

**ELECTROSPUN GELATIN/HYALURONIC ACID FIBER MATS FOR  
MEDICAL APPLICATIONS**



**Kunchnok Petchsiri**


**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  
2008**

510305


**Thesis Title:** Electrospun Gelatin/Hyaluronic Acid Fiber Mats for Medical Applications  
**By:** Kunchnok Petchsiri  
**Program:** Polymer Science  
**Thesis Advisor:** Assoc. Prof. Pitt Supaphol

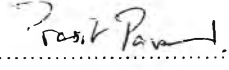
---


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

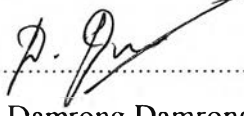
  
..... College Director  
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

**Thesis Committee:**

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

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

  
.....  
(Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue)

  
.....  
(Dr. Damrong Damrongsri)

## ABSTRACT

4972010063: Polymer Science Program

Kunchnok Petchsiri: Electrospun Gelatin/Hyaluronic Acid Fiber Mats  
for Medical Applications

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Pitt Supaphol

Keywords: Electrospinning/ Gelatin/ Hyaluronic Acid/ Wound dressing/ Tissue  
Scaffold

The natural polymers chosen to produce fibrous structure using the electrospinning process were gelatin (a form of denatured collagen) and hyaluronic acid (a type of glycosaminoglycan) (GAG). The electrospun fibers had the average diameters of 100–120 nm and were cross-linked by glutaraldehyde vapor for 30 minutes, 1, 2, and 4 hours at 37°C. The cross-linked electrospun fiber mats were characterized by scanning electron microscopy (SEM). The images showed a network of cross-linked fibers. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to determine the change in functional groups of the electrospun fiber mats after the cross-linking process. The thermal degradation temperature of the resulting fiber mats were evaluated from thermogravimetry (TG) profiles which showed thermal degradation temperature of approximately 300°C. The degree of cross-linking were evaluated by using swelling test in simulated body fluid (SBF) which showed a decrease in swelling percentage relative to dry weight with increasing cross-linking time. The strain at break was measured and found to increase with decreasing cross-linking time. Before the cross-linked fiber mats were subjected to biocompatibility tests, they were immersed in a solution of sodium bisulfite to remove residue cross-linking agent which has been reported to be toxic to living organisms. The fiber mats were subjected to an indirect cytotoxicity testing with mouse fibroblast cells (L929), the results indicated that it was not toxic.

## บทคัดย่อ

กัญญ์ชนก เพ็ชรศิริ : การผลิตเส้นใยเจลาติน/กรดฮyaluronic โรนิกจากระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตที่นำไปใช้ทางการแพทย์ (Electrospun Gelatin/Hyaluronic Acid Fiber Mats for Medical Applications) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.พิชญ์ ศุภผล

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเส้นใยจากเจลาตินผสมกับกรดฮyaluronic โรนิกโดยผ่านกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาตัวแปรที่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของเส้นใยและศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใย จากการทดลองพบว่าสามารถผลิตเส้นใยเจลาติน/กรดฮyaluronic โรนิก ได้จากการเตรียมเจลาตินผสมกับกรดฮyaluronic โรนิกในอัตราส่วน 40:1 โดยใช้สารละลายอะเซติกแอซิด (Acetic acid) 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย ซึ่งเส้นใยที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-120 นาโนเมตร และเมื่อนำเส้นใยไปทำให้เกิดโครงสร้างร่างแห (cross-linked) ด้วยไอของกลูทารอลดีไฮด์โดยทำการปรับเปลี่ยนเวลาในการทำปฏิกิริยาดังแต่ 30 นาที ถึง 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะทำการวิเคราะห์ลักษณะของเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) และเครื่องมือวิเคราะห์ด้วยอินฟราเรด (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) เพื่อให้ทราบถึงหมู่ฟังก์ชันก่อนและหลังการทำให้เกิดโครงสร้างร่างแห และทำการศึกษาอัตราการเกิดโครงสร้างร่างแหจากการบวมตัวของเส้นใย จากการศึกษาการบวมตัวของเส้นใยพบว่าเปอร์เซ็นต์ของการบวมน้ำลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการทำให้เกิดโครงสร้างร่างแห และแรงที่จุดขาดของเส้นใยจะลดลงเมื่อใช้เวลาในการเกิดโครงสร้างร่างแหเพิ่มขึ้น เส้นใยที่ผ่านการทำให้เกิดโครงสร้างร่างแหจะนำไปประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ด้วยการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ก่อนการทดสอบจะนำแผ่นเส้นใยไปจุ่มในสารละลาย เพื่อขจัดไอของกลูทารอลดีไฮด์ออก เมื่อนำเส้นใยไปทดสอบด้วยเซลล์ชนิด L929 พบว่าเส้นใยที่ผลิตได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

## ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not be done without the help and guidance of the advisor, Assoc. Prof. Pitt Supaphol and the committees Assoc. Prof. Prasit Pavasant, Assoc. Prof. Chidchanok Meechaisue, Dr. Damrong Damrongsri. Their dedication and support is very much appreciated.

The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for the knowledge from the lecturers and staff who provided support during her study at this college.

Sincere appreciations go to the department of anatomy, faculty of dentistry, Chulalongkorn University for the use of their facilities and equipments where all biological cell testing were done.

## 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 and Figures	ix

### CHAPTER

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION</b>	
<b>II</b>	<b>LITERATURE REVIEW</b>	2
	2.1 Fabrication Techniques	2
	2.2 Electrospinning Techniques	5
	2.3 The electrospinning process	6
	2.4 Morphology	7
	2.5 Degradation	9
	2.6 Adding bioactive function	9
	2.7 Materials	
	2.7.1 Hyaluronic acid	10
	2.7.2 Gelatin	11
	2.8 Crosslinking Gelatin	12
<b>III</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	14
	3.1 Materials	14
	3.2 Equipment	14
	3.3 Methodology	

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
3.3.1 Preparation of electrospinning solution (Gelatin/Hyaluronic acid)	14
3.3.2 Fabrication of scaffolds	14
3.3.3 Crosslinking by Glutaraldehyde	15
3.4 Testing Properties	16
3.4.1 Scanning Electron Microscopy (SEM)	16
3.4.2 Swelling Test	17
3.4.3 Tensile Test	17
3.4.4 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer	17
3.4.5 Thermogravimetry (TGA)	17
3.5 Cell Culture Studies	18
3.5.1 Cytotoxicity Test	18
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>19</b>
4.1 Effect of Different Solvent System on the Electrospun Fibers	21
4.2 Effect of Solution Concentration on the Electrospun Fibers	22
4.3 Effect of Collecting Distance on the Electrospun Fibers	26
4.4 Effect of Applied Voltage on the Electrospun Fibers	27
4.5 Cross-linking Process	28
4.5.1 Infrared (IR) Analysis	29
4.6 Thermal Degradation Temperature	31
4.7 Water Uptake	32
4.8 Tensile Test	33
4.9 Biocompatibility Test	34
4.10 Cell Attachment and Proliferation	35
4.11 Degradatio	36

<b>CHAPTER</b>		<b>PAGE</b>
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>37</b>
	<b>REFERENCES</b>	<b>38</b>
	<b>APPENDICES</b>	
	<b>Appendix A</b> Average Fiber Diameter of Electrospun Fibers	<b>41</b>
	<b>Appendix B</b> Absorbance Value of Cytotoxicity Test	<b>53</b>
	<b>Appendix C</b> Degree of Swelling	<b>54</b>
	<b>Appendix D</b> Tensile Values	<b>56</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>60</b>



## LIST OF TABLES AND FIGURES

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
4.1	Conductivity and viscosity of spinning solution	22
 <b>FIGURE</b>		
4.1	SEM images at magnification 3,500x of gelatin/hyaluronic acid electrospun fibers of various acetic acid concentration: A) 10%, B) 20%, C) 30%	21
4.2	Graph showing viscosity of electrospinning solution	23
4.3	Graph showing conductivity of electrospinning solution	23
4.4	SEM images of electrospun gelatin/hyaluronic acid fibers various gelatin:hyaluronic acid ratio of: A) 10/1, B) 20/1, C) 30/1	24
4.5	SEM images of electrospun gelatin/hyaluronic acid at gelatin:hyaluronic acid equals to 40/1 at various magnification: A) 5,000x and B) 10,000x.	25
4.6	SEM images of electrospun gelatin/hyaluronic acid at gelatin:hyaluronic acid equals to 50/1 at various magnification: A) 5,000x and B) 10,000x.	25
4.7	SEM images of gelatin/hyaluronic acid electrospun fiber mats at different collecting distance: A) 15 cm, B) 20 cm, C) 25 cm	26
4.8	SEM images of gelatin/hyaluronic acid electrospun fiber mats at different collecting distance: A) 15 cm, B) 20 cm, C) 25 cm	27
4.9	SEM images of electrospun gelatin/hyaluronic acid fibers at different cross-linked time intervals: A) 30 min, B) 1 hr, C) 2 hr, D) 4hr	29

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.10 Infrared spectrum of: a) gelatin powder, b) hyaluronic acid powder, c) gelatin/hyaluronic acid electrospun fibers, d) cross-linked gelatin/hyaluronic acid electrospun fibers	30
4.11 Thermal degradation profiles	31
4.12 Degree of swelling of 30min, 1 hr, 2 hr, 4 hr cross-link gelatin/hyaluronic acid electrospun fiber mats	32
4.13 Percentage strain at break of 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr cross-linked gelatin/hyaluronic acid electrospun fiber mat	34
4.14 Young's modulus of 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr cross-linked gelatin/hyaluronic acid electrospun fiber mats	34
4.15 Cytotoxicity Test	34
4.16 Number of viable cells on cultured materials	35
4.17 SEM images of degrading electrospun Ge/HA fiber mats: (A) Day 1, (B) Day 2, (C) Day 3	36