

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF α -CHITIN WHISKER-
REINFORCED β -CHITIN NANOCOMPOSITE FILMS FOR WOUND
HEALING APPLICATION**

Panuphong Pootawang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment 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

502028

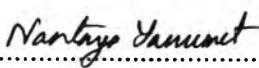
Thesis Title: Preparation and Characterization of α -Chitin Whisker-Reinforced β -Chitin Nanocomposite Films for Wound Healing Application

By: Panuphong Pootawang

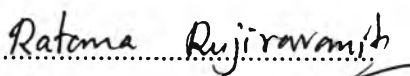
Program: Polymer Science


Thesis Advisors: Asst. Prof. Ratana Rujiravanit
Prof. Seiichi Tokura

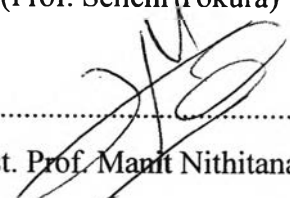
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

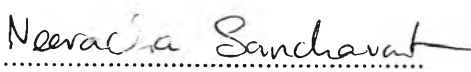

..... College Director
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:


.....
(Asst. Prof. Ratana Rujiravanit)


.....
(Prof. Seiichi Tokura)


.....
(Asst. Prof. Manit Nithitanakul)


.....
(Asst. Prof. Neeracha Sanchavanakit)

ABSTRACT

4872014063: Polymer Science Program

Panuphong Pootawang: Preparation and Characterization of α -Chitin Whisker-Reinforced β -Chitin Nanocomposite Films for Wound Healing Application

Thesis Advisors: Asst. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Seiichi

Tokura 77 pp ISBN

Keywords: Chitin/ Chitin whisker/ Nanocomposite/ Wound healing

Chitin-based nanocomposite films, chitin films incorporated with various contents of chitin whisker, were prepared by solution casting technique. To facilitate chitin dissolution in formic acid, chitin gel was firstly prepared by dissolving chitin in concentrated sodium hydroxide solution and then dialyzing alkaline chitin solution against distilled water until neutral. Chitin gel, obtained as precipitate in dialysis bag, was easily dissolved in formic acid and clear chitin solution was obtained. Chitin whisker, prepared from acid hydrolysis of chitin, was dispersed in chitin solution before casting. Chitin whisker contents in the nanocomposite films were varied from 0 to 2% (w/v). The chitin film was transparent whereas the nanocomposite films became more translucent as the chitin whisker contents increased. By the addition of chitin whisker, the nanocomposite films had higher thermal stability and better mechanical properties than those of chitin film. The maximum tensile strength was obtained for the nanocomposite films with 1% (w/v) whisker content. The biodegradability of the nanocomposite films was investigated by using lysozyme. The percentage of weight loss after enzymatic hydrolysis for seven days decreased with increasing of chitin whisker contents. Oxygen permeability of films reduced as the increase in chitin whisker content. The cytotoxicity of the nanocomposite films was determined by indirect method using MTT assay and L929 cultured. The nanocomposite films were non-toxic with L929 mouse fibroblasts.

บทคัดย่อ

ภาณูพงศ์ ภูทะวัง : การเตรียมและศึกษาสมบัติของนาโนคอมโพสิตเบต้าไคตินเสริมแรงด้วยอัลฟาไคตินวิสเกอร์เพื่อใช้ประโยชน์ในการรักษาบาดแผล (Preparation and Characterization of α -Chitin Whisker-Reinforced β -Chitin Nanocomposite Films for Wound Healing Application) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.รัตนา รุจิรวนิช และ ศ.ดร.ซาอิจิ โทกูระ
77 หน้า

ไคตินนาโนคอมโพสิตเตรียมจากเทคนิคขึ้นรูปฟิล์มด้วยสารละลายที่มีการเสริมแรงด้วยไคตินวิสเกอร์ การละลายที่สมบูรณ์ของไคตินในสารละลายกรดฟอร์มิก ต้องใช้ไคตินเจลที่เตรียมจากการละลายไคตินในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น และได้เป็นสารละลายอัลคาไลน์ไคติน จากนั้นทำการแลกเปลี่ยนสารละลายกับน้ำโดยกระบวนการไดอะไลซิส จนได้ไคตินเจลที่มีสภาพความเป็นกลาง ไคตินเจลสามารถละลายสมบูรณ์กับสารละลายกรดฟอร์มิกได้สารละลายไคติน ไคตินวิสเกอร์เตรียมจากปฏิกิริยาการย่อยด้วยกรดของไคติน นำมาใช้ผสมกับสารละลายไคตินในปริมาณ 0 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตรก่อนทำการเทหล่อสารละลายผสมบนแม่แบบ ลักษณะภายนอกของฟิล์มไคตินมีความใสต่างจากฟิล์มไคตินนาโนคอมโพสิตที่มีความขุ่นมากกว่า จากการเสริมแรงด้วยไคตินวิสเกอร์ในไคตินนาโนคอมโพสิตพบว่า ฟิล์มนาโนคอมโพสิตที่ได้มีความสามารถในการทนความร้อนและความแข็งแรงเชิงกลเพิ่มขึ้น ความแข็งแรงของฟิล์มนาโนคอมโพสิตมีค่ามากที่สุดที่ปริมาณการเติมของไคตินวิสเกอร์เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบความสามารถในการย่อยทางชีวภาพของฟิล์ม โดยการย่อยฟิล์มที่เตรียมได้กับสารละลายเอนไซม์ไลโซไซม์พบว่า น้ำหนักของฟิล์มนาโนคอมโพสิตมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณการเติมไคตินวิสเกอร์ เช่นเดียวกับความสามารถในการผ่านของก๊าซออกซิเจนลดลงตามปริมาณการเติมไคตินวิสเกอร์ การทดสอบความเป็นพิษของฟิล์มต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยวิธี เอ็มทีทีและการเลี้ยงเซลล์บนฟิล์มพบว่า ฟิล์มนาโนคอมโพสิตที่เตรียมได้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ACKNOWLEDGEMENTS

The author greatly appreciates the efforts of his family for their endless love, immeasurable support, understanding and encouragement. The author also greatly appreciates the efforts of my research advisor, Assistant Professor Ratana Rujiravanit of The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University and Prof Seiichi Tokura of Department of Engineering, Kansai University, for kindly providing professional suggestions, useful comments, helpfulness and encouragement throughout this research. The author is grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College; and the National Excellence Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

The author would like to thank to Assistant Professor Manit Nithitanakul and Assistant Professor Neeracha Sanchavanakit for being the thesis committees. The author greatly acknowledges Surapon Foods Public Co., Ltd., Thailand, for their supported in providing the raw material in this research. The author would like to thank of the Petroleum and Petrochemical College staff members for their help.

Finally, the author's thanks are also extended to all of his friends for their kindness, helpfulness, understanding, cheerfulness, good suggestions and invaluable assistances throughout this two-year study.

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	19
III EXPERIMENTAL	26
3.1 Materials	26
3.1.1 Shrimp shells	26
3.1.2 Squid pens	26
3.1.3 Other chemicals	26
3.2 Equipment	26
3.3 Methodology	27
3.3.1 Preparation of chitin	27
3.3.2 Characterization of chitin	28
3.3.3 Preparation of chitin gel	29
3.3.4 Preparation of chitin whisker	29
3.3.5 Characterization of α -chitin whisker	30
3.3.6 Preparation chitin and chitin nanocomposite films	30
3.3.7 Characterization of β -chitin film and chitin nanocomposite films	31

CHAPTER	PAGE
IV RESULTS AND DISSCUSSION	35
4.1 α -Chitin whisker morphology	35
4.2 Appearance of films	37
4.3 Mechanical properties	38
4.3.1 Tensile strength	38
4.3.2 Percentage of strain at break	38
4.3.3 Tensile modulus	39
4.4 Thermal property	41
4.5 FTIR study	42
4.6 Water adsorption ability	44
4.7 <i>in vitro</i> biodegradability	45
4.8 Oxygen permeability	47
4.9 X-ray diffraction	49
4.10 Cytotoxicity test by indirect method (MTT assay)	50
4.11 Cytotoxixity test by direct method (L929 fibroblast culture)	52
V CONCLUSIONS	54
REFERENCES	55
APPENDICES	60
Appendix A Mechanical Properties Data of Chitin and Chitin Nanocomposite Films.	60
Appendix B % Swelling data of chitin and chitin nanocomposite films.	67
Appendix C Biodegradability (% Weight loss) data of chitin and chitin nanocomposite films.	71

CHAPTER	PAGE
Appendix D Absorbance Data in Various Concentrations for Cytotoxicity Test by MTT Assay of Chitin and Chitin Nanocomposite Films.	74
CURRICULUM VITAE	77

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1.1	Chitin and chitosan in fungi	5
1.2	Chitin derivatives, the examples and their applications	11
4.1	Thickness of pure β -chitin film and chitin nanocomposite films	37
4.2	The oxygen permeability rate and permeability of β -chitin film and chitin nanocomposite films	48

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE	
1.1	Molecular structure of chitin and chitosan.	1
1.2	Schematic represent of the isolation of chitin, chitosan and their oligomers.	2
1.3	Mechanism of the synthesis of chitin in insects.	3
1.4	Transmission electron microscope picture (TEM) of α -chitin whisker	13
1.5	The degree of burns, normal skin (a), first degree burn (b), second degree burn (c) and third degree burn (d).	15
4.1	TEM image of α -chitin whisker at 10000x.	35
4.2	Histogram of the length distribution of α -chitin whisker.	36
4.3	Histogram of the width distribution of α -chitin whisker.	36
4.4	Tensile strength of pure β -chitin film and α -chitin whisker-reinforced β -chitin films in various content of whisker.	38
4.5	Percentage strain at break of pure β -chitin film and α -chitin whisker-reinforced β -chitin films in various content of whisker.	39
4.6	Tensile modulus of pure β -chitin film and α -chitin whisker-reinforced β -chitin films in various content of whisker.	39
4.7	Thermogravimetric analysis of pure β -chitin film (a), α -chitin whisker-reinforced β -chitin films in 0.25% (b), 0.5% (c) and 0.75% (d).	41
4.8	Thermogravimetric analysis of pure β -chitin film (a), α -chitin whisker-reinforced β -chitin films in 1% (b), 1.5% (c) and 2% (d).	41
4.9	FTIR results of pure β -chitin film and α -chitin whisker-reinforced β -chitin films in various content of whisker.	43

FIGURE	PAGE	
4.10	Percentage of swelling of pure β -chitin film (a), 0.5% α -chitin whisker nanocomposite film (b), 1% α -chitin whisker nanocomposite film (c) and 2% α -chitin whisker nanocomposite film (d).	44
4.11	Percentage of weight loss after enzymatic hydrolysis of pure β -chitin film (a), 0.5% α -chitin whisker nanocomposite film (b), 1% α -chitin whisker nanocomposite film (c) and 2% α -chitin whisker nanocomposite film (d).	45
4.12	Surface morphology of films investigated by SEM to display the effect of biodegradability of film under enzymatic hydrolysis, (a) and (b) show the surfaces of pure β -chitin film before and after enzymatic hydrolysis for 7 days, respectively, (c) and (d) show the surface of 2% w/v α -chitin whisker nanocomposite film before and after enzymatic hydrolysis for 7 days, respectively.	47
4.13	WAXD patterns of chitin film (a), 0.5% α -chitin whisker contained film (b), 1% α -chitin whisker contained film (c), 2% α -chitin whisker contained film (d) and α -chitin whisker (e).	49
4.14	Absorbance of MTT result at 570 nm for control and 8 diluted concentration of extracted solution from chitin nanocomposite film.	50
4.15	SEM images of L929 cultured on chitin nanocomposite, β -chitin, α -chitin and chitosan films for 1, 2 and 3 days.	52