

Obținerea și caracterizarea de suporturi biocompatibile sub formă de microparticule și filme de chitosan-alginat cu urează imobilizată

GABRIELA PĂUN ROMAN^{1*}, ELENA NEAGU¹, GABRIEL LUCIAN RADU², EUGENIA TEODOR¹

¹ Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, Centrul de Bioanaliză, Splaiul Independenței, Nr. 296, 060031, București, România

² Universitatea Politehnică București, Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor, Splaiul Independenței, Nr. 313, 060042, București, România

This study focuses on the preparation and characterization of the microparticles and films from chitosan, alginate and alginate/chitosan in relation to their application as supports for the urease immobilization. These enzymes are immobilized by using the following adsorption on solid supports methods: direct immersion of the support into enzymatic solutions; direct attachment of the carbodiimide derivative or sodium citrate activated supports. Carbodiimide activated supports have proved to be the most appropriate immobilization procedure. In this case the immobilization yields exceed 70%.

Keywords: biocompatible supports, microparticles, films, chitosan, alginate, urease immobilized

Numeroși polimeri sunt utilizați în practică pentru a fi obținute proteze ce pot înlocui părți ale corpului sau pentru a ajuta la restaurarea funcțiilor vitale [1].

Chitosanul și alginatul, polimeri polizaharidici naturali și relativ simplu de procesat, sunt cei mai utilizați pentru realizarea de suporturi biocompatibile [2] pe care se pot imobiliza substanțe active diverse care sunt ulterior eliberate controlat [3,4]. Suporturile pe bază de chitosan, alginat sau amestecuri din cei doi polimeri pot fi obținute sub forma de pelicule sau microparticule [5]. Dintre toate variantele de pelicule polimerice obținute (neporoase, microporoase, asimetrice, compozite și dinamice), cele asimetrice obținute prin procesul inversiei de fază sunt cele mai uzuale [6]. Realizarea acestor pelicule implică dizolvarea polimerului într-un solvent sau într-un amestec de solvenți. Soluția obținută se extinde pe un suport de sticlă, metalic sau textil negonflabil, după care are loc precipitarea prin una din cele patru tehnici: precipitare din fază de vapori, prin evaporare controlată, termică, imersie-precipitate [7].

Tehnici de preparare a suporturilor biocompatibile sub formă de microparticule pe bază de chitosan și alginat au fost dezvoltate după anii 1980. Trei din cele mai cunoscute metode sunt: denaturare chimică [8], insolubilizare într-o soluție cu pH bazic [9,10], metoda pulverizării uscate [11].

În cadrul acestei lucrări este prezentată obținerea și caracterizarea unor microparticule și filme din chitosan, alginat sau amestec de chitosan-alginat, care au fost testate ca suporturi pentru imobilizarea ureazei.

Partea experimentală

Pentru prepararea de suporturi biocompatibile sub formă de microparticule s-au utilizat ca polimeri chitosanul și alginatul de sodiu (ALDRICH).

Microparticulele de chitosan au fost preparate prin dizolvarea chitosanului într-o soluție de acid acetic 2%. Într-o primă variantă (MC1) a fost obținută o soluție polimerică de chitosan (3% concentrație masică), iar în cea de-a doua variantă (MC2) s-a utilizat chitosan (1,5% concentrație masică) și polietilenglicol - PEG (1,5%) pentru creșterea vâscozității. Tot în cea de-a doua variantă s-a adăugat glicerol (10%) ca porogen. Soluțiile polimerice au fost ținute sub agitare continuă timp de 3-4 h până la obținerea unei

soluții omogene, după care au fost turnate în picătură într-o soluție, agitată continuu, de hidroxid de sodiu (5%, respectiv 9%), în care precipită instantaneu formându-se microparticule.

Microparticulele din alginat, respectiv din amestec de alginat/chitosan au fost obținute prin dizolvarea alginatului de sodiu în apă distilată (soluție de concentranție 5%), iar după omogenizarea soluției aceasta a fost turnată în picătură, cu ajutorul unei seringi, într-o soluție de clorură de calciu 0,2 M pentru obținerea microparticulelor de alginat, respectiv într-un amestec de soluție clorură de calciu 0,2M cu soluție 1% chitosan în acid acetic (raport volumetric 2:1) pentru obținerea microparticulelor de alginat/chitosan.

Microparticulele au fost caracterizate din punct de vedere structural prin microscopie electronică de baleiaj SEM, cu ajutorul unui aparat Scanning Electron Microscope Philips XL-20, la 20 kV.

Procedeul de lucru utilizat pentru obținerea suporturilor biocompatibile sub formă de film a fost inversia de fază, tehnica de evaporare controlată.

Au fost obținute următoarele tipuri de filme pe bază de chitosan:

- M1 - 1% chitosan în sol. acid acetic 1%;
- M2 - 1% chitosan în sol. acid acetic 1% + 1% PEG;
- M3 - 1,5% chitosan în sol. acid acetic 2% + 2% PEG;
- M5 - 1,5% chitosan în sol. acid acetic 2% + 1,5% PEG + glicerol.

În rețeturile de preparare a acestor filme polietilenglicolul (PEG 20000) s-a introdus ca aditiv pentru creșterea vâscozității, iar glicerolul ca porogen.

Pentru obținerea filmelor, soluțiile au fost aplicate sub forma unei pelicule direct pe o suprafață netedă (sticlă), cu ajutorul unui trăgător ("doctor blade") cu fanta de 0,4 mm, apoi s-a evaporat solventul la o temperatură de 50°C, timp de cca. 4 h. După evaporare peliculele formate sunt tratate cu o soluție de hidroxid de sodiu 5% timp de 50 - 60 min la 80°C, iar în final peliculele sunt spălate extensiv cu apă distilată pentru îndepărtarea hidroxidului în exces.

Peliculele au fost caracterizate din punct de vedere al structurii și ultrastructurii cu ajutorul aparatului Coulter Porometer (porozitate) și al microscopiei electronice de baleiaj (Scanning Electron Microscope Philips XL-20, la 20 kV).

* Tel.: (+40) 2207909

Suporturile preparate au fost utilizate pentru imobilizarea ureazei (urea amidohidrolaza EC 3.5.1.5), enzimă care catalizează reacția de hidrolizare a ureei. Determinarea activității enzimatică a soluțiilor de enzimă liberă și imobilizată s-a făcut cu reactiv Nessler [12]. Randamentul de imobilizare al ureazei pe suporturi a fost determinat prin dozarea activității enzimatică prin metoda Nessler inițial și la 24 h după imobilizare. Enzima a fost imobilizată prin adsorbție pe suport solid, utilizând suportul solid ca atare sau reticulat cu metil-p-toluen sulfonat N-ciclohexil-N'(2-morfolinoetil)-carbodiimidă 0,02 g/mL și respectiv cu citrat de sodiu 2,5% [13].

Rezultate și discuții

Dimensiunile și structura morfologică a suporturilor obținute sub formă de microparticule a fost pusă în evidență prin microscopie electronică SEM.

Microgramele (fig. 1-3) pun în evidență o structură mai poroasă în cazul microparticulelor MC2 la care concentrația soluției polimerice este de 1,5% (față de 3% în cazul microparticulelor MC1) și au în compoziție glicerol, ca porogen.

Microparticulele din chitosan obținute au avut un diametru mediu de 1-1,5 mm, iar cele de alginat, respectiv alginat/chitosan un diametru mediu de 0,8-1 mm.

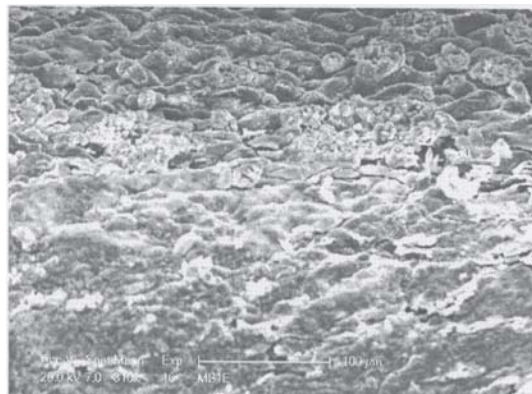


Fig.1 Micrograma particulelor sferice din chitosan – MC1 - vedere pe suprafața membranei

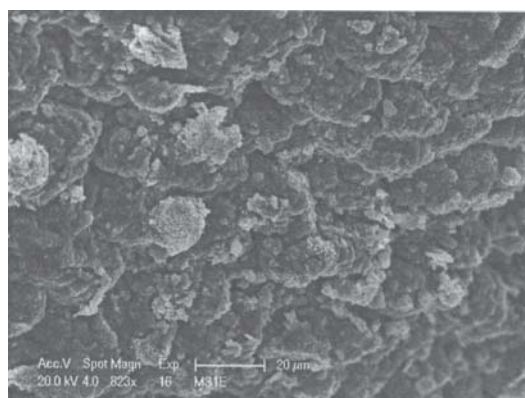


Fig.2 Micrograma particulelor sferice din chitosan – MC2 - vedere pe suprafața membranei



Fig.3 Micrograma particulelor sferice din alginat/chitosan- vedere pe suprafața membranei

Caracteristicile structurale ale suporturilor sub formă de filme preparate sunt prezentate în tabelul 1.

Se observă din datele prezentate în tabelul de mai sus influența aditivului (PEG) și a concentrației solventului (acidul acetic). Astfel, se constată că soluțiile în care intră PEG formează în procesul de peliculizare un strat uniform care-și menține forma timp îndelungat. Din punct de vedere structural, pentru o concentrație mai mare de 1% PEG se obțin filme rezistente, în timp ce soluțiile polimerice în care se introduce PEG într-o concentrație mai mică sau egală cu 1% formează filme transparente (cu diametre ale porilor < 0,2 μm).

De asemenea, concentrația solventului influențează tipul de peliculă obținută: o concentrație de 1% conduce la formarea de filme transparente, în timp ce utilizarea unei concentrații de 2% duce la obținerea de filme semitransparente, respectiv la creșterea diametrelor porilor peliculei.

Un alt factor care conduce la creșterea diametrului porilor peliculei este cel de-al doilea aditiv porogen introdus, și anume glicerolul. Prin modificarea acestor parametri se poate dirija procesul de obținere a peliculelor astfel încât dimensiunile porilor filmelor să fie adecvate utilizărilor ulterioare.

Distribuția mărimii porilor corespunzătoare filmului M5 este de tip distribuție gaussiană (fig.4).

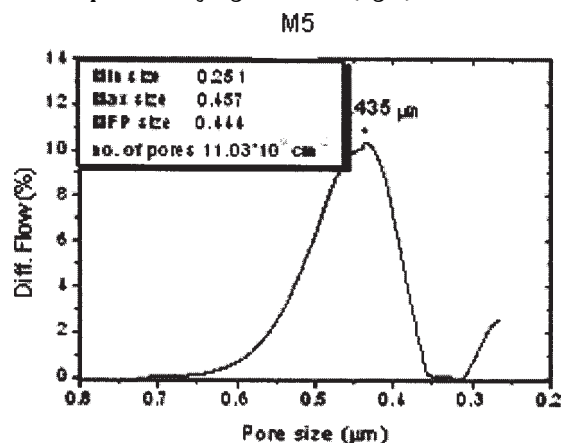


Fig.4 Distribuția mărimii porilor- film M5

Tabelul 1
CARACTERISTICILE FILMEI PE BAZĂ DE CHITOSAN

Nr crt	Tip film	d _{min} μm	d _{max} μm	d _{med} μm	Nr.total pori/cm ² x(10 ⁻⁹)	Observații
1	M1	-	-	< 0,2	-	Film rezistent (transparent)
2	M2	-	-	< 0,2	-	Film rezistent (transparent)
3	M3	0,3	0,606	0,355	4,48	Film rezistent (semitransparent)
4	M5	0,251	0,444	0,457	11,03	Film rezistent (semitransparent)

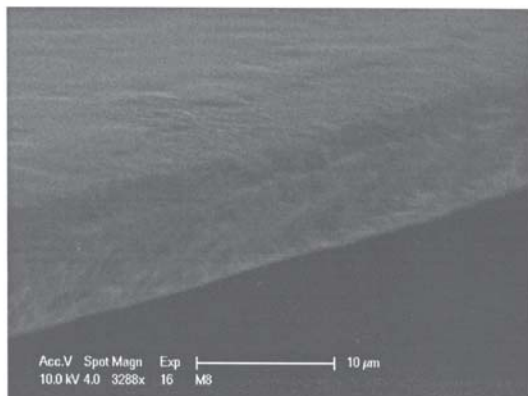


Fig.5 Micrograma filmului M5 – vedere transversala

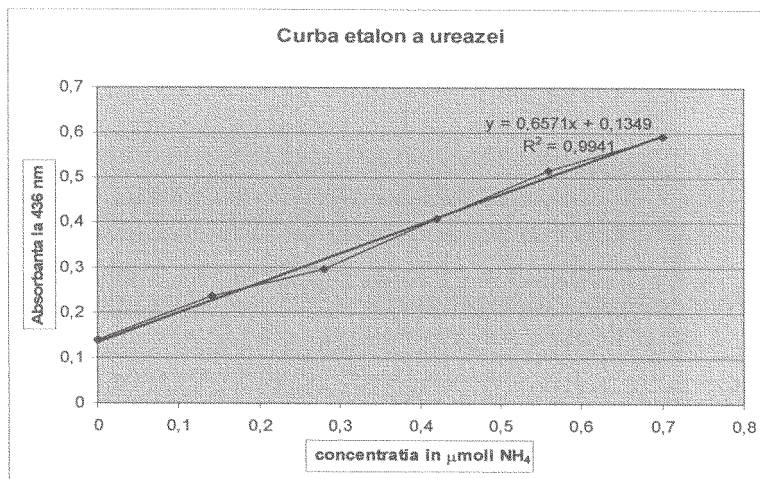


Fig.6 Curba de etalonare pentru dozarea activității enzimice a ureazei

Tabelul 2
RANDAMENTUL DE IMOBILIZARE A UREAZEI PE SUPORTURILE BIOPOLIMERICE

Nr. crt.	Tip suport	Tip de activare	Masa de suport,mg	A.E _{suport} UI/suport	A.E. specif. UI/mg suport	Randament de imobilizare %
1	Microparticule din alginat	derivat de carbodiimida	56,4	1,38	0,02	87
2		citrat de sodiu	56,7	0,95	0,01	60
3		imersare directa	59	1,28	0,02	81
4	Microparticule din chitosan (MC2)	derivat de carbodiimida	39,6	1,21	0,03	76
5		citrat de sodiu	40,5	1,15	0,02	72
6		imersare directa	34	0,99	0,02	62
7	Microparticule din alginat/chitosan	derivat de carbodiimida	36	1,4	0,039	89
8		citrat de sodiu	34,6	0,02	0,0005	12,6
9		imersare directa	35	0,91	0,026	57
10	Suport plan (film) (M2)	derivat de carbodiimida	31,9	1,33	0,042	84
11		citrat de sodiu	30,6	1,26	0,041	80
12		imersare directa	46,7	0,85	0,01	53
13	Suport plan (film) (M5)	derivat de carbodiimida	29	1,4	0,05	89
14		citrat de sodiu	32	1,13	0,035	71,5
15		imersare directa	31	1,13	0,036	71,5

OBS. Randamentul de imobilizare s-a exprimat ca raport între A.E_{suport} și A.E_{introdusa}

Micrograma corespunzătoare filmului M5 (fig.5) pune în evidență structura asimetrică a acestui film, cu existența distinctă a celor două straturi componente (strat activ dens cu o grosime de 10-20 μm și strat macroporos cu o grosime de 150-200 μm).

Pentru dozarea activității ureazei a fost realizată curba de etalonare (fig.6) utilizând o soluție de sulfat de amoniu preparat în acid sulfuric cu diluții diferite, peste care se adaugă reactiv Nessler și se colorimetrează la 436nm /12. De menționat că activitatea inițială a ureazei a fost determinată ca fiind 3.97 UI/mg, iar peste fiecare tip de suport s-au adăugat 2 mL soluție de enzimă 0.2 mg/mL ($A.E_{introdusa} = 1.58 \text{ UI/probă}$, unde s-a notat cu AE activitatea enzimatică).

Randamentele obținute la imobilizarea ureazei au depins de mai mulți factori, așa cum este prezentat în tabelul 2.

Din datele prezentate în tabelul 2 se observă că cele mai bune randamente de imobilizare ale ureazei au fost obținute în cazul variantelor în care suporturile (microparticule din alginat/chitosan, respectiv pe membrană din chitosan) au fost activate cu metil-*p*-toluen sulfonat N-ciclohexil-N'(2-morfolinoetil)-carbodiimidă.

Rezultate comparative privind randamentele de imobilizare au fost prezentate în literatura de specialitate pentru ureaza imobilizată pe membrane compozite pe bază de chitosan [14] sau pe microparticule de chitosan

[15], ureaza imobilizată în microparticule de alginat [16], pectinaza imobilizată pe suporturi de alginat de sodiu [17].

Concluzii

Pot fi obținute prin procedee simple și rapide microparticule sau filme din chitosan, alginat sau amestecuri ale celor doi polimeri.

Suporturile biocompatibile obținute au prezentat caracteristici structurale bune ce le recomandă la imobilizarea ureazei, dar și pentru alte enzime.

Au fost obținute randamente de imobilizare a ureazei cuprinse în intervalul 76 - 89% în cazul variantelor în care suportul a fost activat cu metil-*p*-toluen sulfonat N-ciclohexil-N'(2-morfolinoetil)-carbodiimidă.

Ureaza imobilizată pe diferite suporturi are aplicații biomedicale în analiza ureei din sânge, detectarea ureei în domeniul agricol și în apele reziduale, detectarea ureei în lapte și produsele din lapte falsificate cu uree.

Mulțumiri: Lucrarea a fost finanțată parțial din proiectul nr. 06-400106-Program Biostar.

Bibliografie

1. RAJESH R. DUBEY, RAJESH H. PARIKH, AAPPS Pharm.Sci.Tech., 5, nr. 1, 2004, p.1
2. KRAJEWSKA, B., Acta Biotechnologica, 11, issue 3, 2004, p. 269

3. HERMES, R.S., NARAYANI, R., *Trend.Biomater.Artif.Organs*, **15**, nr. 2, 2002, p.54
4. PANDEY, R., KHULLER, G. K., *J Antimicrob. Chemother.*, 53, 2004, p.635
5. EMIR B. DENKBAŞ, MEHMET ODABAŞI, *J Appl Polym Sci.*, 76, 2000, p.1637
6. PAUN-ROMAN G., BATRINESCU GH., GARGANCIUC D., POPESCU G., *Procese membranare la separarea si concentrarea unor compuși bioactivi din medii lichide naturale*, Ed. Cartea Universitara, București, 2006, p.49
7. KESTING, R.E., *Synthetic Polymeric Membranes*, Mc Grow –Hill, New York, 1971
8. HUANG, Y.C., CHIANG, C.H., YEH, M.K., *J. of Microencapsul.*, 20, nr. 2, 2003, p. 247
9. BARREIRO-IGLESIAS, R., CORONILLA, R., CONCHEIRO, A., ALVAREZ-LORENZO, C., *Eur.J. Pharm. Sci.*, **24**, nr. 1, 2005, p.77
10. ADRIANO, W. S., FILHO, E.H.C., SILVA, J. A., GIORDANO, R. L. C. , GONÇALVES, L.R.B., *Braz. J. Chem. Eng.*, **22**, nr.4, 2005, p.529
11. OLIVEIRA, B.F., SANTANA, M.H.A., RÉ M.I., *Braz. J. Chem. Eng.*, **22**, nr.3, 2005, p.353
12. DUMITRU, I.F., *Lucrari practice de biochimie*, Ed. Didactică și Pedagogică, 1988, p.182
13. NEAGU, E., PAUN ROMAN, G., RADU, G.L., MOROEANU, V., *J. of Colloid and Surface Chemistry* , **6**, no.1, 2006, p.27
14. GABROVSKA, K., GEORGIEVA, A., GODJEVARGOVA, T., STOILOVA, O., MANOLOVA, N., *Journal of Biotechnology*, 129, 2007, p. 674
15. ZU PEI LIANG, YA QING FENG , SHU XIAN MENG, ZHI YAN LIANG, *Chinese Chemical Letters*, **16**, nr. 1, 2005, p. 135
16. SENAY HAMARAT BAYSAL, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, **35**, Issue 4, 2007, p. 457
17. TUOPING LI, Na WANG, SUHONG LI, QIANCHENG ZHAO, MEI GUO, CHEYUN ZHANG, *Biotechnol. Lett.* (2007) 29:1413

Intrat în redacție: 28.02.2007