

Uticaj molekulske mase trejserskih indikatora na kontrolisano otpuštanje iz alginatnih mikročestica

JOVANA M. ILIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

ALEKSANDAR S. GRUJIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

MIRKO Z. STIJEPOVIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

JASNA T. STAJIĆ TROŠIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

BRANKO M. BUGARSKI, Univerzitet u Beogradu,

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Originalni naučni rad

UDC: 678.7

U ovom radu je prikazan proces sinteze mikročestica od prirodnih polimera, alginata i hitozana, kao i neka njihova svojstva. Osnovna primena ovih mikročestica je da se koriste kao potencijalni nosači za aktivne supstance. U tom smislu je ispitivana i difuzija različitih supstanci iz njih. Na alginatne mikročestice dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije vršena je apsorpcija tri trejserska indikatora sa različitim molekulskim masama: akridin oranž, plavi dekstran i metilensko plavo. Praćenjem kinetike otpuštanja indikatora iz mikročestica konstruisane su krive otpuštanja koje daju informaciju o uticaju veličine molekula svakog od indikatora na brzinu difuzije iz mikročestica. Da bi se postiglo što sporije otpuštanje indikatora alginatne mikročestice su oblagane hitozanom. Hitozan ima uticaj na smanjenje poroznosti gela, što dovodi do sporijeg otpuštanja trejserskih indikatora iz mikročestica. Upporedna analiza dobijenih krivih otpuštanja daje odgovor o uticaju postupka dobijanja mikročestica na brzinu difuzije indikatora.

Ključne reči: alginat, trejser, mikročestice, difuzija

1. UVOD

Poslednjih decenija postoji veliko interesovanje za hidrogelove u različitim oblastima nauke i inženjerstva zbog jedinstvenih svojstava koja poseduju: biodegradabilnost, biokompatibilnost, netoksičnost, dostupnost, relativno niska cena, itd. Karakteristike nosača, kao što su veličina i distribucija pora, veličina čestica, hemijski sastav, predstavljaju jedan od najbitnijih faktora tokom procesa inkapsulacije. Pored nosača važno je i da su sve komponente koje se koriste prirodne i netoksične [1-4].

Alginat je najčešće korišćeni prirodni anjonski polisaharid dobijen iz braon algi (*Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*)

Adresa autora: Jovana Ilić, Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd, Njegoševa 12

Rad primljen: 26.02.2015.

Rad prihvaćen: 31.03.2015.

[1]. U hemijskom pogledu, alginati se ubrajaju u heterogenu grupu polimera čiju strukturu čine nerazgranati binarni kopolimeri, β – D – manuronska kiselina i α – L – guluronska kiselina međusobno povezanih 1,4 glikozidnim vezama [5-9]. Alginati imaju sposobnost formiranja hidrogela, mikročestica, mikrovlakana, što ih čini primenljivim u oblasti biomedicine. Alginatni hidrogelovi se veoma uspešno koriste i u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, kao i za brojne biotehnološke, terapijske i medicinske svrhe [3, 4, 9].

Geliranje je moguće izvesti pod vrlo blagim uslovima, upotrebom netoksičnih reaktanata, dok sam proces zavisi od koncentracije alginata i gelirajućih dvovalentnih katjona (najčešće Ca^{2+}). Umrežavanje se odvija razmenom jona Na sa dvovalentnim katjonima i obrazovanjem specifičnih struktura tzv. kutija za jaja (egg-box). Po ovom modelu se dva ili više poliuronatnih lanca vezuju stvarajući šupljine za smeštanje katjona [5, 10, 11]. Postoje brojna istraživanja koja dokazuju veliki uticaj katjona na mehaničke i difuzio-

ne karakteristike gela, što je veoma bitno u slučaju kada se alginat koristi kao nosač za inkapsulaciju aktivnih komponenata [2,5]. Ova svojstva utiču na zadržavanje i kinetiku otpuštanja aktivne komponente, kao i na brzinu difuzije molekula kroz matricu gela. Fenomen difuzije u/iz hidrogela se može opisati kretanjem molekula, tačnije njegovim ulaskom u polimerni gel ili otpuštanjem istog iz polimerne matrice koja bubri. Ovaj proces u velikoj meri kontroliše prenos mase na granici faze polimera i okoline. Difuzija kroz mrežu polimera je veoma složen fenomen tako da se brzina difuzije, može posmatrati kao kod tečnosti i čvrstih tela, koja zavisi od koncentracije i stepena bubrenja polimera [12, 13].

$$j_i = -D \frac{dc_i}{dx} \quad (1)$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c_i}{\partial x} \right) \quad (2)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \cdot \exp \left[-\frac{D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4l^2} \right] \quad (3)$$

M_t je masa fluida koju je gel apsorbovao u vremenu t , M_∞ je masa fluida u ravnoteži ($t \rightarrow \infty$). Za kratak vremenski period, kada $t \rightarrow 0$, jednačina (3) se pojednostavljuje u jednačinu (4), iz koje se može izračunati koeficijent difuzije fluida (D):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad (4)$$

Za primenu alginatnih hidrogelova u biomedicinske svrhe potrebno je poboljšati njihova mehanička svojstva što se ogleda korišćenjem kovalentno umreženih gelova. Postoji mogućnost korišćenja polikatjonskih polisaharida, hitozana, koji imaju sposobnost formiranja zaštitne membrane oko alginatne mikročestice. Komercijalno se proizvodi deacetilovanjem hitina, strukturnog dela egzoskeletona ljuskara (račića, kraba, itd.) i ćelijskog zida gljiva. Hitozan je linearni polisaharid izgrađen od nasumice raspoređenih D – glukozamina i N – acetil – D – glukozamina povezanih β - (1 \rightarrow 4) glikozidnom vezom [14-19].

U radu je proučavan uticaj molekulske mase na brzinu otpuštanja supstance koju je potrebno inkapsulirati u alginatne mikročestice. U tu svrhu korišćena su tri trejserska indikatora (akridin oranž, metilensko plavo i plavi dekstran) sa različitim molekulskim masama.

2. EKSPERIMENTALNI DEO

2.1. Reaktanti

Prilikom eksperimentalnog ispitivanja korišćeni su sledeći reaktanti: natrijum alginat (Protanal LF 20/40),

FMC BioPolymer; hitozan, Acros Organics; kalcijum – hlorid, Analytica; L – askorbinska kiselina, Centrohem; akridin oranž (265.35 g/mol), Serva; plavi dekstran (2×10^6 g/mol), Sigma; 1,9 dimetil metilensko plavo (319.85 g/mol), Sigma.

2.2. Formiranje čestica

Za dobijanje alginatnih mikročestica metodom elektrostatičke ekstruzije [20-23] korišćen je 1.5% rastvor natrijum alginata. Rastvor za dobijanje alginatnih mikročestica obloženih hitozanom napravljen je rastvaranjem L – askorbinske kiseline u destilovanoj vodi i dodavanjem hitozana, nakon čega je primenjena već pomenuta metoda.

2.3. Difuzija kroz pore nosača

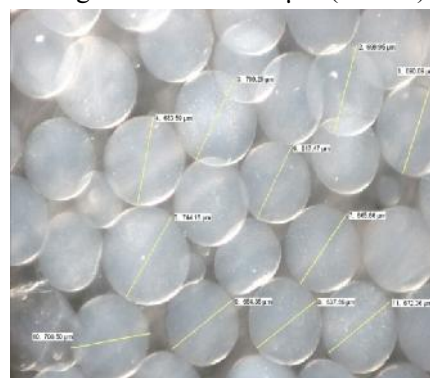
Rastvori tri trejserska indikatora, akridin oranž, plavi dekstran i metilensko plavo su pripremljeni na isti način, rastvaranjem u destilovanoj vodi u koncentracijama 1mg/ml, 1mg/ml, 0.4mg/ml, respektivno.

Dobijene mikročestice su potopljene u sud sa rastvorom indikatora, zatim je u određenim vremenskim intervalima uziman uzorak iz okolnog medijuma i merena apsorbanca na UV spektrofotometru (UV/VIS Scanning Models / UV - 3100 (PC)). Kako bi bila izmerena apsorbanca, bilo je potrebno napraviti razblaženje u odnosu 1:20.

Po završetku prve faze eksperimenata, čestice sa indikatorom su izdvojene iz rastvora i potopljene u sud sa destilovanom vodom gde je praćen proces otpuštanja. Identičan postupak primenjen je i za alginatne i alginat hitozanske mikročestice. Određivanje veličine čestica izvršeno je na osnovu snimka optičkim mikroskopom (Carl Zeiss Jena). Mikrostruktura hidrogel alginatnih čestica okarakterisana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM, Jeol JSM 6460 LV).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Na osnovu rezultata dobijenog snimanjem čestica optičkim mikroskopom zaključujemo da je srednja veličina hidrogel čestica 651.02 μm (Slika 1).

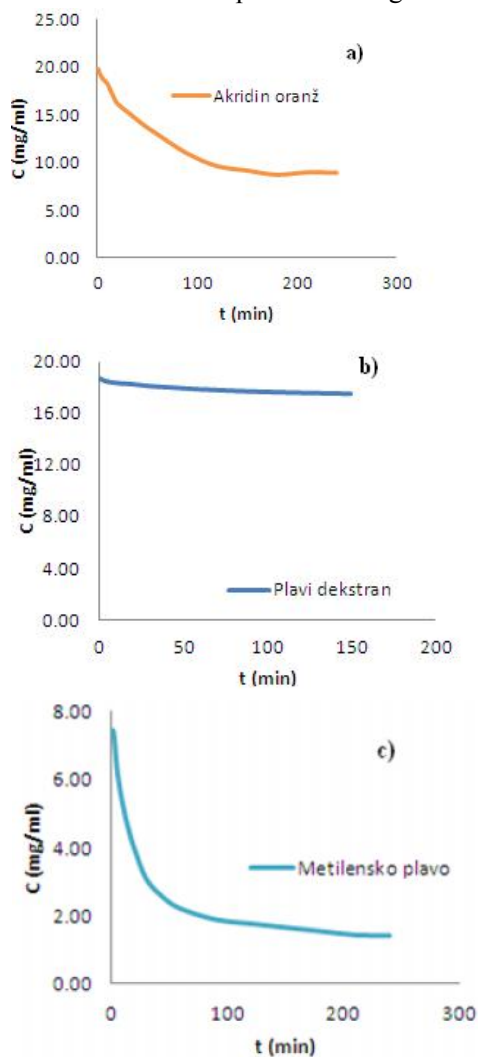


Slika 1 - Hidrogel mikročestice snimljene optičkim mikroskopom

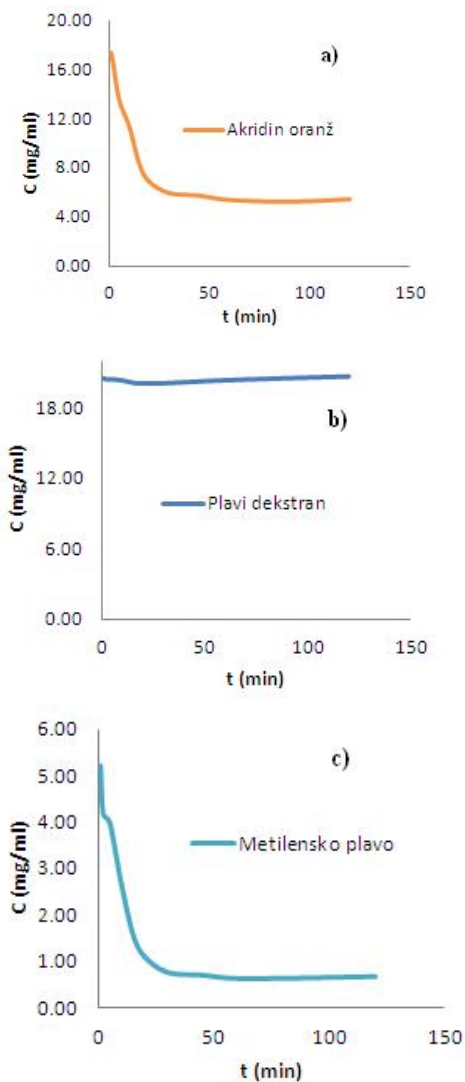
Eksperimentalne koncentracije izračunate su na osnovu jednačina baždarnih krivih, za šta je bilo potrebno izmeriti apsorbance ($\lambda=400\text{nm}$ za akridin oranž; $\lambda=610\text{nm}$ za plavi dekstran; $\lambda=665\text{nm}$ za metilensko plavo) u određenim vremenskim intervalima pomoću UV spektrofotometra.

Proces difuzije tri različita trejserska indikatora kroz pore alginatnog nosača je prikazan grafički na slici 2 i slici 3 u slučaju mikročestica obloženih hitozanom. Sam proces difuzije je veoma lako uočiti, jer dolazi do promene boje mikročestica. Povećanjem molekulske mase indikatora značajno opada brzina difuzije.

Akridin oranž, molekul najmanje molekulske mase od tri ispitana lako difunduje unutar mikročestica. Nasuprot njemu, plavi dekstran je veoma veliki molekul, te je prolazak istog kroz pore nosača praktično nemoguć, što pokazuje i poklapanje eksperimentalnih rezultata sa podacima drugih autora [24]

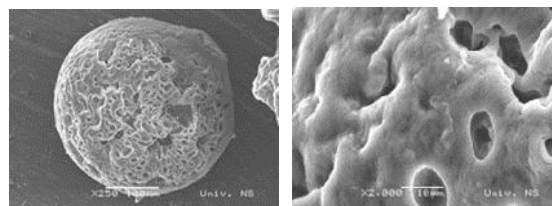


Slika 2 - Krive difuzije u alginatne mikročestice a) akridin oranž b) plavi dekstran c) metilensko plavo



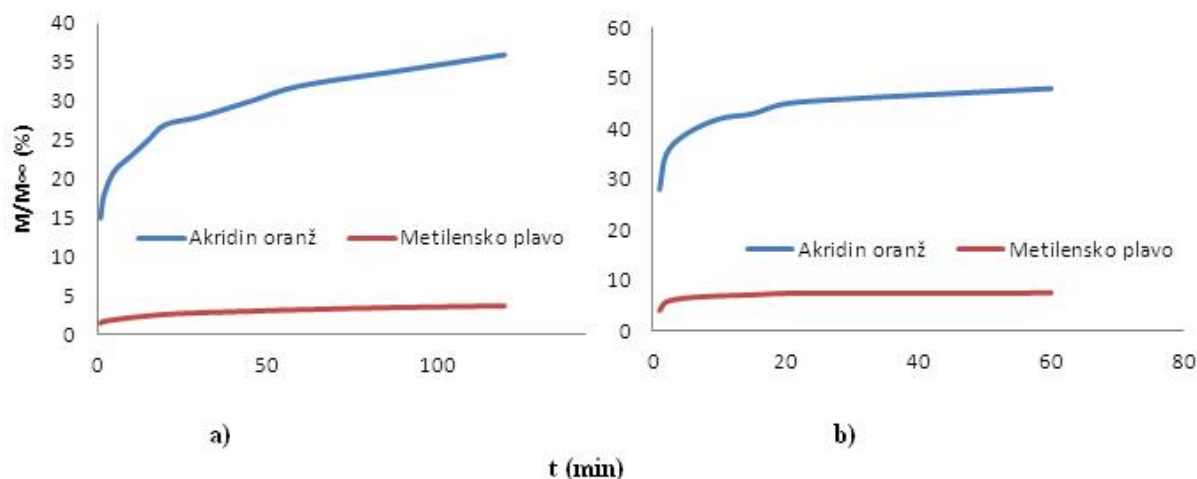
Slika 3 - Krive difuzije u alginat hitozanske mikročestice a) akridin oranž b) plavi dekstran c) metilensko plavo

Na slici 4 prikazana je SEM mikrografija praznih hidrogel alginatnih mikročestica snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom [25]. Može se uočiti da je veličina pora od oko $10\mu\text{m}$. Imajući u vidu veličinu pora i veličinu molekula plavog dekstrana očekivano nije došlo do difuzije molekula kroz pore nosača, što je potvrđeno eksperimentalnim rezultatima (slika 2b, 3b).



Slika 4 - SEM mikrografija Ca-alginatnih mikročestica: a) hidrogel mikročestica-malo uvećanje, b) hidrogel mikročestica-veliko uvećanje

Na kinetiku otpuštanja iz mikročestica pored molekulske mase indikatora, značajno utiče i vrsta mikročestice. Na slici 5 grafički je prikazan, proces otpuštanja akridin oranža i metilenskog plavog iz obe vrste mikročestica, tačnije zavisnost otpuštene mase (u procentima) sa vremenom. Indikatori se iz alginatnih mikročestica otpuštaju u prvih 15 minuta, dok je u slučaju alginat hitozanskih mikročestica vreme otpuštanja produženo za par minuta.



Slika 5 - Krive otpuštanja akridin oranža i metilenskog plavog iz a) alginatnih mikročestica, b) alginat hitozanskih mikročestica

4. ZAKLJUČAK

U radu je analiziran i objašnjen uticaj molekulske mase tri različita trejserska indikatora, kao i vrste nosača, na kinetiku otpuštanja. Potvrđeno je da je proces difuzije moguć jedino u slučaju molekula male molekulske mase.

Eksperimentalni rezultati opisuju ponašanje tri ispitivana molekula različitih molekulskih masa i uključuju verovatnoću da neki molekuli čije su molekulske mase između metilenskog plavog i plavog dekstrana neće proći kroz pore.

Praćenjem otpuštanja akridin oranža i metilenskog plavog iz alginatnih mikročestica u destilovanoj vodi može se zaključiti da se najveći deo otpušta u prvih 15 minuta od potapanja. Poređenjem krivih otpuštanja alginatnih mikročestica i mikročestica alginat-hitozan uočava se isti trend otpuštanja za svaki ispitivani trejserski indikator.

Ovo je posledica relativno dobrog otpuštanja malih molekula iz alginatnih mikročestica sa karakterističnom strukturom velikih pora. Kod mikročestica alginat- hitozan, postignuto je povećanje vremena otpuštanja u odnosu na alginatne hidrogel mikročestice što ukazuje na činjenicu da je hitozanskim oblaganjem alginata unapređena postojeća mikrostruktura.

Do otpuštanja dolazi usled gradijenta koncentracije između unutrašnjosti čestice i okolnog medijuma.

Dobijeni rezultat potiče od činjenice da hitozan "obavija" hidrogel česticu, formirajući na taj način dodatni sloj koji predstavlja prepreku za difuziju iz unutrašnjosti nosača u okolni medijum, u ovom slučaju destilovanu vodu.

5. ZAHVALNICA

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja za finansijsku podršku ovom radu u okviru projekata TR 37001 i TR 34011.

NAPOMENA

Rad saopšten na Konferenciji 13th Young Researchers Conference Materials Science and Engineering, Belgrade, December 10-12, 2014.

LITERATURA

- [1] Žuža M., Milosavić N., Knežević-Jugović Z., Hem. Ind., 65(4), p. 431–437, 2011.
- [2] Nedović V., Kalušević A., Manojlović V., Lević S., Bugarski B., Procedia Food Sci., 1, p. 1806 – 1815, 2011.
- [3] Dobić S., Jovašević J., Vojisavljević M., Tomić S., Hem. Ind., 65 (6), p. 675–685, 2011.
- [4] Babić M., Jovašević J., Filipović J., Tomić S., Hem. Ind., 66 (6), p. 823–829, 2012.
- [5] Draget K. I., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Int. J. Biol. Macromol., 21(1–2), p. 47–55, 1997.

- [6]Manojlović V., Đonlagić J., Obradović B., Nedović V., Bugarski B., J. Chem. Technol. Biotechnol., 81, p. 505–510, 2006.
- [7]Manojlović V., Rajić N., Đonlagić J., Obradović B., Nedović V., Bugarski B., Sensors, 8, p. 1488-1496, 2008.
- [8]Manojlović V., Đonlagić J., Obradović B., Nedović V., Bugarski B., Chem. Ind. Chem. Eng. Q., 1(2), p. 79-84, 2005.
- [9]Lee K. Y., Jeong L., Kang Y. O., Lee S. J., Park W. H., Adv. Drug Delivery Rev., 61, p. 1020–1032, 2009.
- [10]DeGroot A., Neufeld R., Enzyme Microb. Technol., 29, p. 321–327, 2001.
- [11]Mitrović D., Stojkowska J., Obradović B., Hem. ind., 64 (4), p. 253–263, 2010.
- [12]Mičić M., Tomić S., Filipović J., Suljovrujić E., Chem. Ind. Chem. Eng. Q., 63 (3), p. 137–142, 2009.
- [13]Pjanović R., Doktorska disertacija, Prenos mase aktivne komponente u heterogenim sistemima sa mikročesticama, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [14]Huguet M., Dellacherie E., Process Biochem., 31(8), p. 745-751, 1996.
- [15]Pasparakis G., Bouropoulos N., Int. J. Pharm., 323, p. 34–42, 2006.
- [16]Rhim J.-W., Characterization of biopolymer and chitosan-based nanocomposites with antimicrobial activity, JohnWiley & Sons, 2013., p. 355-361
- [17]Pérez-de-Luque A., Hermosín M. C., Nanotechnology and its use in agriculture, JohnWiley & Sons, p. 387, 2013.
- [18]Donsi F., Sessa M., Ferrari G., Nanometric-size delivery systems for bioactive compounds for the nutraceutical and food industry, JohnWiley & Sons, p. 641, 2013.
- [19]Sanguansri L., Oliver C., Leal-Calderon F., Nanoemulsion technology for delivery of nutraceuticals and functional-food ingredients, JohnWiley & Sons, p. 682-683, 2013.
- [20]Kostić I., Isailović B., Đorđević V., Lević S., Nedović V., Bugarski B., Hem. Ind., 66(4), p. 505–517, 2012.
- [21]Nedović V., Manojlović V., Priesse U., Bugarski B., Đonlagić J., Vorlop K., Chem. Ind. Chem. Eng. Q., 12(1), p. 53-57, 2006.
- [22]Bezbradica D., Matić G., Obradović B., Nedović V., Leskošek-Čukalović I., Bugarski B., Chem. Ind., 58(6a), p. 118-120, 2004.
- [23]Manojlović V., Obradović B., Nedović V., Leskošek-Čukalović I., Bugarski B., Chem. Ind., 58(6a), p. 62-64, 2004.
- [24]Kim C.-K., Lee E.-J., Int. J. Pharm., 79, p. 11-19, 1992.
- [25]Isailović B., Diplomski rad, Inkapsulacija polifenolnog jedinjenja iz ekstrakta čaja u alginatne mikročestice, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2009.

SUMMARY

EFFECT OF TRACERS MOLECULAR WEIGHT ON THE RELEASE PROCESS FROM ALGINATE MICROBEADS

The aim of this paper is to obtain microbeads of natural polymers such as alginate and chitosan. These microbeads were used as potential carriers for the active ingredients so that in this study the diffusion of various substances from them is analyzed. Alginate microbeads were obtained by electrostatic droplet method. In the resulting microbeads was performed absorption of three tracer indicators with different molecular weight (acridine orange, blue dextran, methylene blue). The goal of the experiment is to monitor indicators release kinetics from microbeads. Based on these measurements the layoffs curve should give an answer on the impact of the molecular size of the three indicators on the diffusion rate of microbeads. In order to achieve the slow release of indicators alginate microbeads were coated with chitosan. Chitosan has an impact on reducing the porosity of gel, which further led to lower release tracer indicators of microbeads. Comparative analysis of the obtained layoffs curves answers about the impact on the process of obtaining micro diffusion rate indicator

Key words: Alginate, tracer, microbeads, diffusion