SYNTHESIS, FABRICATION, AND BIOCOMPATIBILITY OF HEXANOYL CHITOSAN

Artphop Neamnark

A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
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

Thesis Title:	Synthesis, Fabrication, and Biocompatibility of Hexanoyl Chitosan
By:	Artphop Neamnark
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Pitt Supaphol Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit

---

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

Nantaya Yanumet ..... Dean

(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:

Nantaya Yanumet .....
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

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

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

.....
(Assoc. Prof. Anuvat Sirivat)

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

บทคัดย่อ

อาจพบ เนียมนาค : การสังเคราะห์ การขึ้นรูป และ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเฮกซะโนอิลไคโตซาน (Synthesis, Fabrication, and Biocompatibility of Hexanoyl Chitosan) อ. ที่ปรึกษา : รองศาตราจารย์ ดร.พิชญ์ ศุภผล และ รองศาตราจารย์ ดร.รัตนา รุจิรวนิช 93 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสังเคราะห์ การขึ้นรูป และ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเฮกซะโนอิลไคโตซานเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในทางการแพทย์ ได้ทำการสังเคราะห์เฮกซะโนอิลไคโตซานโดยปฏิกิริยาเอซิเลชั่นจากผงไคโตซานกับคาโปรอิล คลอไรด์ (เฮกซะโนอิล คลอไรด์) และได้วิเคราะห์เฮกซะโนอิลไคโตซานที่ได้ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโกปีและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีเพื่อยืนยันการเข้าแทนที่ของหมู่เฮกซะโนอิลในโมเลกุลไคโตซาน จากการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบแสดงให้เห็นถึงจำนวนหมู่เฮกซะโนอิลที่เข้าแทนที่ต่อหนึ่งหน่วยกลูโคซามีน ได้ศึกษาเสถียรภาพทางความร้อนของเฮกซะโนอิลไคโตซานโดยเครื่องศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน ส่วนการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้นได้ทำการศึกษา ความเป็นพิษของฟิล์มเฮกซะโนอิลไคโตซาน การเกาะ การเพิ่มจำนวน และการแผ่ของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มเฮกซะโนอิลไคโตซาน นอกจากนั้นได้ทำการขึ้นรูปเส้นใยเฮกซะโนอิลไคโตซานด้วยเทคนิคกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตและได้ศึกษาตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อขนาดและลักษณะของเส้นใยที่ได้ จากลักษณะของแผ่นเส้นใยที่ได้เป็นโครงสร้างสามมิติที่ประกอบไปด้วยเส้นใยขนาดเล็กจำนวนมากและมีความเป็นรูพรุนสูงซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโครงร่างของเนื้อเยื่อในร่างกายที่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแผ่นเส้นใยไปใช้เป็นวัสดุโครงร่างเนื้อเยื่อเทียมจึงได้ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยทดสอบความเป็นพิษ และการเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (HFF) และเคราติโนไซต์ (HaCaT) บนแผ่นเส้นใย ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยังได้แสดงให้เห็นลักษณะและรูปร่างของเซลล์ที่เกาะอยู่บนวัสดุต่างๆในการศึกษานี้ด้วย

ABSTRACT

4682004063: Polymer Science Program
Artphop Neamnark: Synthesis, Fabrication, and Biocompatibility of Hexanoyl Chitosan.
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Pitt Supaphol and Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, 93 pp.
Keywords: Chitosan/ Acyl chitosan/ Electrospinning/ Nanofibers/ Biocompatibility/ Tissue scaffold

Hexanoyl chitosan (H-chitosan) was synthesized via a heterogeneous acylation reaction between chitosan powder and caproyl chloride. Successful substitution of hexanoyl side chains onto chitosan was confirmed by means of Fourier-transformed infrared spectrometry (FT-IR) and proton-nuclear magnetic resonance spectrometry (^{1}H-NMR). An elemental analysis result indicated the degree of substitution of hexanoyl groups per glucosamine unit of chitosan. Further biocompatibility evaluations of H-chitosan film comprised the cytotoxicity testing, and the attachment, proliferation, and spreading of L929 cells cultured on the surface of H-chitosan film were determined *in vitro*. Moreover, a H-chitosan non-woven mat composed of submicrofibers was successfully fabricated by electrospinning technique. The size and morphology of the as-spun fibers was dependent on several variables including solution concentration, applied electric potential, and salt addition as revealed by scanning electron microscope (SEM) images. The possible use of the electrospun mat as a tissue scaffold or a wound dressing material was further assessed *in vitro*. Non-toxicity of the electrospun mat was revealed by indirect cytotoxicity test with L929 cells. The electrospun mat was evaluated in terms of attachment and proliferation of human keratinocytes (HaCaT) and human foreskin fibroblasts (HFF) that were seeded and cultured on the scaffolds at different time points. In addition, the interactions of the cells cultured on the fibrous scaffolds with each other and with the surrounding fibers were investigated through SEM images.

ACKNOWLEDGEMENTS

Appreciation is expressed to those who have made contributions to this dissertation. First the author gratefully acknowledges his advisors, Assoc. Prof. Pitt Supaphol and Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, from The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, for giving him invaluable knowledge, meaningful guidance and their encouragement all along the way. He also would like to express his sincere thanks to Professor Hasan Uludağ and colleagues from the University of Alberta for giving him useful advises, suggestions and opportunities to learn new research experiences and incredible ways of thinking while he did a short research at the University of Alberta.

He gratefully acknowledges all faculty members and staffs at The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their knowledge and assistance. Moreover he would like to give his special thanks to all members in his research group and all of his friends for their kind assistance, continual encouragement and wonderful friendship.

Assoc. Prof. Nantaya Yanumet, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, Assoc. Prof. Anuvat Sirivat, and Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue are further acknowledged for being his dissertation committees, making valuable comments and suggestions.

He wishes to express his deep gratitude to his family for their unconditioned love, understanding and very supportive during all these years spent for his Ph.D. study.

Finally, he is grateful for the partial fund by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PPT Consortium), and a doctoral scholarship received from the Royal Golden Jubilee Ph.D program, the Thailand Research Fund. This work would not be carried out successfully without all financial supports.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

CHAPTER IV

CHAPTER V

FIGURE **PAGE**

ABBREVIATIONS

^{1}H-NMR	^{1}H-Nuclear magnetic resonance
d	Day
DD	Degree of deacetylation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DS	Degree of substitution
EA	Elemental analysis
ECM	Extracellular matrix
FBS	Fetal bovine surum
FT-IR	Fourier-transformed infrared spectrometry
h	Hour
H-chitosan	Hexanoyl chitosan
HFF	Human foreskin fibroblast
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-tetrazoluim bromide
PBS	Phosphate buffer saline
PF	Pyridinium formate
SEM	Scanning electron microscopy
SFM	Serum-free medium
TCPS	Tissue-culture polystyrene plate
TGA	Thermogravimetric analysis
THF	Tetrahydrofuran

LIST OF SYMBOLS

γ	Surface tension
ρ	Density
V_*	Critical Potential
V_c	Critical Voltage
T_m	Melting temperature
T_d	Degradation temperature
$[\eta]$	Intrinsic viscosity
$\bar{M}_v$	Viscosity-average molecular weight