

УДК 541(49+64):539.2

10.15407/polymerj.40.04.240

Структура та антимікробні властивості мідьвмісних полімерних наноконкомпозитів

В.Л. Демченко, В.І. Штомпель, Л.А. Гончаренко, С.М. Кобилінський, С.В. Рябов

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

*Досліджено особливості структурної організації та антимікробні властивості мідьвмісних полімерних наноконкомпозитів, сформованих методами хімічного та термохімічного відновлення іонів металів у поліелектроліт-металічних комплексах пектин– Cu^{2+} –поліетиленімін. Показано, що при хімічному відновленні іонів Cu^{2+} формуються наноконкомпозити типу ядро-оболонка $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$, при цьому структурний прояв металічної фази Cu реалізується повною мірою за мольного співвідношення $\text{VN}_4^-:\text{Cu}^{2+}=6$ і тривалості відновлення 2 год. Виявлено, що при термохімічному відновленні іонів Cu^{2+} оптимальними параметрами є температура 170 °С і час 30 хв. Дослідження отриманих наноконкомпозитів показали високу антимікробну активність щодо штамів *S. aureus* і *E. coli*.*

Ключові слова: поліелектролітні комплекси, поліелектроліт-металічні комплекси, мідьвмісний наноконкомпозит, структура, антимікробна активність.

Вступ.

Останнім часом значного розвитку в галузях нанохімії та нанотехнології набув напрям формування полімерних наноконкомпозитів. Серед таких матеріалів особливе місце посідають металонаповнені полімерні наноконкомпозити, що пояснюється їхніми унікальними властивостями і широкою сферою застосування (для проектування каталітичних систем, а також в оптоелектроніці й нанофотоніці) [1, 2]. При наповненні полімерних матриць наночастинками срібла й міді вони набувають нових надзвичайно цінних властивостей і можуть використовуватися як ефективні антибактеріальні та противірусні препарати у медицині, фармакології та біохімії [3, 4], а тому потребують фундаментального дослідження й вивчення їхніх структури, морфології і антимікробних властивостей.

Метою цієї роботи було вивчення особливостей структурної організації та антимікробної активності (щодо штамів *S. aureus* та *E. coli*) полімерних плівок на основі поліелектролітних комплексів і наночастинок міді, отриманих методами хімічного та термохімічного відновлення іонів міді у поліелектроліт-металічних комплексах.

Експериментальна частина.

Для отримання поліелектролітних комплексів (ПЕК) використовували слабкі поліелектроліти: аніонний поліелектроліт – пектин цитрусовий виробництва “Cargill Deutschland GmbH” (Німеччина), $M = 3 \cdot 10^4$; катіонний поліелектроліт – поліетиленімін (ПЕІ) розгалуженої будови (безводний) виробництва фірми “Aldrich”, $M_n = 1 \cdot 10^4$, $M_w = 2,5 \cdot 10^4$.

Плівки ПЕК формували шляхом змішування 5 %-вих водних розчинів пектину і ПЕІ, взятих за мольного співвідношення 1:1, за $T = 20 \pm 2$ °С. Отримані таким чином ПЕК виливали на політетрафторетиленові пластини й сушили за тієї ж температури до сталої маси. Сухі плівки ПЕК промивали в дистильованій воді до досягнення нейтрального рН і знову сушили за такої ж температури до сталої маси. Товщина плівок ПЕК становила 100 мкм.

Зразки поліелектроліт-металічних комплексів (ПМК) отримували, занурюючи плівки ПЕК у водний розчин солі CuSO_4 за концентрації 0,1 моль/л. При цьому прозорі безбарвні плівки ПЕК набували темно-синього кольору.

Хімічне відновлення іонів Cu^{2+} в об'ємі ПМК виконували за допомогою борогідриду натрію. У результаті відновлення плівки ПЕК, які містили CuSO_4 , змінювали колір із синього на темно-коричневий.

Термохімічне відновлення іонів Cu^{2+} в об'ємі ПМК здійснювали шляхом нагрівання плівок у діапазоні температур 120–190 °С протягом 30 хв. Зразки нагрівали в пічці за допомогою терморегулятора VRT-3. Точність вимірювання температури становила $\pm 0,5$ °С.

Сорбційну ємність (A , ммоль/г) плівок обчислювали за формулою:

$$A = (C_n - C_p)V/m,$$

де: m – наважка сорбенту; V – об'єм розчину; C_n і C_p – початкова й рівноважна концентрація іонів міді.

Сорбційна ємність досліджуваних плівок становила 2,9 ммоль/г.

Особливості структурної організації мідьвмісних нанокompatитів вивчали методом ширококутової рентгенівської дифракції на дифрактометрі ДРОН-4-07, рентгенооптична схема якого виконана "на проходження" первинного пучка випромінювання крізь досліджуваний зразок. Рентгеноструктурні дослідження проводили в CuK_α -випромінюванні, монохроматизованому Ni-фільтром, за $T = 20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Антимікробну активність мідьвмісних нанокompatитів, отриманих методом хімічного та термохімічного відновлення іонів металів у ПМК, вивчали щодо референтних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 та *Escherichia coli* ATCC 35218 як модельних грампозитивних і грамнегативних бактерій. Дослідження виконували методом дифузії в агар на твердому поживному середовищі LB (Luria-Bertani). Чашки Петрі з поживним середовищем LB засівали $10 \mu\text{L}$ інюкуляту тест-мікроорганізмів *S. aureus* та *E. coli* з розрахунку $2 \cdot 10^5$ КУО/мл. Плівки нанокompatитів розміром 10×10 мм поміщали на поверхню поживного середовища, засіяного тест-мікроорганізмами. Чашки інкубували 24 год за температури 37°C . Показником антимікробної активності була наявність чіткої зони, вільної від мікроорганізмів, навколо плівки мідьвмісного нанокompatиту. Контролем слугувала плівка ПЕК.

Результати дослідження та їх обговорення.

Раніше в роботі [5] методом рентгеноструктурного аналізу нами було встановлено, що в результаті хімічного відновлення іонів Cu^{2+} в поліелектроліт-металічних комплексах за допомогою NaBH_4 формуються нанокompatити на основі поліелектролітного комплексу пектин-ПЕІ і наночастинок типу ядро-оболонка $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$. Аналіз рентгенівських дифрактограм показав

залежність структури наночастинок від співвідношення $\text{BH}_4^-/\text{Cu}^{2+}$ у системі. Виявлено, що структурний прояв металічної фази Cu повною мірою реалізується за мольного співвідношення $\text{BH}_4^-/\text{Cu}^{2+} = 6$ (рис. 1).

У зв'язку з цим були проведені дослідження з отримання мідьвмісних нанокompatитів за оптимального мольного співвідношення $\text{BH}_4^-:\text{Cu}^{2+} = 6$ залежно від тривалості відновлення. З аналізу ширококутових рентгенівських дифрактограм (рис. 2) видно, що навіть за мінімальної тривалості відновлення (40 хв) відбувається повне відновлення іонів Cu в поліелектроліт-металічних комплексах і формування нанокompatиту типу ядро-оболонка $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$. На це вказує відсутність дифракційного максимуму при $2\theta_m \sim 11,2^\circ$, який характеризує структуру поліелектроліт-металічних комплексів і наявність дифракційних максимумів за $2\theta_m \sim 36, 41, 43, 50, 1^\circ$, які характеризують структуру Cu та Cu_2O відповідно (крива 3). Показано, що прояв металічної фази Cu повною мірою реалізується за тривалості відновлення 2 год. Подальше збільшення часу відновлення до 2 год 30 хв і 3 год не приводить до зміни структури нанокompatиту. Отже, за даними методу ширококутового розсіювання рентгенівських променів встановлено, що при формуванні нанокompatитів ПЕК- $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$ оптимальний час відновлення іонів міді у ПМК становить 2 год.

Для отримання мідьвмісних нанокompatитів також використовували метод термохімічного відновлення іонів Cu^{2+} в поліелектроліт-металічних комплексах. На рентгенівських дифрактограмах поліелектроліт-металічних комплексів, підданих температурі $120\text{--}160^\circ \text{C}$ протягом 30 хв (рис. 3, криві 3–6), спостерігається значне послаблення інтенсивності дифракційного максимуму,

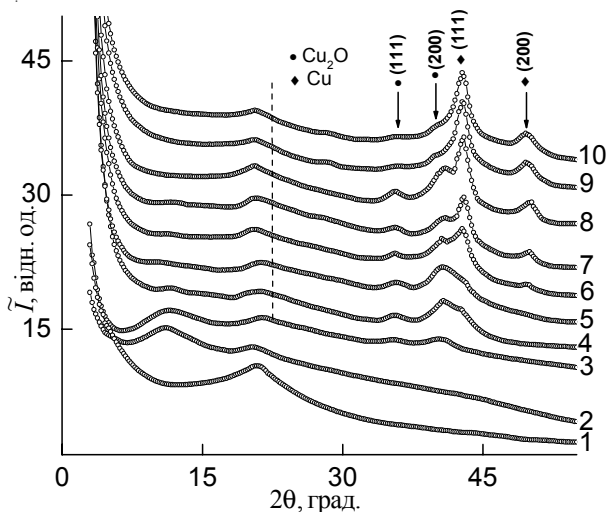


Рис. 1. Ширококутові рентгенівські дифрактограми ПЕК (1), ПМК (2) і мідьвмісних нанокompatитів, отриманих методом хімічного відновлення іонів міді за мольного співвідношення $\text{BH}_4^-/\text{Cu}^{2+}$: 0,5 (3); 1 (4); 2 (5); 3 (6); 4 (7); 5 (8); 6 (9) і 10 (10)

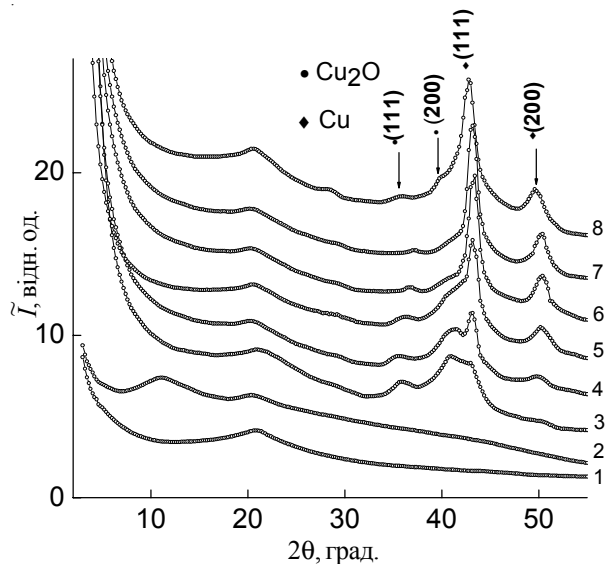


Рис. 2. Ширококутові рентгенівські дифрактограми ПЕК (1), ПМК (2) і мідьвмісних нанокompatитів, отриманих методом хімічного відновлення іонів міді за тривалості відновлення: 40 хв (3); 1 год (4); 1 год 30 хв (5); 2 год (6); 2 год 30 хв (7) і 3 год (8)

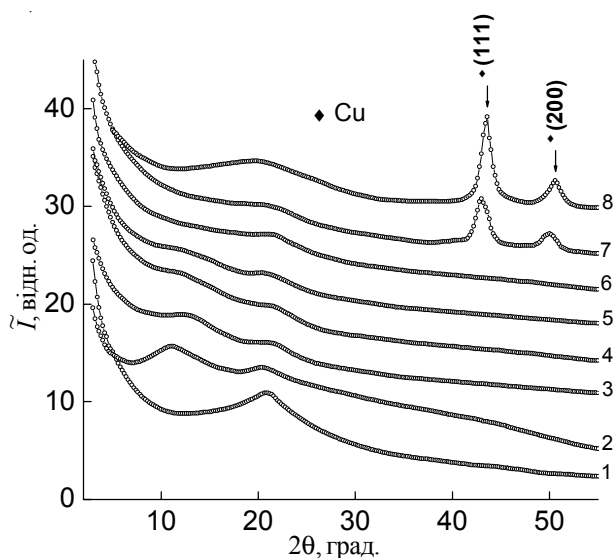


Рис. 3. Ширококутові рентгенівські дифрактограми ПЕК (1), ПМК (2) та мідьмісних наноккомпозитів, отриманих методом термохімічного відновлення іонів міді протягом 30 хв за температури: 120 (3); 140 (4); 150 (5); 160 (6); 170 (7) і 190 °C (8)

який характеризує існування поліелектроліт-металічних комплексів, зі зміщенням його в область більших кутів розсіювання рентгенівських променів (2θ) з 11,2 до 13,0°, і, відповідно, зі зменшенням середньої величини бреггівської відстані між ланцюгами макромолекул, координуваних іонами Cu^{2+} , з 7,9 до 6,8 Å. Крім того, в область більших кутів розсіювання зміщується аморфне гало, яке характеризує близький порядок фрагментів макромолекулярних ланцюгів аніонного й катіонного поліелектролітів при розміщенні їх в об'ємі ПЕК з $2\theta_m \sim 20,5$ до 21,6°. Це вказує на тенденцію зменшення бреггівської відстані між ланцюгами цих макромолекул з 4,3 до 4,1 Å. На рентгенівській дифрактограмі наноккомпозиту ПЕК–Cu, отриманого за $T = 170$ °C, відсутній дифракційний максимум за $2\theta_m \sim 11,2^\circ$, характерний для вказаних поліелектроліт-металічних комплексів, і наявні два дифракційні максимуми за $2\theta_m = 43,0$ і $50,0^\circ$, що відповідають кристалографічним площинам гранецентрованої кубічної ґратки міді, які характеризуються індексами 111 і 200 відповідно і підтверджують наявність металічної міді в полімерній системі. Для наноккомпозиту ПЕК–Cu, отриманого за $T = 190$ °C, спостерігається дещо інша дифракційна картина: відбувається уширення дифракційного максимуму, що характеризує близьке упорядкування фрагментів макромолекулярних ланцюгів аніонного й катіонного поліелектролітів у складі ПЕК і зміщення його в область менших кутів розсіювання рентгенівських променів (2θ) з 21,6 до 19,8°, а, відповідно, і збільшення середньої величини бреггівської відстані між макромолекулярними ланцюгами з 4,1 до 4,5 Å (криві 7, 8). Це може свідчити про руйнування поліелектроліт-металічних систем. Також на дифрактограмі цього наноккомпозиту наявні

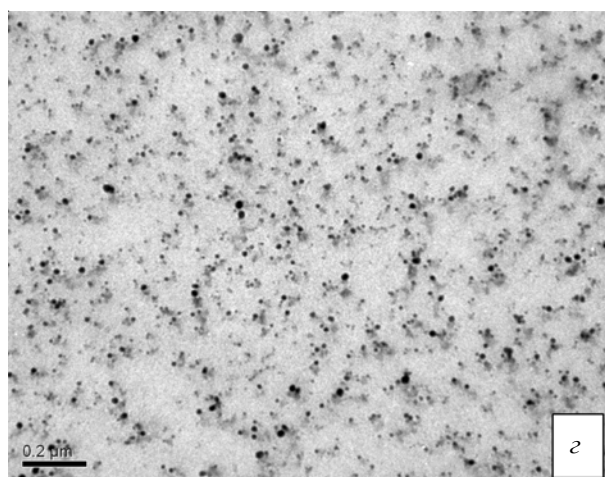
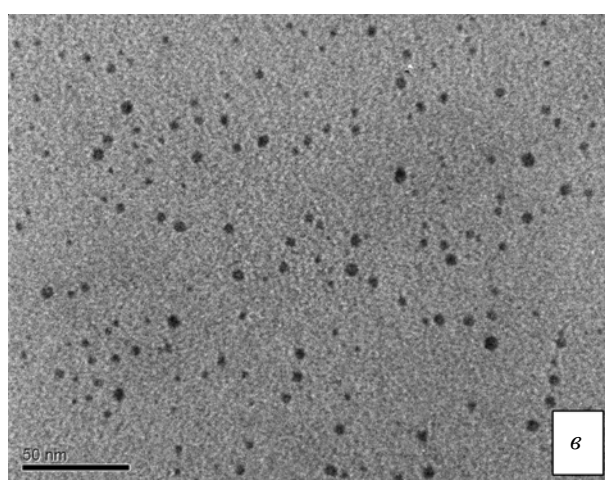
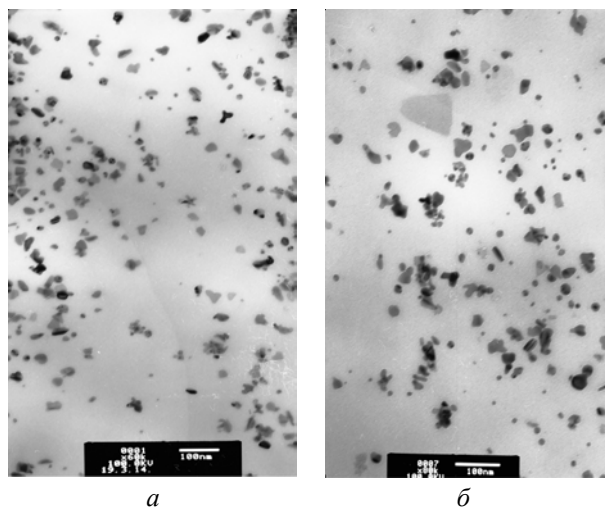


Рис. 4. Мікрофотографії TEM мідьмісних наноккомпозитів, отриманих при хімічному відновленні (а, б) та термохімічному відновленні (в, г) іонів міді в ПМК

дифракційні максимуми, що характеризують структуру металічної міді, але зміщені на $0,6^\circ$ в бік більших кутів, що, ймовірно, свідчить про агрегацію наночастинок міді.

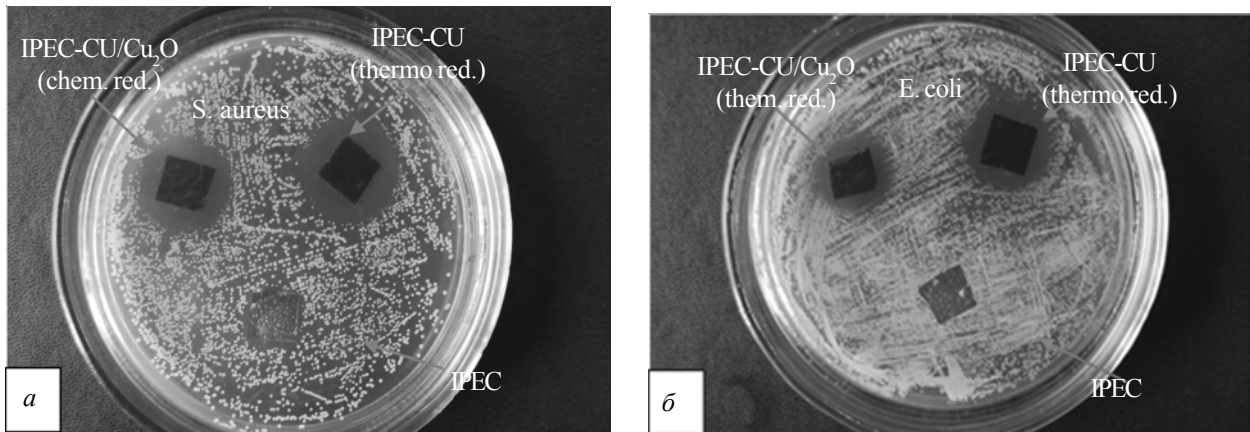


Рис. 5. Зображення результатів випробування антимікробної активності для мідьвмісних нанокompatитів, отриманих шляхом хімічного та термохімічного відновлення іонів міді, проти штамів *E. coli* (а) та *S. Aureus* (б)

Отже, за даними ширококутової рентгенографії можна зробити висновок, що оптимальна температура для відновлення іонів Cu^{2+} у ПМК з подальшим формуванням нанокompatиту становить 170°C .

Механізм термохімічного відновлення полягає у передачі електронів від атомів азоту аміногруп поліетиленіміну до іонів Cu^{2+} при руйнуванні поліелектроліт-металічних комплексів за температури 170°C і вище.

Перетворення ПМК на мідьвмісні нанокompatити підтверджують мікрофотографії (рис. 4).

Для ефективного застосування отриманих мідьвмісних полімерних нанокompatитів у галузях медицини, фармакології й біохімії слід було оцінити їхню біологічну активність. Встановлено, що антимікробні властивості щодо досліджуваних тест-мікроорганізмів загалом вищі в нанокompatитів, отриманих способом термохімічного відновлення.

Високу антимікробну активність щодо референтних штамів досліджуваних мікроорганізмів *S. aureus* та *E. coli*. показали нанокompatити ПЕК– $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$, отримані методом хімічного відновлення іонів Cu^{2+} у ПМК, і ПЕК– Cu , отримані термохімічним відновленням за $T = 170^\circ\text{C}$ протягом 30 хв (рис. 5).

Після 24 год інкубування за $T = 37^\circ\text{C}$ спостерігали наявність чіткої чистої зони навколо контурів плівок, що вказує на інгібування росту мікроорганізмів.

Таблиця. Антимікробні властивості мідьвмісних нанокompatитів

Метод отримання нанокompatитів	Діаметр зон затримки росту (мм)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Термохімічне відновлення, ПЕК– Cu	23,4±1,1	22,5±0,9
Хімічне відновлення, ПЕК– $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$	22,4±0,9	18,1±0,6
Контрольний зразок, ПЕК	–	–

Діаметр зон затримки росту *S. aureus* становив 22 мм для зразків, отриманих хімічним відновленням, і 23 см – термохімічним відновленням. Для *E. coli* діаметр зон затримки росту мікроорганізмів становив 18 і 22 см відповідно (таблиця).

У контрольних зразках (полімерна плівка без наночастинок) спостерігали активний ріст тест-мікроорганізмів і відсутність зон затримки росту.

Висновки.

Мідьвмісні полімерні нанокompatити з антибактеріальними властивостями отримано способами хімічного й термохімічного відновлення, вивчено їх структуру й антимікробну активність. Методом ширококутової рентгенографії показано, що при хімічному відновленні за допомогою борогідриду натрію (мольне співвідношення $\text{NH}_4^-/\text{Cu}^{2+}=6$) вже протягом 40 хв відбувається повне відновлення іонів міді в поліелектроліт-металічних комплексах і формування нанокompatиту типу ядро-оболонка $\text{Cu}/\text{Cu}_2\text{O}$. При збільшенні тривалості процесу відбувається дальше відновлення фази Cu_2O , і за 2 год прояв металічної фази Cu реалізується повною мірою. При термохімічному відновленні за $T = 120\text{--}160^\circ\text{C}$ відбувається поступове руйнування поліелектроліт-металічних комплексів, а за оптимальної температури 170°C на рентгеновських дифрактограмах зафіксовано прояв металічної міді. Дальше нагрівання нанокompatитів призводить до термічного руйнування полімерної матриці.

Встановлено високу антимікробну активність отриманих матеріалів щодо референтних штамів мікроорганізмів *S. aureus* та *E. coli*. Показано, що антимікробні властивості щодо досліджуваних тест-мікроорганізмів загалом кращі в нанокompatитів, отриманих способом термохімічного відновлення.

Автори висловлюють подяку к.б.н., науковому співробітнику відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Рибальченко Н.П. за проведення досліджень антимікробних властивостей мідьвмісних полімерних нанокompatитів.

Література

1. Pomogailo A.D., Kestelman V.N. Metallopolymer nanocomposites, Springer, New York, 2005.
2. Zevin A.A. Synthesis of Hybrid Materials in Polyelectrolyte Matrixes: Control over Sizes and Spatial Organization of Metallic Nanostructures, Polym. Sci., C, 2016, 58: 118–130.
3. Demchenko V., Riabov S., Rybalchenko N., Goncharenko L., Kobylinskyi S., Shtompel' V. X-ray study of structural formation, thermomechanical and antimicrobial properties of copper-containing polymer nanocomposites obtained by the thermal reduction method, Eur. Polym. J., 2017, 96: 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.08.057>
4. Palza H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles, Int. J. Mol. Sci., 2015, 16: 2099–2116. <https://doi.org/10.3390/ijms16012099>
5. Demchenko V., Shtompel' V., Riabov S. Nanocomposites based on interpolyelectrolyte complex and Cu/Cu₂O core-shell nanoparticles: Structure, thermomechanical and electric properties, Eur. Polym. J., 2016, 75: 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.004>

Надійшла до редакції 8 жовтня 2018р.

Структура и антимикробные свойства медьсодержащих полимерных нанокompatитов

В.Л. Демченко, В.И. Штомпель, Л.А. Гончаренко, С.Н. Кобылинский, С.В. Рябов

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины
48, Харьковское шоссе, Киев, 02160, Украина

*Исследованы особенности структурной организации и антимикробные свойства медьсодержащих полимерных нанокompatитов, сформированных методами химического и термохимического восстановления ионов металлов в полиэлектролит-металлических комплексах пектин–Cu²⁺–полиэтиленимин. Показано, что в ходе химического восстановления ионов Cu²⁺ формируются нанокompatиты типа ядро-оболочка Cu/Cu₂O, при этом структурное проявление металлической фазы Cu реализуется в полной мере при мольном соотношении $\text{VH}_4^-:\text{Cu}^{2+}=6$ и продолжительности восстановления 2 ч. Обнаружено, что при термохимическом восстановлении ионов Cu²⁺ оптимальными параметрами являются температура 170 °C и время 30 мин. Исследование антимикробных свойств полученных нанокompatитов показало, что они обладают высокой антимикробной активностью против штаммов *S. aureus* и *E. coli*.*

Ключевые слова: полиэлектролитные комплексы, полиэлектролит-металлические комплексы, медьсодержащий нанокompatит, структура, антимикробная активность.

Peculiarities of structural organization and antimicrobial activity of copper-containing nanocomposites

V.L. Demchenko, V.I. Shtompel, L.A. Goncharenko, S.M. Kobylinsky, S.V. Riabov

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine
48, Kharkivske shose, Kyiv, 02160, Ukraine

*Metal-polymer nanocomposites possess unique characteristics and a wide range of applications (for the design of catalytic systems as well as in optoelectronics and nanophotonics). When the polymer matrices are filled with silver and copper nanoparticles, they acquire new valuable properties and can be used as effective antibacterial and antiviral drugs in medicine, pharmacology, and biochemistry. Such materials require a fundamental study of the structure, morphology and antimicrobial properties. The aim of this work is to study the features of the structural organization and antimicrobial activity (in relation to *S. aureus* and *E. coli* strains) of polymer films based on polyelectrolyte complexes and copper nanoparticles obtained by chemical and thermochemical reduction of copper ions in polyelectrolyte-metal complexes. The features of structural organization of copper-containing nanocomposites were studied by wide-angle X-ray diffraction on a DRON-4-07 diffractometer, the X-ray optical scheme of which was performed to “pass” primary beam radiation through samples. X-ray studies were carried out at $T = 20 \pm 2$ °C in $\text{CuK}\alpha$ -radiation, monochromated with a Ni-filter. The antimicrobial activity was studied using reference strains of opportunistic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 35218 as model of Gram-positive and Gram-negative bacteria by agar diffusion method on a solid Luria-Bertani nutrient medium. According to the results of the research, it was found out that the optimal conditions for the reductions of copper ions, namely, the duration of the chemical reduction process and its temperature are 2 hours and 170 °C, respectively as well as it was revealed that the obtained materials have high antimicrobial activity on the microorganisms tested (*S. aureus* and *E. coli*). In general, it is shown that antimicrobial activity against the test microorganisms are better for the nanocomposites obtained by the thermochemical reduction rather than chemical one.*

Key words: polyelectrolyte complexes, polyelectrolyte–metal complexes, copper-containing nanocomposite, structure, antimicrobial activity.