

СИНТЕЗ, СТРОЕЖ И АНТИБАКТЕРИАЛНА АКТИВНОСТ НА ХИТОЗАН-Zn КОМПЛЕКСНИ СЪЕДИНЕНИЯ.

Диляна Звездова, Ангел Звездов

Университет "Проф. д-р Асен Златаров", бул. "Проф. Я. Якимов", №1, 8010 Бургас,
България

SYNTHESIS, STRUCTURE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN-Zn COMPLEXES

Dilyana Zvezdova, Angel Zvezdov*

Prof. Assen Zlatarov University, Prof. Jakimov str.1, 8010 Burgas, Bulgaria, Department of
Organic chemistry, * Department of water treatment technology

ABSTRACT

A method for preparation of four chitosan-Zn complexes with different content have been characterized by means of FTIR, XRD analytical methods. The different molecular structures and different molecular weights have been discussed depending on Zn-ions content. Antibacterial activities of these different complex substances have been in-vitro tested for a couple microorganisms and fungal. The investigated chitosan-Zn complexes show a wide range of effective antibacterial activities larger than pure chitosan or ZnCl₂ respectively. The chitosan-Zn complexes have better antibacterial activity if Zn content is increased. The antibacterial activity against bacteria is better than those against fungal. An excellent activity is shown against E. coli.

Key words: chitosan-Zn complexes, FTIR spectroscopy, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Staphylococcus aureus, Corynebacterium, Candida albicans

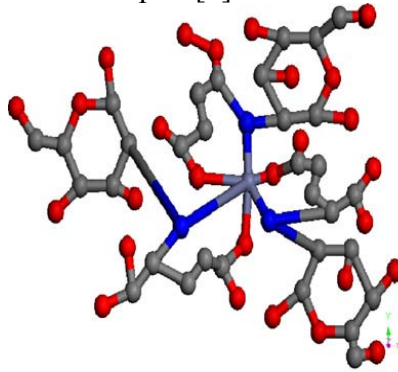
ВЪВЕДЕНИЕ

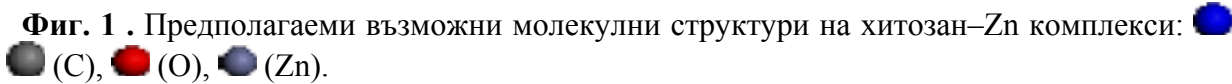



Хитозанът (CS) е най-разпространеният аминополизахарид в природата и се получава чрез деацетилиране на хитин, който е един от основните компоненти в структурата на черупковата обвивка на животни и се получава като отпаден продукт в рибно-консервната промишленост [5,7,12]. Химическата структура на хитозана притежава твърде голяма способност да формира комплексни съединения с метални йони [4]. Така например, цинкът (Zn) е един от металните йони, който най-лесно се координира в структурата на CS. След свързването на цинковите йони в структурата на хитозана посредством връзка с азота, кислорода или комбинация от тях, се подсилва биологичната активност на съединението. На тази основа се откроява възможността CS-Zn комплекси да проявяват биологична активност, която от своя страна е обособила приложението на CS-Zn комплекси в аспектите на медицинската и хранително-вкусовата промишлености. Това се дължи на техните физикохимични и биологични свойства като биосъвместимост; биоразградимост; биоактивност; отсъствие на токсичност, антибактериална ефективност и др., правейки ги успешно приложими вещества при различни производства във фармацевтични и медицински аспекти [1,11]. Последните изследвания показват, че хитозан с по-малка молекулна маса (средно 5–10 KDa) притежава по-силна антибактериална и изключително голяма биологична активност в сравнение с хитозан с по-голяма молекулна маса [8]. Наличните в структурния скелет на хитозана –ОН и –NH₂ групи представляват подходящи лиганди за координиране с йони на преходни метали, образувайки хитозан-метални комплексни съединения.

В основни линии, механизмите за свързването на цинк с хитозан може да се подразделят на две основни групи:

- „мостов модел” т.е. модел на омрежващо мостообразуване между веригите
- „висящ модел на скачване”(присъединяване).

При „мостов модел” металните йони са свързани с няколко аминогрупи от една и съща молекулна верига или от различни вериги посредством междумолекулно или вътрешномолекулно комплексообразуване, в противовес на „висящ модел на скачване, при който металните йони са свързани с аминогрупите чрез механизъм на присъединяване [3,6]. В зависимост от координационното разположение (координационната сфера) на цинка, валентните му връзки могат да бъдат свързани или с водна молекула или с OH^- група в С-3 позиция (Фиг. 1). Връзките на цинка с три кислородни и един азотен атом са в квадрипланарна или тетраедрична геометрия [3].



Фиг. 1 . Предполагаеми възможни молекулни структури на хитозан–Zn комплекси:  (N),  (C),  (O),  (Zn).

По принцип живите организми имат необходимост от определени количества цинк но с ниски концентрации, който има ролята на кофактор в структурата на метал-протеините и ензимите, обаче при високи концентрации от Zn(II) той предизвиква инхибиращо влияние за растежа на бактериите и има токсичен ефект за повечето микроорганизми. Това влияние може да се обуславя от заместване на някои особено важни йони и блокиране функциите на протеиновите функционални групи, инактивиране на ензимите, появяване на свободни хидропероксидни радикали от наличието на цинк в граничните клетъчни повърхности и съответно промени в мембранната им цялост и еднородност [2]. Враждането на цинк в молекулната структура на хитозан с голяма молекулна маса посредством хелатен механизъм, може да подсили подтискащата му антибактериална способност спрямо *Salmonella enteritidis*, което би било много предпочитан ефект за хитозан-Zn(II) комплексните съединения при приложението им в областта на медицината и хранително-вкусовата промишленост.

Целта на настоящата разработка е да се изследват антимикробните активности спрямо: грамположителни; грамотрицателни бактерии и плесенни гъби на хитозан-цинкови (CS–Zn) комплексни съединения, като се изучи предимно и се оцени взаимозависимостта между координационното разположение на цинковите йони в граничните повърхности на клетъчните мембрани и активността на комплексното съединение.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Материали

Като изходна суровина за получаване на хитин бе избрана фракция от 0.315-0.5 mm ракообразен скелет от черноморски раци.

Деминерализация

Деминерализацията на суровината е осъществена чрез обработка с 7 % р-р на HCl при $22\text{ }^\circ\text{C}$ в продължение на 24 часа. Обработената фракция се промива с дестилирана вода до $\text{pH}=7$ и се изсушава.

Депротеинизация

Депротеинизацията на хитин се осъществява с 10% р-р NaOH при 60 °С. Обработената фракция се измива с дестилирана вода до рН=7 и се изсушава с горещ разтвор на етанол (10 ml/g).

Получаване на хитозан

Полученият след деминерализация и депротеинизация хитин се обработва с 50 % р-р NaOH при 60 °С в продължение на 24 часа. Обработената фракция се измива с дестилирана вода до рН=7 и се изсушава с горещ разтвор на етанол (10 ml/g).

FTIR спектроскопия

Инфрачервените спектри са определени с помощта на *Tensor 27 Fourier transform infrared spectrometer* (Germany). Сканирането се осъществи в интервал от 4000 до 400 cm^{-1} . Сух и пудрообразен хитозан е смесен с KBr и пресован под вакуум на хомогенни дискове с дебелина 0.5 mm.

Определяне степента на деацетилиране на хитозан

Процентното съдържание на свободни аминогрупи е определяно чрез FTIR-спектроскопски метод. Изчисленията на база получените инфрачервени спектри са осъществявани на основата на следната формула:

$$DD = 87.8 - [3(A_{1655}/A_{3450})] \quad (1)$$

където:

A_{1655} - е инфрачервената ивица на амида разположена близо до 1655 cm^{-1} ;

A_{3450} - е инфрачервената ивица на амида разположена близо до 3450 cm^{-1} .

Получаване на комплексните съединения

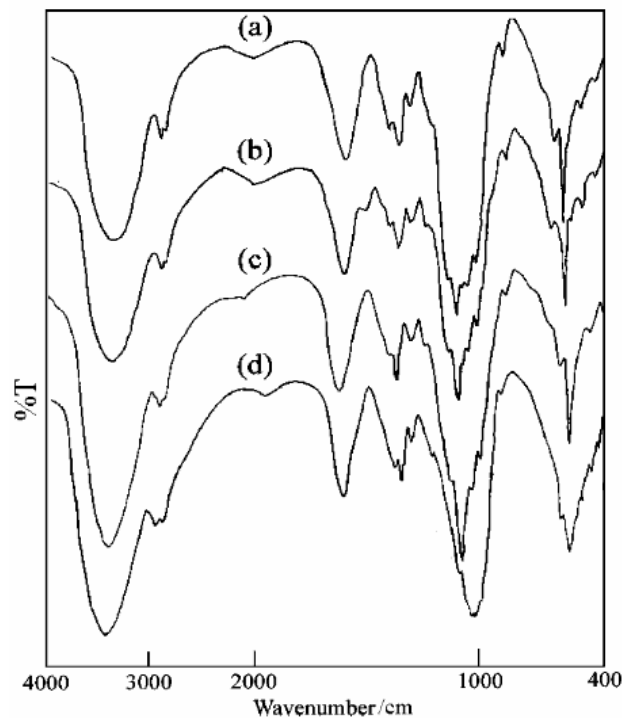
Хитозан в количество 0,3 g се разтваря в 30 cm^3 1 % р-р на оцетна киселина. В този разтвор се добавя при непрекъснато разбъркване и рН= 7.0. необходимото количество ZnCl_2 съответно отговарящо на молни съотношения: 2:1; 1:1; 0.75: 1; 0.5: 1. Сместа се нагрява при непрекъснато разбъркване до 60 °С в продължение на 4 часа и се отдекантира, след което се охлажда до стайна температура и се смесва с 200 cm^3 ацетон. Получената утайка се отделя чрез филтруване. Продуктът се измива многократно с етанол и накрая се изсушава под вакуум до постоянно тегло.

Оценка на антимикробната активност in vitro

Използвана е агаров метод за да се определи минималната концентрация от хитозан-Zn комплекси за инхибиране (MIC) растежа на микроорганизми. Приготвени са разтвори от комплексното съединение с Zn и от чист хитозан в 0.3 % разтвор на солна киселина. След това пробите се поставят в автоклав при 121 °С за 25 min. Двукратно към серията получени разтвори се добавя агарова хранителната среда за микроорганизмите с финална концентрация от 0.2 CS-Zn(a); 0.15 CS-Zn(b); 0.10 CS-Zn(c); 0.05 CS-Zn(d)%. Като еталонен сравнителен разтвор е използван 0.3 % р-р на солна киселина. Култура от всяка бактерия се разтваря в стерилизирана дейонизирана вода. Част от всяка суспензия се впръскват в хранителната среда контактуващи със съответните хитозан-Zn комплексни проби и паралелно към контролните проби само от вода без наличието на хитозан. След това агарните плочки се инкубират при 37°C за 72 h, и се преброяват количествата бактериални колонии. За MIC се счита най-ниската концентрация от съответните хитозан-Zn комплексното съединение, което изцяло инхибира растежа върху агарната плочка в сравнение с контролните проби, като не се имат предвид единични колонии или неясни обособявания от бактерии причинени от изкуствени външни заразявания [11].

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

FTIR спектрите на хитозан-Zn комплекси са представени на фиг.2.



Фиг.2. Инфрачервени спектри на изследваните образци: 0.2 CS–Zn(a); 0.15 CS–Zn(b); 0.10 CS–Zn(c); 0.05 CS–Zn(d)%

Инфрачервената ивица при 3436 cm^{-1} , съответства на вибрационните трептения на $-\text{NH}_2$ групи, а тази при 3400 cm^{-1} съответно на $-\text{OH}$ групите. Абсорбционната ивица при 1617 cm^{-1} отразяващи трептенията на $-\text{NH}_2$ групите [10], е разположена при 1630 cm^{-1} . Това показва, че $-\text{NH}_2$ групите и $-\text{OH}$ групите са свързани като комплексно съединение [14]. Ивицата при 1090 cm^{-1} показваща наличието на $-\text{OH}$ групи е изместена в съществена степен към по нискочестотния спектър, което е подсилено при увеличаване съдържанието на Zn. Това предполага, че $-\text{OH}$ групи са също включени в комплексобразуване [15]. Наблюдават се също така няколко нови абсорбционни ивици в обхвата $530\text{--}535\text{ cm}^{-1}$ и $470\text{--}475\text{ cm}^{-1}$, които се дължат на трептенията на N-Zn и O-Zn (13). Zn(II) обикновено се включва към тетракоординатната схема чрез лиганди. Предлагани са различни модели за обяснение и изясняване на молекулната структура на хитозан и метални йони [9]. Тези хипотетични модели могат да бъдат класифицирани в две основни групи:

- присъединителни свързвания, при които металните йони са свързани с аминогрупите на хитозана;
- мостообразуващо омрежващо свързване, в което металните йони са свързани с две или повече амино- и хидроксилни групи от една или повече хитозанови молекулни вериги като напречни мостове.

Антимикробни активности

Антимикробните активности на хитозан-Zn комплексни съединения са показани в Таблица 1. На база на посочените резултати е установено, че CS–Zn комплекси притежават ефективен широк спектър от антимикробна активност спрямо всички използвани в настоящия тест микроорганизми.

Таблица 1. Антимикробиологична активност на хитозан-Zn комплекси

Култури	Концентрация, %	Брой колонии		
		CS	CS-Zn	ZnCl ₂
Gr ⁻ <i>Escherichia coli</i>	0.2	9	5	4
	0.15	14	8	6
	0.10	16	12	9
	0.05	19	13	11
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.2	8	7	4
	0.15	10	9	6
	0.10	13	11	9
	0.05	19	12	10
Gr ⁺ <i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	7	7	5
	0.15	9	8	6
	0.10	12	11	9
	0.05	14	12	11
<i>Corynebacterium</i>	0.2	7	4	2
	0.15	10	5	6
	0.10	12	9	8
	0.05	12	11	9
<i>Candida albicans</i>	0.2	9	7	5
	0.15	13	10	7
	0.10	16	12	9
	0.05	19	12	11

На база на посочените в Таблица 1 резултати е установено, че CS-Zn комплекси притежават ефективен широк спектър от антимикробна активност спрямо всички използвани в настоящия тест микроорганизми. Вижда се, че комплексните съединения между хитозана и цинк имат по-добра антибактериална активност отколкото антигъбична активност. Няма видимо големи разлики между антибактериалните активности на комплексните съединения спрямо грам-положителните и грам-отрицателните бактерии. *E. coli* най-силно се инхибира от CS-Zn(c). Сравнението между активността на хитозан и ZnCl₂ с тази на комплексното съединение CS-Zn(c) показва, че комплексното съединение CS-Zn(c) притежава много по-голяма антимикробна активност. Установено е, че комплексните съединения са по-активни отколкото хитозан срещу бактериите: *E. coli*; *S. aureus* и *Corynebacterium*, които са инхибирани само от ZnCl₂. Това явление показва, че CS-Zn комплекси не само остават с подсилена активност в сравнение с тази на хитозана.

Предполага се, че антибактериалните механизми на хитозана са свързани с аминокрупите в C-2 позиции на молекулната верига в хитозана. Обособява се поликатионитна структура, която взаимодейства с липополизахаридите и протеините, съдържащи се в клетъчната стена на микроорганизмите. Взаимодействието предизвикано от големите промени в структурата на външните мембрани, причинява освобождаване на основната част от протеиновия материал на клетките. Когато е хелатно свързан с Zn йони, положителният заряд от аминокрупите на хитозана е подсилен. В резултат на това комплексното хитозаново съединение е по-лесно реагиращо с анионните компоненти от клетъчната мембранна повърхност и проявява по-голяма инхибираща активност. Много изследвания се опитват да потвърдят този хипотетичен механизъм. От табличните данни се вижда се, че антимикробните активности на CS-Zn комплекси се подсилват с повишаването на хелатните съотношения. Комплексното съединение с хелатно съотношение 2:1 е четири

пъти по активно от комплекса със съотношение 0.5:1. Установено е, че за повечето тествани микроорганизми идеални инхибиторни ефекти се проявяват когато хелатното съотношение на комплексите е над 1:1. И така подходяща антимикробна активност на CS-Zn комплекс може да бъде постигната контролирайки количеството на цинкова сол при получаването на хитозан-цинковите комплекси.

ИЗВОДИ

В настоящата разработка са синтезирани хитозан-Zn комплексни съединения и е изследвана взимозависимостта между антибактериалната активност и координационната структура при различни хелатни съотношения. Установено е, че антибактериалните активности на Хитозан-Zn(II) комплекси се повишават с повишаване на хелатното съотношение. Идеални инхибиторни ефекти могат да се постигнат когато хелатното съотношение е около стойността 1:1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bautista-Banos, S., A.N. Hernandez-Lauzardo, M.G. Velazquez-del Valle, M. Hernandez-Lopez, E. Ait Barka, E. Bosquez-Molina, 2006, C.L. Wilson, *Crop Protection* **25** p.108–118
2. Faundez, G., M. Troncoso, P. Navarrete, G. Figueroa, 2004, *BMC Microbiol.*, **4**, 19
3. Guibal, E., *Separation and Purification Technology* **38**, p.43–74
4. Juang, R.-S., Wu, F. C., Tsang, R.-L. 1999, Adsorption removal of copper (II) using chitsan from simulated rinse solutions containing chelating agents. *Water Research*, **33** (10), p.2403–2409
5. Li, H. B., Du, Y. M., Wu, X. J., Zhan, H. Y. 2004. Effect of molecular weight and degree of substitution of quaternary chitosan on its adsorption and flocculation properties for potential retention-aids in alkaline papermaking. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemistry. English Aspects*, **242**, p.1–8.
6. Lima, I.S., C. Airolidi, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2003, **229** p.129–136
7. Liu, Y. H., Li, Y. X., Lv, J., Wu, G. D., Li, J. B. 2005. Graft copolymerization of methyl methacrylate onto chitosan initiated by potassium ditelluratocuprate (III). *Journal of Macromolecular Science Pure and Applied Chemistry*, **42**, p.1169–1180
8. Liu, H., J. Bao, Y. Du, X. Zhou, J. F. Kennedy, *Carbohydrate Polymers* **64** (2005) p.553-559
9. Piron, E., Domard, A. 1998. Interaction between chitosan and uranyl ions. Part 2. Mechanism of interaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, **22**, p.33–40
10. Qin, C., Xiao, L., Du, Y., Shi, X., Cheng, J., 2002. A new cross-linked quaternized-chitosan resin as the support of borohydride reducing agent. *Reactive and Functional Polymers*, **50**, p.165–171
11. Senel, S., S. J. McClure, 2004, *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, p.1467–1480
12. Shih, F. Y., & Fung, K. Z. 2006, Effect of chitosan addition on the electrochemical behavior and crystallization of LiMn₂O₄ film derived from acetates-containing solution. *Electrochimica Acta*, **51**, p.6533–6541
13. Speciale, A., Musumeci, R., Blandino, G., Milazzo, I., Caccamo, F., Nicoletti, G. 2002. Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of morifloxacin against aerobic and anaerobic isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **19**, p.111–118
14. Tang, L.-G., & Hon David, N.-S. 2001,. Chelation of chitosan derivatives with zinc ions. II. Association Complexes of Zn²⁺ onto O, N-Carboxymethyl chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, **79**, p.1476–1485
15. Wang, A., Zhou, J., Yu, X. 2000, Coordination of fully deacetylated chitosan with Zn (II) ions. *Acta Polymerica Sinica*, **6**, p.688–691