

**ELECTROSPUN CHITOSAN/TETRAHYDROCURCUMIN FIBER MATS  
FOR BIOMEDICAL APPLICATION**

Maylada Rungroj

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University  
in Academic Partnership with  
The University of Michigan, The University of Oklahoma,  
Case Western Reserve University and Institut Français du Pétrole  
2007

502005

**Thesis Title:** Electrospun Chitosan/Tetrahydrocurcumin Fiber Mats for  
Biomedical Application  
**By:** Maylada Rungroj  
**Program:** Polymer Science  
**Thesis Advisor:** Assoc. Prof. Pitt Supaphol

---

Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn  
University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of  
Science.

*Nantaya Yanumet*  
..... College Director  
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

**Thesis Committee:**

*Pitt Supaphol*  
.....  
(Assoc. Prof. Pitt Supaphol)

*Apichart Suksumran*  
.....  
(Prof. Apichart Suksumran)

*Prasit Pavasant*  
.....  
(Assoc. Prof. Prasit Pavasant)

**ABSTRACT**

4872020063 Polymer Science Program  
Maylada Rungroj: Electrospun Chitosan/Tetrahydrocurcumin Fiber  
Mats for Biomedical Application.  
Thesis Advisor: Assoc. Prof. Pitt Supaphol 67 pp.  
Keywords: Chitosan/ Tetrahydrocurcumin/ Drug delivery/ Electrospinning

Electrospun Chitosan/Tetrahydrocurcumin (THC) fiber mats were successfully prepared by electrospinning. Chitosan was used for the local delivery of a drug. THC was selected as the model drug that exhibits many of the same physiological and pharmacological activities as curcumin. 20wt.% THC (compared with the weight of chitosan) and 6.9wt.% chitosan in 70:30(v/v) trifluoroacetic acid (TFA):dichloromethane (DCM) were used as the optimum solution for fabricating nanofibers. After spinning, they were crosslinked with GTA vapor (for 1 h) and neutralized to prevent the dissolution and fusion of the fibers. SEM images of the post-neutralized and crosslinked fiber mats were observed where the fibers were not fused after neutralization and crosslinking treatment and the average fiber diameter was in the range of 290-310 nm. The accumulative release of THC increased continuously with immersion time and leveled off at a long immersion time (for the total immersion method). The post neutralized and crosslinked electrospun chitosan/THC fiber mats exhibited much greater release of the model drug when compared to the post neutralized and crosslinked chitosan/THC films. All of the electrospun chitosan/THC fiber mats were not toxic, and did not release cytotoxic substances in the culture medium towards mouse fibroblasts (L929).

## บทคัดย่อ

เมตตา รุ่งโรจน์ : การประยุกต์ใช้เส้นใยไคโตซาน/เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินที่ได้จากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตสำหรับการแพทย์ (Electrospun Chitosan/Tetrahydrocurcumin Fiber Mats for Biomedical Application) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล 67 หน้า

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแผ่นเส้นใยไคโตซานระดับนาโนเมตร ที่มีเตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน (Tetrahydrocurcumin) เป็นสารออกฤทธิ์ในการรักษาแผลมาใช้เป็นวัสดุขนส่งยา (Drug delivery carrier) ซึ่งเตรียมจากการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยผู้วิจัยมุ่งเน้นถึงความเป็นธรรมชาติของทั้งพอลิเมอร์ และ ยาที่ใช้ออกฤทธิ์ โดยในขั้นแรกจะทำการศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่างๆที่มีอิทธิพลต่อสัณฐานวิทยาและขนาดของเส้นใยไคโตซาน/เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใยที่มีความสม่ำเสมอ จากการศึกษาพบว่าเส้นใยไคโตซาน/เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน สามารถเตรียมได้จากการใช้ไคโตซาน ความเข้มข้น 6.9% และ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน 20% (เทียบกับน้ำหนักพอลิเมอร์) ละลายในสารละลายผสมระหว่างไตรฟลูออโรอะซิติกซิก (Trifluoroacetic acid) และไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ในอัตราส่วน 70:30 ซึ่งเส้นใยที่เตรียมได้นั้นมีขนาดอยู่ในช่วง  $300 \pm 10$  นาโนเมตร เส้นใยไคโตซาน/เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินสามารถคงรูปได้โดยใช้ไอของกลูตาโรลดีไฮด์ (Glutaraldehyde vapor) และ ใช้กลไกของปฏิกิริยาการสะเทิน จากนั้นเส้นใยไคโตซาน/เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินจะถูกประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัสดุขนส่งยาซึ่งมีพอลิเมอร์เป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยยาโดยการทดสอบการบวมตัวของเส้นใย (Degree of swelling), การทดสอบการหายไปของน้ำหนักเส้นใย (Weight loss behavior) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยยาจากตัวเส้นใยเปรียบเทียบกับฟิล์ม โดยใช้วิธีจุ่มแช่และการแพร่ผ่านหนังหมู ซึ่งผลการทดสอบพบว่าปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเส้นใยมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์มและเมื่อนำเส้นใยมาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ทดสอบพบว่าเส้นใยไคโตซาน/เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินไม่มีการปลดปล่อยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ทดสอบ

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author greatly appreciates the efforts of her research advisors, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, who originated her thesis, gave valuable suggestions and sincere assistances and proof – reading of thesis writing throughout this research. She would like to express her sincere gratitude to Prof. Apichart Suksumram for guidance, helpful suggestions, supplying raw materials and for being a thesis committee member. Her thanks are also extended to all of the staffs of the Petroleum and Petrochemical College for providing the use of research facilities.

This thesis work is partially funded by The Petroleum and Petrochemical College, Postgraduate Education Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PPT Consortium) and The Thailand Research Fund (TRF).

The author also would like to give special thanks to Mr. Artphop Nearnark, who helped and suggested partial experimental part for indirect cytotoxicity evaluation and her entire friends for their helps, suggestions and encouragement.

Ultimately, the author is deeply indebted to her family for their love, understanding, suggestions and encouragement.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	ix
List of Figures	x
Abbreviations	xiii
List of Symbols	xiii
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II LITERATURE REVIEW</b>	 <b>3</b>
 <b>III EXPERIMENTAL</b>	 <b>15</b>
3.1 Materials	15
3.2 Equipment	15
3.2.1 High Voltage Power Supply	15
3.2.2 Scanning Electron Microscope (SEM)	16
3.2.3 Sputtering Device	16
3.2.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	16
3.2.5 UV- Spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 10)	17
3.3 Methodology	17
3.3.1 Electrospinning Setup	17
3.3.2 Preparation of Electrospinning Solution and Film Solution	 18

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
3.3.3 Selection of the Optimum Condition of Electrospinning Solution	18
3.3.4 Crosslinking Treatment of the Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	18
3.3.5 Neutralization Treatment of the Post-Crosslinked Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	18
3.3.6 Characterization of Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	19
3.3.7 Release of Model Drug from Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	20
3.3.8 Cytotoxicity Evaluation	21
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>23</b>
4.1 Preparation of the Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	23
4.1.1 Effect of Polymer and THC on Morphological Appearance of The As-spun Fibers	24
4.1.2 Effect of Crosslinking and Neutralization on Morphological Appearance of The As-spun Fibers	27
4.2 Physical Characterization of the Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	30
4.2.1 The Degree of Swelling of the Post-neutralized and Crosslinked Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats and Chitosan/THC Films	30
4.2.2 The Weight Loss of the Post-neutralized and Crosslinked Electrospun Chitosan/THC Fibers and Chitosan/THC Films	31
4.3 Release of Model Drug from the Post-neutralized and Crosslinked Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	33
4.4 Release Kinetic of Model Drug from the Post-neutralized and Crosslinked Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats	

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
and Chitosan/THC films	37
4.5 Indirect Cytotoxicity Evaluation	38
4.6 FTIR Analysis	39
<b>V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>42</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>43</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>46</b>
<b>Appendix A</b> Average Fiber Diameter of the Electrospun Chitosan/THC Fibers, and Average Bump Size of the Chitosan Films	47
<b>Appendix B</b> Weight Loss, and Degree of Swelling	52
<b>Appendix C</b> The THC Concentration for Determining Standard Curve, Standard Curve, and Accumulative Released of THC from Both the Electrospun Chitosan/THC Fiber Mats and Chitosan/THC Films Base On Total Immersion and Transdermal Diffusion Through Pig Skin Method.	55
<b>Appendix D</b> Indirect cytotoxicity	64
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>66</b>



**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
4.1	The actual amount of THC present in the fiber samples (reported as the percentage of the initial content of drug loaded in the spinning and casting solution)	35
4.2	Analyses of the release kinetics of model drug from drug-loaded as-spun chitosan mats and as-cast chitosan films based on the Fickian diffusion type of release mechanism. The experimental results were based on the transdermal diffusion through a pig skin method	37

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Schematic of the electrospinning setup	4
2.2 Schematic of potential applications of electrospun fibers	6
2.3 Schematic of the incorporation of functional groups into a polymer nanofiber mesh	7
2.4 Structures of cellulose, chitin and chitosan	8
2.5 The structure of deacetylated chitosan	9
2.6 Chemical structures of curcumin and its major metabolite, tetrahydrocurcumin (THC)	13
3.1 Chemical structure of tetrahydrocurcumin (THC)	15
3.2 Scanning electron microscope	16
3.3 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscope	17
3.4 UV- spectrophotometer	17
4.1 Morphological images of the electrospun chitosan / THC fiber mats at various condition of electrospinning solution	24
4.2 The SEM images a) the electrospun chitosan/THC fiber mats b) the crosslinked electrospun chitosan/THC fiber mats c) the post-neutralized and crosslinked electrospun chitosan/THC fiber mats with magnification, 2000x and 5000x, respectively)	27
4.3 Selected SEM images of the crosslinked electrospun chitosan/THC fiber mats after neutralization with 5M NaCO <sub>3</sub> (a) and 5M NaOH (b) aqueous solution for 3 h at ambient condition	29
4.4 Selected SEM of as-cast chitosan films from (a) neat 4% w/v chitosan solution in 70:30 v/v TFA: DCM and from the chitosan solution that contained (b) 5 wt.%	30

FIGURE	PAGE
4.5 Degree of swelling in acetate buffer as a function of submersion time for the electrospun chitosan/THC fiber mats (after crosslinking and neutralization with saturated $\text{Na}_2\text{CO}_3$ aqueous solution for 30 min) and solution-cast chitosan films (after crosslinking and neutralization with 5M NaOH aqueous solution for 3 h)	31
4.6 Weight loss in acetate buffer as a function of submersion time for the electrospun chitosan/THC fiber mats (after crosslinking and neutralization with saturated $\text{Na}_2\text{CO}_3$ aqueous solution for 30 min) and solution-cast chitosan films (after crosslinking and neutralization with 5M NaOH aqueous solution for 3 h)	32
4.7 A selected SEM image of the electrospun chitosan/THC fiber mats after submersion in acetate aqueous solution for 9 weeks	32
4.8 The accumulative amount of THC released from the drug samples base on the total immersion method	36
4.9 The accumulative amount of THC released from the drug samples base on the transdermal through pig skin method	36
4.10 The relative absorbance illustrating the viability of the cells that were cultured with the extraction medium at 1 day and 7 days from various types of specimens as well as that of the control	39
4.11 FTIR spectra of all of electrspun chitosan/THC fiber mats	40

**ABBREVIATIONS**

TFA	Trifluoroacetic acid
DCM	Dichloromethane
CS	Chitosan
THC	Tetrahydrocurcumin
FTIR	Fourier Transform Infrared
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
SEM	Scanning Electron Microscope

**LIST OF SYMBOLS**

wt.%	% by weight
w/v	Weight per volume
v/v	Volume/volume
μ	Micro