreb, Croatia

² Agricultural Faculty, University of Zagreb, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author. E-mail: ssegota@irb.hr

Original Scientific Paper

ABSTRACT

Surfactant molecules association, growth and aggregation of self-associates into lamellar bilayers (flexible and closed), micelles, vesicles and liquid crystals, is considered to present important fundamental research with application to trans-membrane properties in the drug delivery and encapsulation. Among many practical applications, the amphiphilic aggregates present the possibility of using well defined bilayers and multilayers in the cosmetic and pharmaceutical industry. Associates of cationic surfactants show a wide variety of particle shapes, sizes and structures, and due to that, the new materials of different properties could be prepared. Vesicles can be formed spontaneously as a result of self-association of flexible monolayers into unilamellar and multilamellar soft particles with closed bilayers. In this paper investigations have been performed in cationic mixtures of Sodium n-dodecylbenzenesulfonate (SDBS) and Didodecyldimethyl ammonium bromide (DDAB) in water, and in the water solutions of nonionic double-chain surfactant, 4-(1-pentylheptyl)benzenesulfonate (6SDBS). Phase diagram, regions of micelles and vesicles formation, phase transitions, outer and inner structures of particles, were investigated by light scattering, small angle X-ray scattering, and other related methods, e.g., rheological measurements within pseudo-isotropic regions that indicated the formation of micelles and vesicles as characterised by the critical micellisation and vesiculation concentrations. In addition, mesophases have been confirmed by polarisation and electron microscopy.

Key words: aggregation, association, cationic surface active agents, light scattering, micelles, self-similarity, X-ray scattering, vesicles.