

# تحضير وتوصيف الكيتوزان المحور للتطبيقات الحيوية

حصه فهد نصير الشريف

بحث مقدم لنيل درجة الدكتوراه في فلسفة العلوم

الكيمياء [الكيمياء العضوية]

كلية العلوم للبنات

جامعة الملك عبد العزيز - جدة

صفر 1432 هـ - يناير 2011 م

# **Preparation and Characterization of Modified Chitosan for Bioactive Applications**

**Hossa Fahad Nosair Al Shareef**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Degree of Doctor of Philosophy (Organic Chemistry)**

**Supervised by**

**Prof. Magdy Y. Abdelaal**

**Prof. Tariq R. Sobahi**

*Professor of Organic Chemistry*

*Professor of Organic Chemistry*

**Chemistry Department, Faculty of Science**

**King Abdulaziz University**

**Jeddah, KSA**

**1432 – 2011**

## قائمة المحتويات

| الصفحة | العنوان  |
|--------|--|
| أ      | نموذج إجازة الرسالة  |
| ب      | إهداء  |
| ج      | شكر وتقدير   |
| د      | المستخلص   |
| و      | قائمة المحتويات  |
| ي      | قائمة الأشكال  |
| م      | قائمة الجداول  |
| ن      | قائمة المخططات   |
| س      | قائمة الرموز والمصطلحات                                      |
| 1      | الفصل الأول  |
| 1      | المقدمة  |
| 1      | 1.1. مصدر الكيتوزان  |
| 4      | 1.2. تحضير الكيتوزان   |
| 6      | 1.3. خصائص الكيتوزان   |
| 6      | 1.3.1. الخواص الفيزيائية والكيميائية للكيتوزان               |
| 9      | 1.3.2. ذوبانية الكيتوزان                                     |
| 11     | 1.3.3. إعادة الأستلة   |
| 12     | 1.3.4. الوزن الجزيئي للكيتوزان                               |
| 13     | 1.3.5. تأثير pH على الكيتوزان                                |
| 15     | 1.4. تحويرات الكيتوزان                                       |
| 15     | 1.4.1. تفاعل ميلارد Maillard reaction                        |
| 15     | 1.4.2. أمينة الكيتوزان                                       |
| 16     | 1.4.3. ازدواج الكيتوزان مع N-nicotinoyl-L-or D-phenylalanine |
| 18     | 1.5. تحضير مشتقات الكيتوزان                                  |
| 18     | 1.5.1. تحضير N-أسيل كيتوزان                                  |
| 20     | 1.5.2. تحضير حبيبات الكيتوزان                                |
| 21     | 1.5.3. تحضير أفلام نانوية من الكيتوزان                       |
| 22     | 1.5.4. تحضير الكيتوزان ذي الطبقات المتعددة                   |
| 22     | 1.5.5. تحضير كبريتات الكيتوزان                               |
| 23     | 1.5.5.1. تفاعل الكيتوزان مع الإيمينوثيولان (2-iminothiolane) |

|    |  |
|----|--|
| 24 | 1.5.5.2. التركيبات النانوية لثيولات الكيتوزان / DNA                  |
| 25 | 1.5.5.3. تفاعل الكيتوزان مع الثيوربا                                 |
| 25 | 1.5.6. تحضير مشتق الكيتوزان مع الجوانيديين (Guanidinylated Chitosan) |
| 27 | 1.5.7. تحضير ألكيل الكيتوزان الرباعي                                 |
| 30 | 1.5.8. تحضير كربوكسي ميثيل كيتوزان-g-أكريلاميد (30)(Ac-g-CMCS)       |
| 32 | 1.5.9. تحضير كربوكسي ميثيل الكيتوزان (N,O-carboxymethyl)chitosan     |
| 32 | 1.5.10. تحضير فوسفات الكيتوزان ومشتقاته                              |
| 35 | 1.5.11. تفاعل الكيتوزان مع فوق اكسيد الهيدروجين                      |
| 35 | 1.5.12. تفاعل الكيتوزان مع عديد أمينو بروبايل إيثوكسي سيلوكسان       |
| 35 | 1.5.13. تفاعل الكيتوزان مع عديد أكريلونيتريل (PAN)                   |
| 36 | 1.6. تطبيقات الكيتوزان ومشتقاته                                      |
| 36 | 1.6.1. صناعياً   |
| 36 | 1.6.1.1. إزالة الصبغات   |
| 36 | 1.6.1.2. إنتاج الأفلام الصناعية المختلفة                             |
| 37 | 1.6.1.3. في مجال الكهرباء والأجهزة البصرية وهندسة الأنسجة            |
| 37 | 1.6.1.4. إمتزاز أيونات المعادن                                       |
| 41 | 1.6.1.5. التعبئة والتغليف  |
| 41 | 1.6.2. طبياً   |
| 41 | 1.6.2.1. إفراز الإنسولين الفمي                                       |
| 42 | 1.6.2.2. إصلاح العضاريف والخلايا الجزعية                             |
| 42 | 1.6.2.3. معالجة كسور العظام  |
| 43 | 1.6.2.4. التصوير بالرنين المغناطيسي                                  |
| 43 | 1.6.2.5. تكوين أفلام نانوية تحاكي الجلد                              |
| 44 | 1.6.2.6. العلاج بالجينات   |
| 44 | 1.6.2.7. علاج القرحة والسرطان  |
| 45 | 1.6.2.8. تخفيف الوزن   |
| 45 | 1.6.2.9. علاج الخلايا الحية  |
| 46 | 1.6.2.10. العناية بالبشرة  |
| 46 | 1.6.2.11. الهندسة العلاجية   |
| 47 | 1.6.2.12. زيادة الثبات تجاه الأنزيمات                                |
| 47 | 1.6.3. بيولوجياً   |
| 50 | 1.6.3.1. تقليل الجراثيم من الأطعمة البحرية                           |
| 50 | 1.6.3.2. الحفاظ على الحياة البحرية والبرية                           |

|    |   |
|----|---|
| 50 | 1.6.3.3. تقليل نشاط الفطريات داخل الفاكهة                             |
| 50 | 1.6.3.4. تحسين التطبيقات الحيوية الطبية                               |
| 52 | 1.7. الترابط العرضي للكيروزان   |
| 52 | 1.7.1. باستخدام الكولاجين   |
| 52 | 1.7.2. باستخدام الإيثيلين جلايكول                                     |
| 58 | 1.7.3. باستخدام القلترأدهيد   |
| 60 | 1.8. تطعيم الكيروزان  |
| 60 | 1.8.1. باستخدام اللاكتيد  |
| 60 | 1.8.2. باستخدام الدكستران الحلقي                                      |
| 65 | 1.9. تطعيم الكيروزان المحور   |
| 65 | 1.9.1. باستخدام المونمرات الفينيلية                                   |
| 65 | 1.9.2. باستخدام مشتق عديد الإيثيلين جلايكول                           |
| 68 | هدف البحث   |
| 69 | الفصل الثاني  |
| 69 | التجارب العملية Experimental Methods                                  |
| 69 | 2.1. المواد المستخدمة   |
| 71 | 2.2. الأجهزة المستخدمة  |
| 71 | 2.3. توليفات الكيروزان مع الكربوهيدرات                                |
| 72 | 2.4. توليفة الكيروزان مع ثلاثي خلات السيليلوز                         |
| 72 | 2.5. تفاعل بوش للكيروزان مع الأدهيدات (Bosch Reduction)               |
| 73 | 2.6. تحويل الكيروزان بأنهدريد حمض الفيثاليك                           |
| 74 | 2.7. تحويل الكيروزان بجلايسيدائل ثلاثي ميثيل كلوريد الأمونيوم (GTMAC) |
| 74 | 2.8. المعالجة الفيزيائية للكيروزان                                    |
| 74 | 2.8.1. استخدام الماء كوسط للمعالجة                                    |
| 75 | 2.8.2. استخدام البنزين كوسط للمعالجة                                  |
| 76 | 2.8.3. استخدام الإيثر البترولي كوسط للمعالجة                          |
| 78 | 2.9. تحويل الكيروزان إلى مشتقات حمض السكسينك                          |
| 78 | 2.9.1. مع حمض السكسينك  |
| 78 | 2.9.2. مع حمض ثنائي ميركابتوسكسينك                                    |
| 79 | 2.10. معالجة الكيروزان بالمحاليل المائية لأيونات بعض المعادن          |
| 80 | 2.11. التأثير البيولوجي لمشتقات الكيروزان                             |
| 81 | 2.11.1. التأثير البيولوجي لمشتقات الكيروزان على الفطريات والخمائر     |
| 82 | 2.11.2. التأثير البيولوجي لمشتقات الكيروزان على نمو البكتيريا         |

|     |  |
|-----|--|
| 84  | الفصل الثالث   |
| 84  | النتائج والمناقشة  |
| 84  | 3.1. توليفات الكيتوزان   |
| 84  | 3.1.1. توليفات الكيتوزان مع الكربوهيدرات   |
| 85  | 3.1.1.1. تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR)                                      |
| 90  | 3.1.1.2. التحليل الحراري (Thermal Analysis)  |
|     | 3.1.1.3. التصوير بالميكروسكوب الإلكتروني الماسح لتوليفات الكيتوزان مع الكربوهيدرات |
| 92  |  |
| 97  | 3.2. تحضير توليفة الكيتوزان مع ثلاثي خلات السيليلوز (77)                           |
| 98  | 3.3. تفاعل بوش للكيتوزان مع الأدهيدات (Bosch Reduction)                            |
| 99  | 3.3.1. تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR)  |
| 101 | 3.3.2. التحليل الحراري (Thermal Analysis)  |
| 103 | 3.3.3. التصوير بالميكروسكوب الإلكتروني الماسح لمشتقات الكيتوزان مع الأدهيدات       |
| 105 | 3.4. تحوير الكيتوزان مع أنهريد حمض الفيثاليك                                       |
| 107 | 3.5. تحوير الكيتوزان بجلايسيدال ثلاثي ميثيل كلوريد الأمونيوم (GTMAC)               |
| 110 | 3.6. المعالجة الفيزيائية للكيتوزان   |
| 110 | 3.6.1. استخدام الماء كوسط للمعالجة   |
| 113 | 3.6.2. استخدام البنزين كوسط للمعالجة   |
| 113 | 3.6.2.1. توصيف نواتج المعالجة بالبنزين باستخدام FT-IR                              |
| 115 | 3.6.2.2. توصيف نواتج المعالجة بالبنزين باستخدام SEM                                |
| 117 | 3.6.3. استخدام الإيثر البترولي كوسط للمعالجة                                       |
| 126 | 3.7. تحوير الكيتوزان إلى مشتقات حمض السكسينك                                       |
| 127 | 3.7.1. تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR)  |
| 129 | 3.7.2. التحليل الحراري (Thermal Analysis)  |
|     | 3.7.3. التصوير بالميكروسكوب الإلكتروني الماسح لمشتقات الكيتوزان مع الأحماض         |
| 130 |  |
| 132 | 3.8. معالجة الكيتوزان بالمحاليل المائية لأيونات بعض المعادن                        |
| 134 | 3.9. دراسة التأثير البيولوجي لبعض مشتقات الكيتوزان                                 |
| 149 | استنتاجات وتوصيات  |
| 150 | قائمة المراجع LIST OF REFERENCES   |

## المستخلص

تهدف هذه الرسالة إلى تحضير مشتقات جديدة من الكيتوزان لما له من أهمية في مختلف التطبيقات الطبية والحيوية . تضمنت الدراسة تحضير توليفات (blend) من الكيتوزان مع مركبات عضوية مختلفة مثل بعض الكربوهيدرات (سكريات أحادية وثنائية ومتعددة) وبعض الأدهيدات الأروماتية (بنزالدهيد وسالسالدهيد وبارا-نيتروبنزالدهيد) والأليفاتية (أسيتالدهيد وحمض الجلايوكسال) وبعض الأحماض (حمض السكسينك وحمض ثنائي ميركاتبوتوسكسينك) وبعض أنهيدريدات الأحماض الكربوكسيلية (أنهيدريد حمض الخليك وأنهيدريد حمض الفيتاليك) . أمكن تحضير مشتق ملح الأمونيوم الرباعي للكيتوزان القابل للذوبان في الماء من جلايسيديل ثلاثي ميثيل كلوريد الأمونيوم . تم إجراء ترابط عرضي للمشتقات السابقة باستخدام القلترالدهيد وكذلك دراسة إمكانية استخدامها التطبيقية . تشمل الدراسة أيضا معالجة الكيتوزان بالمذيبات العضوية المختلفة مثل الميثانول والإيثانول والإيثرات البترولية والبنزين ودراسة تأثير تلك المعالجة على مساحة سطح وحجم حبيبات الكيتوزان حيث انعكس ذلك على كفاءة التفاعلات العضوية التي تتم على الكيتوزان ومشتقاته وكذا على إمكانية تحضير حبيبات ميكروئية أونانوية من الكيتوزان. تم توصيف نواتج تحويل الكيتوزان عن طريق التحاليل الطيفية والحرارية والميكروسكوبية . تم استخدام المواد الناتجة في تطبيقات فصل وعزل بعض أيونات المعادن الانتقالية من محاليلها المائية حيث استخدمت المحاليل المائية لملاح نترات كل من النحاس والكوبالت والنيكل والرصاص كأمثلة لأيونات بعض المعادن الانتقالية . تم حساب سعة البوليمر من تلك الأيونات بعد التقدير الراجع لتركيز أيونات المعادن المقابلة في المحاليل المائية المستخدمة في المعالجة عن طريق تقنية ICP-AES . أيضا تمت دراسة التأثير البيولوجي لبعض مشتقات الكيتوزان على أنواع مختلفة من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والخمائر والفطريات في بيئتين مناسبتين للكائنات الحية الدقيقة قيد الدراسة في وجود مصدر كربوني وكذلك في عدم وجوده . تم اختيار *Aspergillus niger* و *Burkholderia cepaci* و *Candida albicans* كأمثلة للكائنات الحية الدقيقة كما تم وصف تأثير مشتقات الكيتوزان على تلك الكائنات الحية الدقيقة وتفسيرها .

## استنتاجات وتوصيات

يمكن الحصول على الكيتوزان بسهولة من مصادر رخيصة وبالتالي وقد أجريت هذه الدراسة للوقوف على ما يمكن الاستفادة منه . وبعد تبويب النتائج العملية ومناقشتها أمكن استخلاص التوصيات التي يمكن الاستفادة منها في المجالات الطبية والصناعية المختلفة وأن تكون محفزا لمزيد من الدراسة في هذا المجال الخصب وفيما يلي أهمها:

- يمكن تحضير توليفات من الكيتوزان مع الكربوهيدرات وإيثيل سيليلوز بسهولة وكذلك المترابطة عرضيا مع احتفاظها بخواص الكربوهيدرات التي لا تدخل في الترابط العرضي
- أثبت التحليل الحراري وSEM أن معظم توليفات الكيتوزان مع الكربوهيدرات كانت متجانسة وكذلك كانت قابلة للتحلل الحراري بشكل كامل تقريبا على مدى فترة القياس
- يمكن تحضير مشتقات متعددة من الكيتوزان بالتحوير الكيميائي مع ألدهيدات أليفاتية وأروماتية وكذلك أحماض كربوكسيلية مثل أحماض الفيثاليك والسكسينك . وقد أثبت التحليل الحراري ثبات هذه المشتقات حراريا لدرجة كبيرة وكذلك أثبتت صور SEM أنها ذات مساحة سطح عالية مما يضيف عليها نشاطا كيميائيا وفيزيائيا معقولا
- يمكن تحويل الكيتوزان إلى مشتقات متعددة مثل أملاح الأمونيوم الرباعية واستخدامها في تطبيقات عدة مثل الاستحواز على أيونات بعض المعادن الثقيلة من محاليلها المائية وكذلك التطبيقات البيولوجية
- يمكن الحصول على الكيتوزان ومشتقاته بأحجام ميكروئية بسهولة عن طريق معالجتها بمذيبات عضوية مختلفة إذ أثبت الإيثر البترولي كفاءة جيدة في هذا الاتجاه عن غيره من المذيبات الأخرى ويمكن بالتحكم في العوامل المؤثرة الوصول إلى حبيبات نانوية
- أظهر الكيتوزان ومعظم مشتقاته تأثيرا واضحا على بعض الكائنات الحية الدقيقة حيث كان لها تأثيرا متدرجا وصل أحيانا إلى حد التثبيط الكامل أو الإماتة حسب نوع الكائن الحي الدقيق وكذلك نوع مشتق الكيتوزان . يحتاج هذا المجال لدراسة وشاملة لمعرفة تأثير الكيتوزانات على النمو البيولوجي للكائنات الحية الدقيقة وكيفية الاستفادة منها.



## ABSTRACT

The thesis is aiming to prepare new Chitosan derivatives of known important and beneficial characteristics in medicinal and bio-applications. The current study includes preparation of some blends of Chitosan with different organic compounds such as carbohydrates (mono-, di- and polysccharides), aromatic aldehydes (benzaldehyde, salicylaldehyde and p-nitrobenzaldehyde) and aliphatic aldehydes (acetaldehyde and glyoxalic acid), carboxylic acids (succinic acid and dimercaptosuccinic acid) and some acid anhydrides (acetic anhydride and phtahlic anhydride). Water-soluble Chitosan derivative with glycidyltrimethylammonium chloride has been also prepared. The obtained products have been crosslinked by using glutaraldehyde and their ability for utilization in different applications has been studied. Chitosan has been also treated with different organic solvents such as alcohols, petroleum ethers and benzene and the impact of such treatment on the surface area and particle size of Chitosan has been reported. This treatment reflected on the yield of the reactions of Chitosan and its derivatives and on the possibility to prepare Chitosan particles on the micro- and nano-level as well. The modified Chitosans have been characterized through spectroscopic, microscopic and thermal analyses. The obtained materials have been applied for separation and isolation of some transition metal ions from their aqueous solutions. Aqueous solution of copper, cobalt, nickel and lead nitrates were used as representative examples of the transition metal ions. The polymer capacity of such metal ions has been calculated after back determination of the corresponding metal ion concentration in the aqueous solutions used for treatment by using ICP-AES analysis. Biological activity of some Chitosan derivatives on some types of micro-organism such as bacteria, yeasts and fungi has been investigated in two media suitable to the investigated micro-organism either with or without carbon source. *Aspergillus niger*, *Burkholderia cepaci* and *Candida albicans* were used as representative examples for the micro-organisms. The effect of Chitosan derivatives on the micro-organism has been explained and justified.

## Summary

The thesis includes three main chapters namely the Introduction, Experimental Part and the Results and Discussion in addition to a complete list of references.

### **Introduction:**

It includes a literature survey covering the Chitosan resources which is mainly Chitin present in Crustaceans and cellular walls of some fungi such as yeast. It covers also the main methods used in the production of Chitosan and its main characteristics such as insolubility in water whereas it can be dissolved in the acidic aqueous solutions in addition to its ability for biodegradation by enzymes and possibility of Chitosan to be converted into different physical forms such as thin film and membrane either in the micro- or in the nano- scale thicknesses, particle and even fibers.

This chapter covers also the main modification reactions of Chitosan such as Maillard reaction, amination of Chitosan, coupling of Chitosan with Nicotinic acid and D-phenylalanine in addition to grafting of Chitosan with some materials such as glutaraldehyde, lactides and collagen.

On the other hand, some important applications of Chitosan and its derivatives have been mentioned such as applications in the field of biomedicine, blood compatibility, anti-bacterial, anti-viral, anti-cancer and anti-thrombogenic applications. Besides it is useful in the separation and preconcentration of transition metal ions.

## **Experimental Part:**

It includes description of the reactions conducted on Chitosan such as Bosch reaction, reaction of Chitosan with some carbohydrates and aldehydes in addition to the reaction with some carboxylic acids and anhydrides. Also, controlling the particle size and surface area of Chitosan before its chemical modification has been described. In addition, characterization of the obtained derivatives by the necessary chemical, spectroscopic and microscopic methods has been described.

## **Results and Discussion:**

In this chapter the obtained results have been discussed to prove achieving the following main points targeted from the thesis.

- 1- Preparation of blends of Chitosan with different organic compounds such as different carbohydrates, some aromatic and aliphatic aldehydes, some organic acids namely dimercaptosuccinic and succinic acids and some acid anhydrides. Crosslinking of the products by using glutaraldehyde and their utilization ability in different applications has been also discussed.
- 2- Investigation of the effect of Chitosan solubility in different organic solvents such as alcohols, petroleum ethers and benzene on the surface area and particle size of Chitosan particles and the effect of such parameters on the reaction yield of Chitosan and its derivatives.
- 3- Possibility to prepare Chitosan particles on the micro- and nano-scale and its characterization.
- 4- Investigation of the bioactivity of Chitosan and its derivatives on some types of bacteria, yeasts and fungi.

- 5- Characterization of the modification products by spectroscopic and thermal analyses.
- 6- Preparation of Chitosan derivative with glycidyltrimethylammonium chloride widening their applications due to its solubility in water.
- 7- Utilization of Chitosan derivatives in the separation and isolation of some transition metal ions from their aqueous solutions.
- 8- Study some the bioactivity of Chitosan and its derivatives on some types of bacteria, yeasts and fungi.

At the end of the thesis there is a complete list of references represents the sources of the mentioned information and methods.

**(ملخص عربي)**