PREPARATION OF CHITIN SHEETS INCORPORATED WITH CURCUMIN

Pakavadee Ratanajiajaroen

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,
and Case Western Reserve University
2008

512035

Thesis Title:	Preparation of Chitin Sheets Incorporated with Curcumin
By:	Pakavadee Ratanajiajaroen
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit
	Prof. Seiichi Tokura

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

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

Thesis Committee:

.....
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)

.....
(Prof. Seiichi Tokura)

.....
(Assist. Prof. Manit Nithitanakul)

.....
(Dr. Manisara Phiriyawirut)

ABSTRACT

4972017063: Polymer Science Program
Pakavadee Ratanajiajaroen: Preparation of Chitin Sheets Incorporated with curcumin.
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, and Prof. Seiichi Tokura 59 pp.
Keywords: Chitin/ Curcumin/ Tween20/ Releasing behavior/ Stability

Curcumin is a naturally occurring substance that possesses several biological properties including antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities. Hence, it is interesting to introduce curcumin into a matrix that can enhance the stability as well as provide slow releasing of curcumin. Chitin is an alternative biomaterial that has many advantages such as non-toxicity, biodegradability, and biocompatibility. In this study, a chitin sheet was fabricated by the paper-making process using a water-based system. In the presence of Tween®20, curcumin-loaded chitin sheets were prepared and divided into two categories, low (fully-dissolved) and high dosage of loaded curcumin. After air drying under a dark laminar flow hood, scanning electron microscopy (SEM) was used to indicate the change in the surface morphology of the fabricated chitin sheets after loading curcumin into the matrix. The structure of the matrix was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. FTIR spectra revealed that there was no chemical interaction between chitin and curcumin. Investigation of the release behavior of curcumin loaded into the chitin matrix were carried out by the total immersion method in the acetate buffer solution, pH 5.5, at 37 °C stimulating the human skin. The effect of loaded amounts of curcumin as a function of releasing time on releasing characteristic of curcumin from chitin sheets was investigated. In addition, it was found that Tween®20 played an important role on releasing of curcumin from chitin sheets to an exterior solution. The solubility and stability of curcumin could be achieved by the addition of Tween 20.

บทคัดย่อ

ภควดี รัตนเจียเจริญ : การเตรียมแผ่นไคตินผสมเคอร์คิวมิน (Preparation of Chitin Sheets Incorporated with Curcumin) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. รัตนา รุจิระวานิช และ ศ. เซอิจิ โทคุระ 59 หน้า

เคอร์คิวมิน(ขมิ้น) เป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีคุณประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสรรพคุณทางการรักษา ยกตัวอย่างเช่น ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ บรรเทาอาการแผลอักเสบ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้น การบรรจุขมิ้นลงในวัสดุเพื่อเพิ่มความเสถียร และควบคุมการปลดปล่อยหรือออกฤทธิ์ได้ในเวลาเดียวกัน จึงเป็นเป้าหมายหลักในการทดลอง ไคตินเป็นวัสดุที่ได้จากธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลาย และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สิ่งมีชีวิต ในงานวิจัยนี้ แผ่นไคตินถูกทำการขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำกระดาษผ่านระบบน้ำ แผ่นไคตินผสมเคอร์คิวมินได้ถูกเตรียมขึ้นและแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ประกอบด้วยไคตินผสมเคอร์คิวมินในปริมาณต่ำและปริมาณสูงโดยการอาศัยทวีน20ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวเพื่อช่วยในการละลายและกระจายตัวของเคอร์คิวมินที่มีความสามารถในการละลายต่ำ หลังจากปล่อยให้แห้งภายในตู้มืดที่มีการระบายอากาศ เครื่องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องกราดได้ถูกใช้เพื่อตรวจสอบพื้นผิวของแผ่นไคติน พบว่ามีเคอร์คิวมินส่วนที่ไม่ละลายฝังอยู่บนพื้นผิวของแผ่นไคตินที่มีเคอร์คิวมินในปริมาณสูง เปรียบเทียบกับแผ่นไคตินที่มีเคอร์คิวมินในปริมาณต่ำซึ่งเคอร์คิวมินถูกละลายและบรรจุอยู่ในแผ่นไคติน ด้วยเทคนิคฟลูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโทรสโคปี บ่งชี้ว่าไม่เกิดปฏิกิริยาใดๆระหว่างเคอร์คิวมินกับไคติน นอกจากนี้ พฤติกรรมของเคอร์คิวมินที่ถูกปลดปล่อยออกจากแผ่นไคติน ได้ถูกทำการทดสอบโดยใช้การจุ่มแผ่นไคตินผสมเคอร์คิวมินลงในอะซิเตตบัฟเฟอร์(ค่าความเป็กรด-ด่างเท่ากับ 5.5) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจำลองสภาวะผิวมนุษย์ พบว่าทวีน20ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการปลดปล่อยของเคอร์คิวมินทั้งที่อยู่ภายในและบนพื้นผิวของแผ่นไคตินออกมาสู่สารละลายภายนอก นอกจากนี้ทวีน20ยังสามารถช่วยเพิ่มความเสถียรของเคอร์คิวมินที่ถูกผสมในแผ่นไคตินได้อีกด้วย

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by the PPC; and the National Excellence Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

I wish to express my deepest gratitude to the following people: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, my advisor, who taught me that curiosity is the best policy. This research can not be complete without her help. Prof. Seiichi Tokura, my co-advisor, who helps in so many ways to making this research all that it can be. Finally, my special thanks to my family and my friends who are always there for me.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
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
CHAPTER		
I	**INTRODUCTION**	1
II	**LITERATURE REVIEW**	3
III	**EXPERIMENTAL**	16
	3.1 Materials	16
	3.1.1 Polymers	16
	3.1.2 Chemicals	16
	3.2 Equipments	16
	3.3 Methodology	17
	3.3.1 Chitin Preparation	17
	3.3.2 Fabrication of Chitin Sheets	17
	3.3.3 Incorporation of Curcumin into the Chitin Sheets	17
	3.3.3.1 Preparation of High-dose Curcumin-loaded Chitin Sheets	17
	3.3.3.2 Preparation of Low-dose (fully dissolved) Curcumin-loaded Chitin Sheets	18

3.3.4 Characterizations 18
3.3.4.1 Degree of Deacetylation 18
3.3.4.2 Morphology Observation 18
3.3.4.3 Interaction between Curcumin and Chitin Sheets 19
3.3.5 Releasing Behaviour of Curcumin from Curcumin-loaded Chitin Sheets 19
3.3.6 Stability of Curcumin at the Neutral Buffer Solution 20
3.3.7 Direct Cytotoxicity Test 21

CHAPTER **PAGE**

IV RESULTS AND DISCUSSION 23
4.1 Degree of Deacetylation 23
4.2 Morphology Observation of Chitin and Curcumin-loaded Chitin Sheets 24
4.3 Interaction between Curcumin and Chitin Sheets 25
4.4 Releasing Behaviour of Curcumin from Curcumin-loaded Chitin Sheets 28
4.4.1 Releasing Profiles of Fully Dissolved Curcumin (Low Dosage) from Chitin Sheets 28
4.4.2 Releasing Profiles of Curcumin from the Chitin Sheets in case of High-dosed Loading of Curcumin 29
4.4.3 Releasing Profiles of Curcumin from the Chitin Sheets: Effect of the Added Tween 20 to the Releasing Buffer Solution 30
4.5 Stability of Curcumin at the Neutral Buffer Solution 34
4.5.1 Stability of Ethanol-soluble Curcumin in Phosphate Buffer, pH 7.2 34

4.5.2 Stability of Curcumin Released from Chitin Sheets in Phosphate Buffer, pH 7.2 36
4.5.3 Stability of Curcumin Incorporated with Chitin Sheets in Phosphate Buffer, pH 7.2 37
4.6 Direct Cytotoxicity Test 38

V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 43

REFERENCES 44

APPENDICES 53
Appendix A Releasing Profiles of Fully Dissolved Curcumin (Low Dosage) from Chitin Sheets 53
Appendix B Releasing Profiles of Curcumin from Chitin Sheets in case of High-dosed Loading, in a range of 1, 5, 10, and 20 wt%, of Curcumin 54
Appendix C Releasing Profiles of Curcumin from Chitin Sheets: Effect of the Added Tween 20 to the Releasing Buffer Solution 58

CURRICULUM VITAE 59

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Antioxidant activity of curcumin from curcumin-loaded electrospun CA fiber mats and corresponding solvent-cast CA films (Suwantong *et al.*, 2007)	7
2.2	Solvent systems for chitin solution forming various products	13

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Structures of curcuminoids from *C. longa* (Jayaprakasha *et al.*, 2005).	3
2.2	Tautomerism of curcumin under physiological conditions under acidic and neutral conditions, the bis-keto form (top) predominates, whereas the enolate form is found above pH 8 (Sharma *et al.*, 2005).	4
2.3	Lipid peroxidation inhibition studies: (a) CICM, (b) curcumin in solution, respectively (Gopinath *et al.* 2004).	6
2.4	Effect of different physiological conditions *in vitro* on the stability of curcumin incubated at 37°C for 1, 4 and 8 h (Wang *et al.*, 1997).	10
2.5	UV–Vis spectra of 1% curcumin nanoemulsion prepared by high-pressure homogenization after 1, 4, 7 days, as well as the blank O/W emulsion and curcumin in 10% Tween 20 water solution (Wang *et al.*, 2008).	11
2.6	SEM micrographs of the interaction between chitin and (a) normal human oral keratinocytes, and (b) normal human epidermal keratinocytes after 0, 1, 3, and 7 days of culture (Noh *et al.*, 2006).	14
4.1	FTIR spectra of the β-chitin sheet.	24
4.2	SEM images of chitin (a, ×75; b, ×500), (low-dosed) curcumin-loaded chitin sheets (c, ×75; d, ×500), and (high-dosed) curcumin-loaded chitin sheets (e, ×75; f, ×500),respectively.	26

4.3	SEM images (×75) of high-dosed curcumin deposited on the surface of chitin sheets; (a) 1 wt%, (b) 5 wt%, (c) 10 wt%, and (d) 20 wt% of loaded curcumin, respectively.	27
4.4	FTIR spectra of (a) chitin, (b) chitin incorporated with curcumin, (c) curcumin, and (d) Tween 20, respectively.	27
4.5	FTIR spectra of curcumin-loaded chitn sheets; (a) 0.04 wt%, (b) 1 wt%, (c) 5 wt%, (d) 10 wt%, and (e) 20 wt% of loaded curcumin, respectively.	28
4.6	Release profiles of 0.04 wt% of loaded curcumin (fully dissolved) from curcumin-loaded chitin sheets.	29
4.7	Release profiles of high-dosed loading of curcumin from curcumin-loaded chitin sheets; (a) 1 wt%, (b) 5 wt%, (c) 10 wt%, and (d) 20 wt% of loaded curcumin, respectively.	30
4.8	Release profiles of high-dosed loading of curcumin (20 wt%) from curcumin-loaded chitin sheets; (a) in the absence of tween 20 and (b) in the presence of Tween 20.	31
4.9	FTIR spectra of (a) chitin sheets, (b) chitin sheets with 0.1%, (c) 0.5%, (d) 1% (v/v) of tween 20 based on total chitin suspension, and (e) Tween20, respectively.	32
4.10	The chemical structure of Tween 20, a non-ionic surfactant.	33
4.11	The TEM image of chitin fibrous presented in acetate buffer with the addition of Tween 20.	33
4.12	UV-vis spectra of ethanol-soluble curcumin at the maximum absorption, 424 nm.	35
4.13	UV-vis spectra of ethanol-soluble curcumin in phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C as a function of incubation times.	35
4.14	Chemical structures of products obtained from the degradation of curcumin in phosphate buffer, pH 7.2, at 37°C.	37

4.15	UV-vis spectra of released curcumin in phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C after (a) 3 days and (b) 7 days of incubation times, respectively.	38
4.16	UV-vis spectra of curcumin presented in chitin sheets (a) after extraction and (b) after 7 days of extraction in the T/E solution, respectively.	38
4.17	The chemical structure of neutral red, a weak cationic dye.	39
4.18	The L929 (mouse connective tissue) cells staining with neutral red after 24-hours exposure to the samples; (a) control cells without samples, (b) in the presence of the chitin sheet, (c) chitin incorporated with 0.5% v/v of Tween 20, and (d) chitin incorporated with 20 wt% of curcumin, respectively.	40
4.19	The human dermal fibroblast cells staining with neutral red after 24-hours exposure to the samples; (a) control cells without samples, (b) in the presence of the chitin sheet, (c) chitin incorporated with 0.5% v/v of Tween 20, and (d) chitin incorporated with 20 wt% of curcumin, respectively.	41