

REOLOŠKA SVOJSTVA ALGINATA I ZNAČAJ ZA BIOMEDICINSKU PRIMENU

I. Pajić-Lijaković, M.B. Plavšić, B. Bugarski, Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu
P. Putanov, SANU, Beograd

Sadržaj – U radu su eksperimentalno ispitivana dinamička reološka svojstva alginata u fiziološkom ratvoru za različite koncentracije biopolimera. Nadjena je kritična oblast koncentracije pri kojoj se skokovito menjaju pojedina svojstva. Tumačenje ovih promena u svetlu strukture ostva reno je pomoću novog reološkog modela razvijenog za imobilisane biopolimere od istih autora.

1. UVOD

Alginati su klasa nerazgranatih polisaharida koji se dobijaju iz morskih algi i čija svojstva široko variraju zavisno od promene sastava. Ipak oni su vrlo pogodni kao materijal za matrice pri imobilizaciji biopolimera, kao što su neki od enzima, pa i živih ćelija. Korišćenje biopolimera a posebno enzima u savremenim biomedicinskim tehnologijama, hemijskoj i farmaceutskoj industriji i čitavom nizu drugih oblasti kao što je na primer agronomija u mnogome je olakšano njihovom imobilizacijom uz pomoć ovakvih matrica.

O problemima vezanim za korišćenje biopolimera u uslovima koji se bitno razlikuju od njihove prirodne sredine već je bilo reči u našem radu koji predhodi ovome [1]. Mada sami aktivni biopolimeri omogućavaju vođenje procesa pod blagim uslovima, posebno u smislu temperature i pritiska, za povećanje kapaciteta na industrijskoj skali javljaju se ubzani režimi sa aspekta fenomena transporta, mešanja u bioreaktoru i slično [1-8]. Probleme stvara takodje razdvajanje biokatalizatora od produkata reakcije, recikliranje biokatalizatora u nov proces itd. U svim ovim slučajevima pomaže imobilizacija aktivne biopolimerne supstance.

Postupci imobilizacije uglavnom se sastoje u

- vezivanja biopolimera za nosače adsorpcijom uz pomoć van der Waals-ovih sila ili elektrostatičkih interakcija
- vezivanje biopolimera sa nekoliko kovalentnih veza u nizu, za podlogu
- povezivanje hemijskim vezama biopolimera u mrežu
- inkapsulacija biopolimera u mreži koju čine molekuli nosača
- inkapsulacija biopolimera (ili sistema sa biopolimernim sadržajem) unutar čestica odnosno mikrokapsula koje su često sastavljene takodje od nekih polimera pa i biopolimera.

Kao što smo videli biopolimeri (ali različitog sastava i karaktera aktivnosti) koriste se kao aktivna supstanca i kao nosači u savremenim postupcima imobilizacije. Takodje treba istaći da karakter problema pri korišćenju imobilisanih sistema nije vezan za tipične tehnološke parametre kao što su temperatura i pritisak već često za reološke uticaje kao što je strujanje fluida u bioreaktoru, deformisanje mreža i mikrokapsula itd. U predhodnom radu [1] je razvijen model za koji opisuje dinamičke module biopolimera u funkciji strukture imobilizacionog klastera dok će ovde pažnja biti usmerena na mogućnosti primene modela ovog tipa na alginatne sisteme dobijene različitim postupcima imobilizacije

2. POSTUPCI IMOBILIZACIJE I REOLOŠKA SVOJSTVA

Imobilizacija uz pomoć prirodnih polimera omogućava stvaranje hidrogelova bilo jonotropskim želiranjem, kao što je slučaj kada se za matricu koriste alginati, pektinatti, hitozan i slično ili temperaturnim promenama sa želatinom, agarosom

i slično. Sve ovo smatra se postupcima sa blagim dejstvom na aktivne biopolimere koji se imobilizuju. Uz to ovi materijali su biokompatibilni i biodegradabilni što omogućava dobru manipulaciju sa biopolimerima u tehnološkim procesima na primer razdvajanje enzima od substrata i regeneraciju aktivne substance u procesu.

Medjutim, korišćenje matrica ovakvog tipa obično dovodi do sniženja mehaničke stabilnosti imobilizata, na primer pri primeni u reaktorima sa intenzivnim mešanjem. Ovde takodje i njihova degradabilnost može da predstavlja problem. Sa druge strane sintetski polimeri kao što su: poli(vinil alkohol), poliuretani, poliakrilati imaju visoku elastičnost i mehaničku stabilnost, biokompatibilni su ali ne i biodegradabilni. Imobilisani biokatalizatori mogu se koristiti u različitim oblicima kao što su: kockice, listići, šuplja vlakna ili zrnca. Ovakve čvrste čestice dobijaju se na četiri osnovna načina:

1. iz velikih čvrstih komada, odcepljivanjem.
2. iz malih komadića, aglomeracijom, granulacijom, presovanjem i tabletiranjem.
3. disperzijom ne mešljive faze u velikoj količini nekog fluida.
4. mešanjem fluida u približno istim količinama sa skoro trenutnim fizičkim ili hemijskim promenama u sistemu.

Najlakši postupak imobilizacije je korišćenje jednostavne tehnologije ukapavanja ili elektrostatičkog ubrizgavanja jednog fluida u drugi. To se uobičajeno radi na laboratorijskoj skali i na aparatima sastavljenim tu u istoj laboratoriji. Složeniji su vibracioni postupci koji se takodje koriste u laboratorijama, ali se odgovarajući uređaji kupuju od specijalizovanih proizvođača. Uređaji sa rotirajućim diskom i rotirajućim otvorima za ukapavanje "diznama" za sad se ne koriste na laboratorijskoj skali. Medjutim, "JetCutter" i "LentiKat" tehnologije su danas komercijalno dostupne na laboratorijskoj i industrijskoj skali. Povrh toga "JetCutter" postupak omogućava proizvodnju monodisperznih zrna u širokom opsegu veličina od nekoliko stotina mikrona do nekoliko milimetara sa visokom propusnom moći po kalibrisanom otvoru. Viskoznost fluida ovde nije problem tako da se radi sa vrlo gustim koncentrovanim sistemima. Sasvim nov pristup javlja se u tehnologiji "LentiKat" koja daje novi tip čestica sočivastog oblika. Postupak ima nekoliko prednosti kao što je fina inkapsulacija pod blagim uslovima u elastičnoj ali stabilnoj polimernoj matrici i superioran prenos mase zahvaljujući redukovanoj debljini ovih zrna do 200 μ m. Bez obzira na to zrna se mogu lako razdvajati od drugih produkata pri upotrebi u bioreaktoru zahvaljujući velikom diametru od nekoliko milimetara. Ipak pri radu na industrijskoj skali gde se traže velike količine imobilisanih biokatalizatora često se koriste imobilizati dobijeni jednostavnim i jeftinim metodama kao što su: adsorpcija i umrežavanje. Za ovakve umrežene sisteme i klastere vezanih biopolimera upravo je dizajniran model prikazan u prethodnom radu.

3. DINAMIČKI PARAMETRI

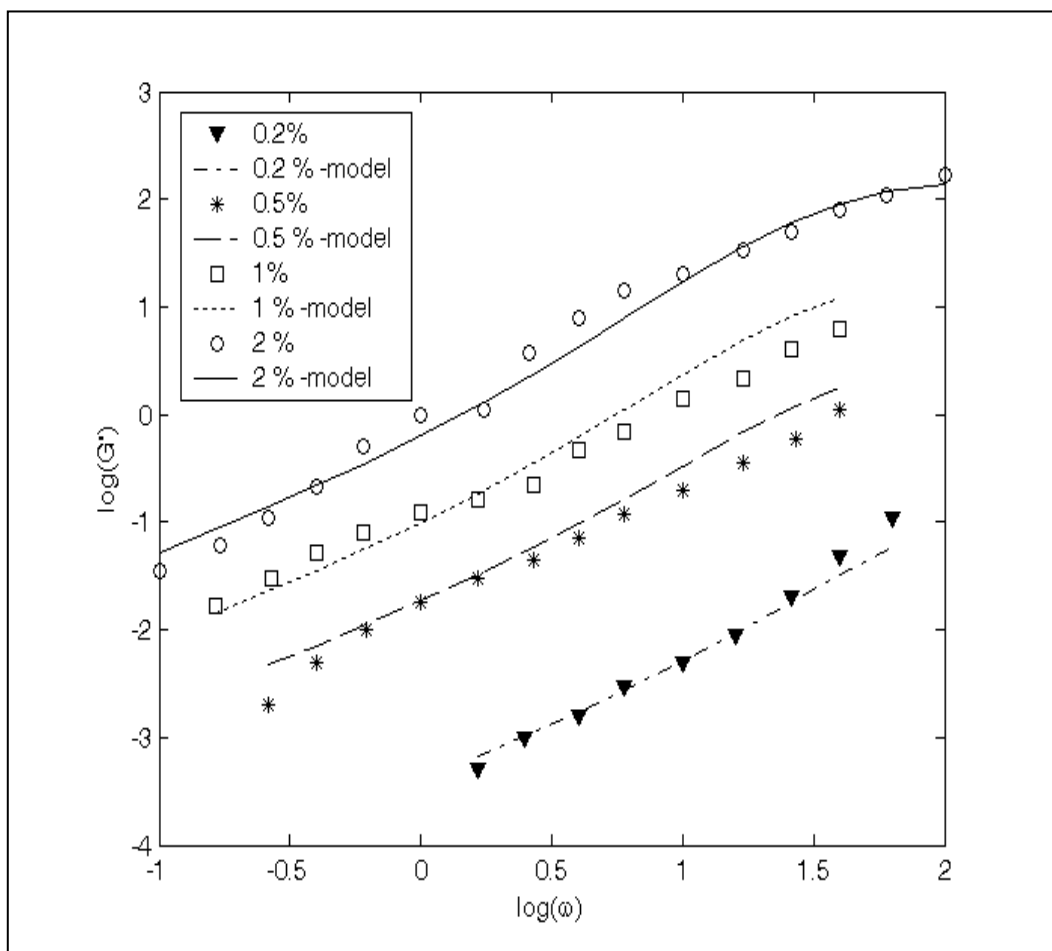
Iz modifikovanog Maxwell-ovog modela u oscilatornom režimu deformisanja [1-5] dobijeni su sledeći izrazi za modul akumulacije G' i modul gubitaka G''

$$G' = \frac{G\lambda_\alpha \omega^\alpha \cos \frac{\pi}{2} \alpha + G\lambda_\alpha^2 \omega^{2\alpha}}{1 + 2\lambda_\alpha \omega^\alpha \cos \frac{\pi}{2} \alpha + \lambda_\alpha^2 \omega^{2\alpha}} \quad (1)$$

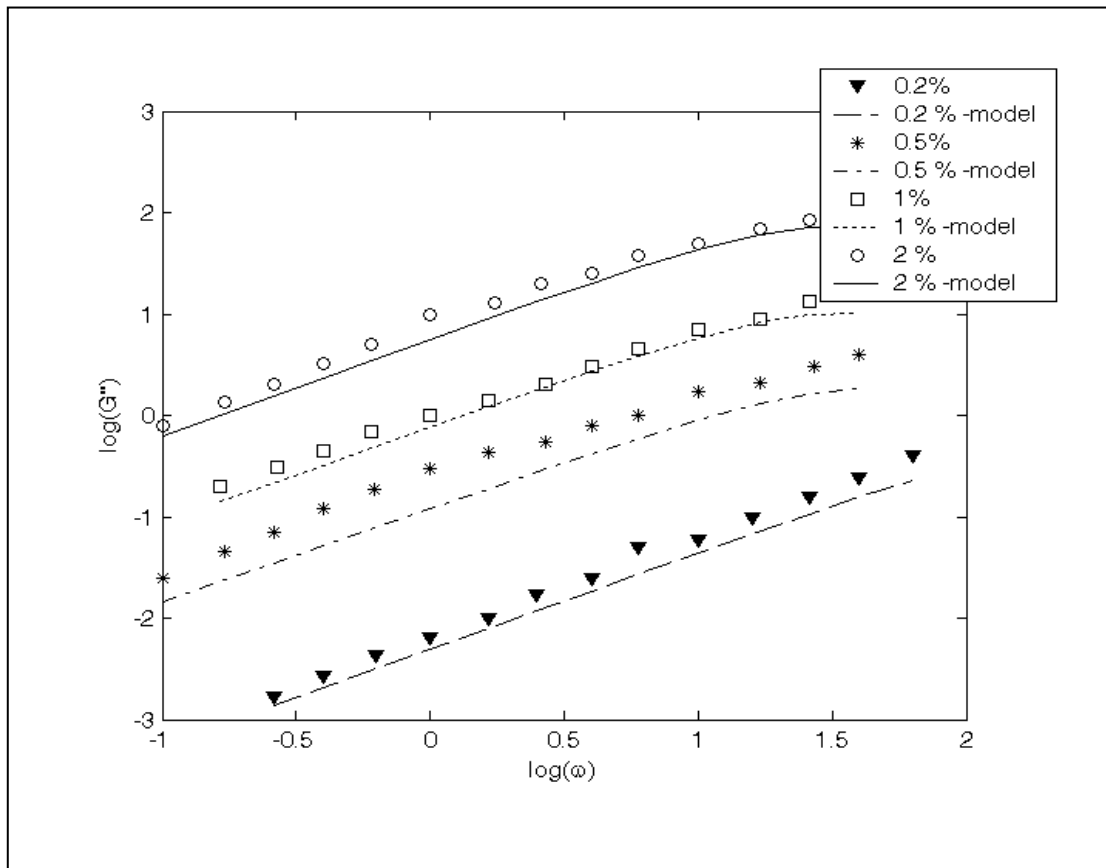
$$G'' = \frac{G\lambda_\alpha \omega^\alpha \sin \frac{\pi}{2} \alpha}{1 + 2\lambda_\alpha \omega^\alpha \cos \frac{\pi}{2} \alpha + \lambda_\alpha^2 \omega^{2\alpha}} \quad (2)$$

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Uzorci za reološka merenja su pripremljeni od istog alginata u prahu (proizvod FMC; BioPolymer, Norveška) su pripremljeni rastvaranjem u fiziološkom rastvoru (0,90 %NaCl) uz dalje razblaživanje odgovarajućim količinama destilovane vode. Tako su dobijeni uzorci sledećih koncentracija: 0,2%, 0,5%, 1% i 2%. Reološko ponašanje ovih rastvora je ispitivano pomoću Rheometrics Mechanical Spectrometer RMS - 605 korišćenjem "klipa u posudi" kao mernog alata.[2] Merenja su vršena na sobnoj temperaturi pri čemu je varirana frekvencija oscilovanja u opsegu 10^{-1} do 10^2 Hz sa amplitudom od 0,3 mrad. Rezultati su dati na Sl.1i2



Sl. 1. Promena modula akumulacije sa frekvencom



Sl. 2 Promena modula gubitaka sa frekvencijom

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati merenja modula akumulacije i modula gubitaka u zavisnosti od frekvencije za sve četiri koncentracije su prikazani tačkama u log-log dijagramu na slikama 1i2. Punim linijama prikazani su rezultati fitovanja prema jednačinama 1 i 2 primenom metoda najmanjih kvadrata. Kao prve pretpostavke u fitovanju za parametar λ uvrštene su vrednosti za τ_R prema formuli datoj u predhodnom radu. Pri tome radius rotranja određen je iz Kuhnove formule za slobodno povezani lanac [2] sa parametrima segmenta određenim iz dimenzija osnovnog mera alginata i dalje u skladu sa tim broja segmenta na osnovu molarne mase uzorka. Prve pretpostavke za G i α dobijene su iz otsečka eksperimentalnih krivih i nagiba za vrlo male frekvencije. Daljim iterativnim postupkom dobijeni parametri su dali vrlo dobro slaganje računskih krivih sa esperimentima, kao što se vidi sa slike i opsega za parametara datih u Tabeli1. Vrednosti za G parametre su takodje izračunate i na osnovu statističke teorije elastičnosti mrežana Kuhna, Walla i Flory-a [2] i na osnovu istih podataka osegmentima i koncentracijama, što je prikaza no u Tabeli 1, kao $G_{statist}$.

Tabela1 Rezultati oderdjivanja parametara modela

No. Eksp.	1	2	3	4
Koncentracija (%)	0,2	0,5	1,0	2,0
$\lambda(\text{sec})$	$0,020 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,001$	$0,035 \pm 0,001$	$0,035 \pm 0,001$
α	$0,92 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,01$
G (Pa)	0,30	4,00	22,0	160
$G_{ststist}(\text{Pa})$	8,2	20	41	82

Kao što se vidi iz Tabele 1 najveće promene sa koncentracijom pokazuje parametar G . Šta više, trend se mjenja u karakterističnoj oblasti koncentracija oko 2%, što pokazuje poredjenje sa statističkim modelom elastičnosti mreža. Dok ovaj model daje dvostruko veću vrednost G za koncentracije oko 1% od vrednosti ekstrahovane iz naših eksperimentalnih podataka, sa porastom koncentracije na 2% situacija je upravo obrnuta, eksperimenti daju dvosruko veću vrednost od statističkog modela. To je upravo u saglasnosti sa postavkama iz prvog rada prema kojima parametar G prikazuje povezanost lanaca u klasteru. Očigledno je da sa prelaskom koncentacionog praga dolazi do kvalitativne promene u povezanosti i lanci se prepliću u mnogo kompaktniji klaster, koji je sposoban da akumulira mnogop više elastične energije. Pri tome dinamika segmenta između prepletaja se bitno ne menja pa se ne menja ni relaksaciono vreme λ . Obzirom da su svi sistemi u istom rastvaraču, u razblaženom stanju i istim režimima deformisanja, logično je da se i parametar α bitno ne menja.

6. ZAKLJUČCI

Primena novog modela koji je razvijen za opisivanje dinamičkog ponašanja klastera imobilisanih biopolimera kakvi se danas koriste za biotehnoške i biomedicinske svrhe, na alginate dobijeno je vrlo dobro slaganje računskih i eksperimentalnih vrednosti. Povrh toga model pruža mogućnosti dubljeg razumevanja uticaja razloga promene pojedinih svojstva biopolimera pri imobilizaciji. Tako je nadjena kritična oblast koncentracije alginata u rastvoru kod koje se skokovito menja elastičnost klastera, što dalje ima niz reperkusija za praktičnu primenu.

LITERATURA

[1] M.B. Plavšić, I. Pajić -Lijaković, B. Bugarski, P. Putanov "Skaliranje reoloških parametara

biopolimea i njihova katalitička svojstva" ,ETRAN 2005, prethodni rad na istoj ovoj konferenciji.

- [2] M. B. Plavšić, *Polimerni materijali*, Naučna knjiga, Beograd, 1996.
- [3] J.G. Kirkwood, J. Riseman, *J. Chem Phys.* vol.16, 565, 1948.
- [4] P.E. Rouse, *J. Chem Phys*, vol. 21 1272 (1953).
- [5] B. H. Zimm, *J. Chem Phys* vol. 24,269 (1956).
- [6] N.E. Simpson, N.E. Grant, S.C.s.J. Blackand, *Biomaterials*, vol.24, 4941 (2003).
- [7] B. Bugarski, M. Plavšić, "Semipermeable Alginate-PLO Microcapsules as a Bioartificial Pancreas" in *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, K. Funatsu, Y. Shira Eds, Kluwer, London 1997, 479-498.
- [8] M.B. Plavšić, I. Paić-Lijaković, P. Putanov, "Chain Conformational Statistics and Mechanical Properties of Elastomer Blends" in *New Polymeric Materials*, W.McKnight, E. Marucelli, Lj. Karasz, Eds, American Chem Soc. Books, in press.

Abstract – A new model describing rheological behavior of immobilized biopolymers. for bio-medical and technical application is tested for alginate systems Good agreement of theory and experiments is obtained. Scaling relations between rheological parameters and structure, obtained from the model, provide explanation for sudden changes of some properties with solution concentration of alginates.

ALGINATE RHEOLOGICAL PROPERTIES IN RELATION TO BIOMEDICAL APPLICATION

I. Pajić-Lijaković, M.B. Plavšić, B. Bugarski, P. Putanov