

# STUDIUM REAKTIVITY KATIONAKTIVNÍHO BIOPOLYMERU INTERAKCÍ S ANIONAKTIVNÍMI BARVIVY

**Jiří Smilek<sup>1</sup>, Pavel Kolesa<sup>1</sup>, Petr Sedláček<sup>1</sup>, Martina Klučáková<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centrum materiálového výzkumu Vysoké učení technické v Brně – Fakulta chemická,  
Purkyňova 118/464, 612 00 Brno, Česká republika, +420 541 149 488, xcsmilek@fch.vutbr.cz

## Abstrakt

Nestacionární difúze anionaktivního organického barviva byla realizována v agarózových hydrogelových maticích za účelem studia reaktivity chitosanu. Reaktivita byla následně posuzována na základě interakce tohoto kationaktivního biopolymeru s modelovými difúzními sondami. Míra interakce byla zkoumána pomocí základních difúzních parametrů – efektivní difúzní koeficient a koncentrace barviva na rozhraní hydrogel-roztok. Použitá analytická metoda pro stanovení koncentrace barviva *in situ* byla UV-VIS spektroskopie. Zkoumán byl vliv teploty na reaktivitu kationaktivního biopolymeru v hydrogelové fázi s anionaktivní látkou. Dosažené výsledky jasně naznačují silný imobilizační efekt chitosanu vůči transportu anionaktivního barviva. Rostoucí teplota má výrazný vliv na rychlost transportních procesů anionaktivních organických barviv. Prezentovaná metoda studia reaktivity kationaktivního biopolymeru je univerzální metodou a může být využita pro široké spektrum biopolymerních látek.

**Klíčová slova:** difúze; hydrogel; chitosan; reaktivita; polyelektrolyt

## Úvod

Biopolymerní sloučeniny se v dnešní době těší velkému zájmu především v oblasti farmacie, biomedicíny a tkáňového inženýrství. Chitosan, který patří mezi kationaktivní přírodní polysacharidy, má unikátní vlastnosti v tom, že ve své struktuře obsahuje volnou aminoskupinu [1], která jej řadí mezi jedinečné biopolymerní látky s širokým spektrem využití. Jedná se o částečně deacetylovaný biopolymer *N*-acetyl glukosamin, odvozen od chitinu. Výhodou materiálů na bázi chitosanu je především jejich biodegradabilita (schopnost degradace látky na produkty těla vlastní) a biokompatibilita (materiál nezpůsobuje cytotoxické, alergologické či mutagenní změny v živém organismu). Z výše uvedených důvodů se chitosan běžně využívá pro přípravu tzv. *scaffoldů* (materiály sloužící jako lešení pro růst kmenových buněk). Stručný přehled aplikace chitosanu coby materiálu pro přípravu *scaffoldů* nabízí publikace [2, 3].

Materiály na bázi chitosanu se také běžně využívají pro odstraňování potravinářských barviv z vodných roztoků pomocí adsorpčních procesů. Tématu interakce chitosanu s anionaktivními organickými barvivy se věnují publikace [4, 5]. Navzdory faktu, že je velmi dobře prokázána komplexace látek anionaktivního charakteru právě tímto kationaktivním biopolymerem, neexistuje univerzální metoda studia reaktivity biopolymerních látek, chitosanu nevyjímaje. Hlavním cílem této publikace je navržení univerzální metody studia reaktivity biopolymerních látek v hydrogelových maticích pomocí laboratorních difúzních technik v závislosti na měnících se experimentálních podmínkách (teplota, iontová síla, pH roztoku apod.). Difúze je realizována v hydrogelových médiích na bázi lineárního polysacharidu. Výhodou hydrogelových nosičů je fakt, že obsahují majoritní podíl vody a tím pádem jsou schopny poměrně účelně simulovat podmínky aplikace chitosanu ve formě *scaffoldu*. Výhodou také je, že hydrogely lze připravit s přesně definovanými parametry (tvar, rozměry), což je nezbytné pro exaktní matematický popis difúzních procesů.

## Materiál a metody

Agaróza (< 10 hm. % vzdušné vlhkosti), organické barvivo Amidočern 10B (C.I. 20470), chitosan (75 – 85 % deacetylovaný) byly zakoupeny od Sigma Aldrich a následně použity bez další purifikace.

Studium reaktivity kationaktivního biopolymeru v hydrogelových maticích je založeno na faktu, že chitosan je homogenně rozptýlen v hydrogelové matici. Všechny hydrogely prezentovány v tomto příspěvku byly připraveny na bázi termoreverzibilního lineárního polysacharidu – agaróza, díky němuž lze jednoduše připravit hydrogel požadovaných vlastností. Koncentrace agarózových hydrogelů byla zvolena 1 hm. % z důvodu dobré transparentnosti. Požadované množství agarózy bylo rozpuštěno v deionizované vodě nebo v kyselém roztoku chitosanu. Suspenze agarózy ve vodném roztoku byla následně zahřívána na teplotu 85 °C až do vzniku transparentního roztoku. Roztok agarózy byl následně umístěn do ultrazvukové lázně na 1 minutu, předehřáté na teplotu 85 °C, za účelem odstranění vzduchových bublin. Poté byl roztok za horka nalit do plastových kyvet (PMMA) s vnitřními rozměry 10 × 10 × 45 mm. Postupné chlazení roztoku čisté agarózy či s přidávkem chitosanu zapříčinilo vznik polotuhé hydrogelové hmoty. Po ochlazení hmoty na laboratorní teplotu, které trvalo 45 minut, bylo pomocí skalpelu vytvořeno ostré rozhraní vzniklého hydrogelu kopírující otvor kyvety. Tyto hydrogely s homogenně rozptýleným chitosanem byly umístěny (v horizontální poloze) do zásobního roztoku jednoduchého organického barviva (C.I. 20470) o objemu 250 ml. Difúzní nádoby s barvivem a hydrogely byly umístěny do předem vytemperovaného zařízení, které je schopno udržovat konstantní zvolenou teplotu po celou dobu experimentu. Roztoky difúzní sondy (organické barvivo) byly po celou dobu experimentu míchány na magnetické míchačce (250 ot./min.) za současného průběhu difúze molekul organického barviva do struktury agarózových hydrogelů. Každá difúzní nádoba obsahovala 2 vzorky s rozdílnou koncentrací chitosanu (0,00 hm. % a 0,01 hm. %).

Ve zvolených časových intervalech byly měřeny absorpční UV-VIS spektra v různých vzdálenostech od rozhraní hydrogel-roztok na přístroji Varian Cary 50 vybaveném speciálním posuvným zařízením. Z naměřených spekter byla následně vypočítána koncentrace nadifundovaného barviva v různých vzdálenostech od rozhraní hydrogel-roztok. Z těchto koncentrací byl poté sestrojen koncentrační profil difundujícího barviva pro jednotlivé agarózové hydrogely s různou koncentrací biopolymeru (viz. obrázek 1). Ověřován byl vliv teploty na rychlosti difúzních procesů, respektive na sorpční kapacitu chitosanu. Experimenty byly realizovány při různých teplotách (30 °C, 40 °C a 50 °C).

## Výsledky a diskuse

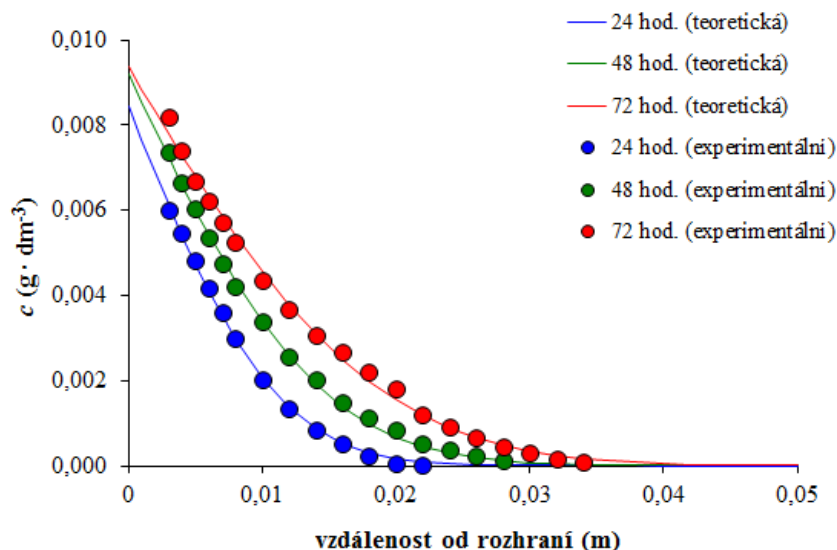
Vzhledem k tomu, že chitosan se v roztocích chová jako polykationt, lze očekávat pozitivní interakce s anionaktivními organickými barvivy. Na tomto principu je založena prezentovaná metoda studia reaktivity biopolymerních látek.

Experimentálně naměřené koncentrační profily byly korelovány s teoretickým difúzním modelem pro porézní média metodou nejmenších čtverců pomocí Řešitele (přídavná funkce v Excelu) podle rovnice 1.

$$c = c_0 \cdot \operatorname{erfc} \frac{x}{\sqrt{4 \cdot D_{\text{eff}} \cdot t}}$$

Symbol  $c$  vystihuje koncentraci difundujícího média na rozhraní hydrogel-roztok,  $c_0$  značí původní koncentraci difundujícího barviva v nádobě,  $\operatorname{erfc}$  je chybovou funkcí,  $x$  je vzdálenost

od rozhraní,  $D_{\text{eff}}$  představuje efektivní difúzní koeficient a  $t$  je doba, po kterou probíhal difúzní proces.



**Obrázek 1.** Vývoj koncentrace zvoleného difúzního média pro 1 hm. % agarózový gel s přidavkem 0,010 hm. % chitosanu při teplotě 40 °C.

V tabulce 1 jsou sumarizovány vypočtené efektivní difúzní koeficienty podle rovnice 1. Jak je patrné z této tabulky, malý přídavek kationaktivního biopolymeru chitosanu výrazným způsobem ovlivňuje hodnoty efektivních difúzních koeficientů. Penetrace organického barviva je přidavkem chitosanu zpomalena, zároveň také dochází k zakoncentrování barviva na rozhraní měřených vzorků, což potvrzuje původní předpoklad, že chitosan má výrazný imobilizační efekt vůči anionaktivním látkám.

**Tabulka 1.** Hodnoty efektivního difúzního koeficientu pro agarózové hydrogely s přidavkem chitosanu v závislosti na teplotě.

Teplota (°C)	vzorek	$D_{\text{eff}}$ (m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> )
30	1 % AG + 0,00 % CHIT	3,71 ± 0,19
	1 % AG + 0,01 % CHIT	2,68 ± 0,29
40	1 % AG + 0,00 % CHIT	5,83 ± 0,17
	1 % AG + 0,01 % CHIT	3,39 ± 0,28
50	1 % AG + 0,00 % CHIT	6,99 ± 0,16
	1 % AG + 0,01 % CHIT	4,16 ± 0,25

Interakce anionaktivních látek je realizována především přes volné aminoskupiny v disociovaném stavu. Právě přítomnost těchto skupin činí z chitosanu kationaktivní biopolymer, který je schopen imobilizovat či zpomalovat transport anionaktivních látek, což je velmi ceněnou vlastností biopolymerních látek především s ohledem na aplikaci ve farmacii či tkáňovém inženýrství.

## Závěr

Neustálené difúzní procesy prezentované v tomto článku nabízejí zajímavý alternativní pohled na studium reaktivity biopolymerních látek. Výhodou také je nenáročnost přípravy

hydrogelových nosičů na bázi agarózy, do nichž může být inkorporována jakákoliv biopolymerní látka, jejíž reaktivita má být zkoumána. Následně může být zkoumán vliv základní fyzikálně-chemických parametrů (pH, iontová síla, teplota, přídavek elektrolytu) na transport vybraných difúzních sond do struktury hydrogelové matrice. Nestacionární difúzní procesy jsou univerzální metodou pro studium reaktivity biopolymerních sloučenin, jak již bylo ověřeno v publikaci [7].

O reaktivitě kationaktivního biopolymeru lze usuzovat na základě míry interakce s anionaktivním barvivem. Jak je patrné z předložených výsledků, hodnoty efektivních difúzních koeficientů se s přítomností chitosanu snižují, což značí pozitivní afinitu chitosanu k organickým barvivům anionaktivního typu.

### **Poděkování**

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, z projektu LO1211.

### **Literatura**

- [1.] MA, B., QIN, A., LI, X., ZHAO, X., HE, C. *Structure and properties of chitin whisker reinforced chitosan membranes*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, roč. 64, s. 341-346.
- [2.] MADIHALLY, S., MATTHEW, H.W.T. *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 1999, roč. 20, č. 12, s. 1133-1142.
- [3.] MAO, J.S., ZHAO, L.G., YIN, Y.J., YAO, K.D. *Structure and properties of bilayer chitosan-gelation scaffolds*. Biomaterials, 2003, roč. 24, č. 6, s. 1067-1074.
- [4.] DOTTO, G.L., MOURA, J.M., CADAVAL, T.R.S., PINTO, L.A.A. *Application of chitosan films for the removal of food dyes from aqueous solutions by adsorption*. Chemical Engineering Journal, 2013, roč. 214, s. 8-16.
- [5.] REDDY, D., HARIKISHORE, K., LEE, S. *Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions*. Advances in Colloid and Interface Science, 2013, roč. 201-202, s. 68-93.
- [6.] SEDLÁČEK, P., SMILEK, J., KLUČÁKOVA, M. *How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments*. Reactive and Functional Polymers, 2014, roč. 74, s. 41-50.

### **Abstract**

Non-stationary diffusion of an anionic organic dye was realized in agarose hydrogels. The main aim of this paper is the study on reactivity of chitosan. The reactivity was studied by the interaction of cationic chitosan with a model diffusion probe (organic dye). The rate of interaction was assessed by fundamental diffusion parameters – effective diffusion coefficients and the boundary concentration of the dye on the interface hydrogel-solution. UV-VIS spectroscopy was used as an analytical method for determination of concentration *in situ*. The effect of temperature was also investigated. Summarized results clearly illustrate strong immobilization effect of chitosan towards to anionic dye. Increasing temperature has high influence on the reactivity and the binding capacity of cationic biopolymers. Mechanical properties of agarose hydrogels were studied by oscillatory measurement. Presented method of the reactivity of cationic biopolymer illustrated a universal method for studies on reactivity of wide range of biopolymer compounds.