



Production of nanofibers from chitosan extracted from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) wastes by single nozzle and core-shell methods

Parva Safari¹, Eshagh Zakipour Rahimabadi^{2*}, Mohammadreza Vaezi³, Aliasghar

Behnamghader⁴

1. PhD graduate, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran
2. Associated Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran
3. Associated professor, Research Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Tehran, Iran
4. Associated professor, Research Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Tehran, Iran

Received: 16-May-2024

Accepted: 14-Jul-2024

Abstract

The purpose of the present research is to investigate the possibility of producing nanofibers from chitosan extracted from black tiger shrimp (*P. monodon*) waste and the effect of nanofiber dimensions on the toxicity of primary polymers with the potential to be used in the production of wound dressings. In this research, two methods were used to produce nanofibers from the extracted chitosan polymer, which included single-needle and co-electrospinning, and in the second method, an attempt was made to produce fibers with core loading capability. Electrospun nanofibers were examined by field electron microscopy (FE-SEM) in terms of morphological characteristics. Also, various analytical technologies including FTIR (Fourier Infrared Spectroscopy) and XRD (X-ray Diffraction) were used to examine the structure of the produced nanofibers. Also, the toxicity of the produced nanofibers compared to the primary polymer was measured by the MTT method. The Fourier spectroscopy diagrams and X-ray diffraction peaks showed the presence of chitosan and polyvinyl alcohol polymers and their proper interactions. Also, the results showed that high-quality and continuous nanofibers without bead were obtained in both single-needle and core-shell methods. The interesting point is the creation of core space in core-shell nanofibers with the possibility of loading various polymers and secondary nanoparticles. This is a potential for its use in various applications, especially such as wound dressings. In addition to that, achieving less toxicity in the produced nanofibers compared to the primary polymers, proposed the potential of nanotechnology in different sciences.

Keywords: Chitosan extraction, Nanofiber, SEM, Cytotoxicity



تولید نانوالیاف از کیتوزان استخراج شده از ضایعات میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) به دو روش تک نازله و دونازله و هسته-پوسته

پروا سفری^۱، اسحق زکی پور رحیم آبادی^{۲*}، محمدرضا واعظی^۳، علی اصغر بهنام قادر^۴

۱. دانش‌آموخته دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان، ایران

۳. دانشیار گروه پژوهشی مواد نانو، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، تهران، ایران

۴. دانشیار گروه پژوهشی مواد زیستی، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۷

چکیده

هدف از تحقیق حاضر، بررسی امکان تولید نانوالیاف از کیتوزان استخراج شده از ضایعات میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) و تأثیر ابعاد نانوالیاف بر میزان سمیت پلیمرهای اولیه با پتانسیل کاربرد در تولید زخم‌پوش است. در این تحقیق، از دو روش برای تولید نانوالیاف از پلیمر کیتوزان استخراج شده استفاده گردید که شامل الکتروریسی تک‌نازله و دونازله بوده، که در روش دوم سعی بر تولید الیاف با قابلیت بارگذاری هسته بود. نانوالیاف الکتروریسی شده از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی تحت بررسی میکروسکوپ الکترونی فیلد میدانی (FE-SEM) قرار گرفت. همچنین از فناوری‌های آنالیزی مختلف شامل FTIR (طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه) و XRD (پراش اشعه ایکس) برای بررسی‌های ساختاری نانوالیاف تولیدشده استفاده گردید. همچنین میزان سمیت به روش MTT نانوالیاف تولیدشده نسبت به پلیمر اولیه سنجش گردید. بررسی نمودارهای طیف‌سنجی مادون فوریه و پیک‌های پراش اشعه ایکس وجود پلیمرهای کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل و اختلاط مناسب آنها را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که نانوالیاف با کیفیت و ممتد بدون گره در هر دو روش تک‌نازله و دونازله به دست آمد. نکته جالب، ایجاد فضای هسته در نانوالیاف دو نازله بود که با امکان بارگذاری انواع پلیمرها و نانوذرات ثانویه، پتانسیل کاربری خود را در زمینه‌های مختلف به‌خصوص حوزه درمان و تولید زخم‌پوش نشان داد. علاوه بر آن، دستیابی به سمیتی کمتر در نانوالیاف تولید شده نسبت به پلیمرهای اولیه، پتانسیل کاربرد نانوتکنولوژی را در علوم مختلف نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: استخراج کیتوزان، نانوالیاف، میکروسکوپ الکترونی، سمیت سلولی

۱. مقدمه

شده است کاربردهای بسیاری را به صورت محلول، ژل، فیلم و یا لیاف داشته باشد. کیتوزان به طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله صنایع دارویی و پزشکی، صنعت غذایی، کشاورزی، آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد (Furuike et al., 2017).

بسیاری از هیدروژل‌های کیتوزان از طریق تیمار با آنیون‌های چندظرفیتی به دست می‌آیند. مخلوط‌ها و کامپوزیت‌ها بر این اساس توسط پژوهشگران آماده‌سازی شده‌اند. دیگر سیستم‌هایی که در ادبیات علمی آورده شده است شامل: کیتوزان/پلی‌آمید، کیتوزان/الیاف سلولز، کیتوزان/سلولز با استفاده از یک حلال معمول، کیتوزان/پلی‌اتیلن‌گلیکول، کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل و کیتوزان/پلی‌وینیل‌پیرولیدین است. مزیت کیتوزان در چنین ساختارهایی نه تنها به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری و خاصیت آنتی‌باکتریال آن بوده، بلکه به دلیل خاصیت هیدروفیلیکی است که توسط گروه‌های قطبی به سیستم اضافه می‌گردد که قادر خواهد بود واکنش‌های ثانویه‌ای را در حوزه‌ی گروه‌های عاملی هیدروکسیل و آمین شکل دهد که منجر به درگیری باندهای هیدروژنی با دیگر پلیمرها می‌گردد. پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای هم‌اکنون در زمینه‌های دارویی، زیستی و آرایشی اتفاق افتاده است (Wang et al., 2005).

در زمینه‌ی تولید نانوالیاف، الکتروروسی روشی است که مواد در حالت محلول یا مذاب به شکل لیاف ممتد با اندازه‌ی میکرو و یا نانو درمی‌آیند. در این روش محلول‌های پلیمری به دلیل اعمال کشش بر لیاف و با استفاده از برق ولتاژ بالا به صورت لیاف نانومتری درمی‌آیند. این تکنیک باعث بهبود خواص و کاهش مقدار مصرف پلیمر با توجه به هزینه‌ی آن و دنبال نمودن یک رویکرد اقتصادی در پژوهش‌های مختلف می‌گردد (Zeng et al., 2003).

الکتروروسی دوازده اولین بار برای افزایش ویژگی‌های کیفی لیاف‌های نهایی، استفاده گردید و شامل مخلوط پلیمرها در حلال‌های مشابه یا مخلوط محلول پلیمری مختلف بود که با استفاده از ابزار الکتروروسی مرسوم انجام می‌گردد. در این نوع الکتروروسی، پلیمر حامل و مولکول‌های زیستی قبل از فرایند الکتروروسی مخلوط می‌شود که منجر به جایگیری مولکول‌های زیست‌فعال در سطح لیاف‌ها می‌گردد و به دنبال آن کاهش زیست‌فعالی اتفاق می‌افتد (Hu et al., 2014).

سیستم‌های رسانش مختلفی برای ارتقای اثرات درمانی و کاهش سمیت دوزهای مختلف دارویی وجود دارد.

تولید مواد غذایی مدرن، حجم بالایی از ضایعات را تولید می‌کند. در تولیدکنندگان عمده ماهی و آبزیان، پسماند حاصل از برداشت محصولات دریایی تقریباً به ۵۰ درصد کل محصول می‌رسد. در مورد سخت‌پوستان حجم این ضایعات می‌تواند بالغ بر ۷۵ درصد وزن کل را شامل شود. این مواد اغلب بی‌استفاده بوده و به عنوان ضایعات دورریختنی تلقی می‌گردد (Hamdi et al., 2017). این حجم انبوه ضایعات شامل سر، دم، پوست، امعاء و احشاء، استخوان‌های اسکلتی و پوسته‌ها می‌تواند غنی از آنزیم‌های هضمی با قابلیت تطابق با دمای پایین، کیتین، کیتوزان و رنگدانه‌ها است که امکان بازیابی و فرآوری آنها با اهداف کاربردهای تجاری وجود دارد (Younes et al., 2016).

ضایعاتی که اغلب دارای موادی با ارزش بالا هستند که از نقطه نظر سلامتی نیز می‌توانند مورد توجه قرار گیرند (Venugopal, 2011). البته تولید این ضایعات در طول عمل‌آوری و تولید مواد غذایی غیرقابل اجتناب است، اما مسئله مهم مدیریت ضایعات برای صنایع درگیر است، به ویژه اگر این امحا به صورت اصولی، منطقی و مطابق با معیارهای علمی و محیط‌زیستی نباشد، می‌تواند خود منشأ مشکلات بزرگ‌تری باشد (Hamdi et al., 2017). استفاده از ضایعات و مواد خام ضمن فرآیند در عمل‌آوری آبزیان مسئله‌ای بسیار حائز اهمیت در صنعت محصولات شیلاتی است، که در مسائل اقتصادی و محیط زیستی باعث حصول منافع درازمدت بسیاری خواهد شد. سالانه در حدود ۱۰^{۱۰} تا ۱۰^{۱۱} تن کیتین توسط ارگانسیم‌های مختلف تولید می‌شود که اغلب از منابع دریایی قابل تأمین است که از ضایعات سخت‌پوستان ایجاد می‌گردد. میزانی که برای توسعه و ایجاد روش‌ها و محصولات ارزش افزوده کافی به نظر می‌رسد (Hamdi et al., 2017). مهم‌ترین مشتق کیتین، کیتوزان است که با فرآیند استیل‌زدایی کیتین در حالت جامد تحت شرایط قلیایی و یا هیدرولیز آنزیمی به دست می‌آید (Rinaudo., 2006). انحلال با عملکرد پروتئنه‌شدن گروه آمینو واقع در موقعیت کربن شماره‌ی ۲ واحدهای تکرارشونده‌ی دی‌گلوکز آمین اتفاق می‌افتد، که به موجب آن پلی‌ساکارید به پلی‌الکترولیت محلول در محیط اسیدی تبدیل می‌شود (Khor and Lim., 2003). کیتوزان تنها پلیمر کاتیونی طبیعی است و بنابراین کاربردهای زیادی به دنبال خصوصیات منحصر به فرد آن ایجاد گردیده است. ویژگی حلالیت آن باعث

استفاده از روش Safari و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد.

۳.۲. الکتروریسی و تهیه محلول‌های کامپوزیتی

پلیمری

ابتدا محلول‌های پلیمری جهت الکتروریسی (شامل کیتوزان/ پلی‌وینیل‌الکل) به‌صورت جداگانه تهیه گردیدند. محلول کیتوزان با غلظت وزنی/حجمی ۲٪ و در محلول اسیداستیک ۸۰٪ آماده شدند، پلیمر پلی‌وینیل‌الکل نیز در حلال مشابه ساخته شد. نسبت اختلاط بین پلیمرهای کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل ۱۰۰/۸۰، ۲۰/۸۰، ۴۰/۶۰، ۵۰/۵۰، ۶۰/۴۰، ۸۰/۲۰ و ۱۰۰/۰ درصد در نظر گرفته شد. محلول‌های مختلف به آرامی و تحت تکان مداوم طی چندین ساعت هم‌زده شد تا پلیمرهای مرجع به‌صورت مجزا به‌طور کامل در حلال موردنظر حل شوند. پس از آن نسبت‌های ترکیبی اعمال و مجدداً روی همزن مغناطیسی قرار گرفت تا به مدت چندین ساعت از اختلاط کامل دو پلیمر اطمینان حاصل گردید و جدایی فازی مشاهده نگردد. مقدار ۵-۲ میلی‌لیتر محلول مخلوط در سرنگ‌هایی با حجم مطلوب ریخته و پس از آماده‌سازی اتصالات، داخل دستگاه الکتروریسی نصب گردید. انتهای باز سرنگ به یک سوزن استیل ضدزنگ با گاج شماره ۲۲ متصل شد که به‌عنوان نازل استفاده گردید. نوک سرنگ‌ها و جمع‌کننده‌ها به ترتیب به آند و کاتد ژنراتور برق متصل گردیدند. ولتاژ دستگاه ۱۵ کیلوولت و فاصله نوک سوزن سرنگ با صفحه جمع‌کننده در فاصله ۱۵ سانتی‌متر و با نرخ تغذیه ۵/۰-۱/۰ میلی‌لیتر در ساعت تنظیم گردید. روند الکتروریسی در شرایط محفظه کاملاً بسته در دمای اتاق و رطوبت کمتر از ۳۰ درصد انجام گردید. پس از بهینه‌سازی الکتروریسی در روش تک‌نازله، از تیمار بهینه برای بارگذاری هسته کیتوزان ۲ درصد در روش الکتروریسی دونا‌زله^۲ استفاده شد. پس از تولید نانوالیاف، نحوه شکل‌گیری، تشکیل و تولید الیاف بر سطح آلومینیومی مورد بررسی قرار گرفت (Nguyen et al., 2011; Tchemtchoua et al., 2011;) (Abdelgawad et al., 2014)

فرمولاسیون‌هایی با مقیاس نانو مانند لیپوزوم‌ها، میسل‌های پلیمری، کمپلکس‌ها و نانوالیاف توجه ویژه‌ای را در طول دهه گذشته به خود معطوف داشته‌اند. در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها، الکتروریسی انعطاف‌پذیری بالایی را در انتخاب مواد و داروها برای کاربردهای رسانش عرضه داشته‌اند. ظرفیت بالای بارگذاری، کارایی بالای انکپسوله، رسانش هم‌زمان مواد دارویی، سادگی اجرا و صرفه اقتصادی نیز از ویژگی‌های مطلوب استفاده رسانش دارویی به‌خصوص برای مواد زخم‌پوشش و شیمی‌درمانی موضعی بعد از عمل جراحی است (Teng et al., 2020).

در تحقیق حاضر، بر یک روند پیوسته از تولید پلیمر از ضایعات میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) و بررسی امکان تولید نانوالیاف از پلیمر استخراج شده توسط فرآیند الکتروریسی تمرکز گردید. همچنین تولید نانوالیاف با تکنیک‌های مختلف ایجاد نانوالیاف شامل الکتروریسی تک‌نازله و الکتروریسی دونا‌زله با هدف ایجاد فضای هسته در درون نانوالیاف انجام شد. خصوصیات ساختاری و سمیت زیستی نانوالیاف تولیدشده از کیتوزان استخراج شده به‌منظور بررسی کیفیت و امکان‌سنجی پتانسیل کاربرد آن در زمینه‌های به‌روز چون غذا و درمان بررسی گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد شیمیایی

اسید هیدروکلریک (۳۷ درصد)، اسیداستیک^۱ (مرک و مجلی-ایران)، اتانول و تمامی مواد شیمیایی در این مطالعه از نوع آزمایشگاهی و با درجه خلوص بالا از نمایندگی شرکت‌های مرک و دکتر مجلی خریداری گردیدند.

۲.۲. استخراج کیتین و سنتز کیتوزان

از ضایعات پوسته میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) برای تهیه کیتوزان استفاده گردید. مواد خام تهیه‌شده از کارخانه فرآوری آبیان با آب گرم شیر شستشو شده و تمامی ناخالصی‌ها و مواد ارگانیک چسبیده به پوسته‌های خام شست‌وشو و پاک‌سازی شد. در مرحله بعد استخراج کیتوزان با

¹ CH₃ COOH

² Uniaxial and Coaxial

۴.۲. مشخصه‌نمایی نانوالیاف

آنالیز ریخت‌شناختی الیاف ترکیبی کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی فیلد میدانی (MIRA3-TESCAN-XMU) انجام شد. نمونه‌ها با لایه‌ای نازک از طلا-پلاتین تحت شرایط وکیوم توسط یک پوشاننده پاششی روکش گردید. آنالیز در ولتاژ ۲۰ KV انجام و تصاویر نمونه‌ها از مناطق مختلف و در چندین بزرگنمایی ثبت گردید.

به‌منظور اندازه‌گیری قطر نانوالیاف برای هر نمونه، ۵۰ نانوالیاف از هر نمونه به‌طور تصادفی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده، انتخاب و میانگین قطر الیاف مت‌های الکترونیسی شده توسط نرم‌افزار آنالیز تصاویر (Image J 1.52p. USA) اندازه‌گیری گردید.

بررسی‌های طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR): طیف‌سنجی FTIR نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل در گستره‌ای بین $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ با رزولوشن 1 cm^{-1} انجام شد (پژوهشگاه مواد و انرژی-کرج). طیف‌سنجی نمونه‌های منتخب در روش تک و دو نازله، با استفاده از نمک پتاسیم‌برمید انجام شد (Homayoni et al., 2009a).

پراش اشعه ایکس (XRD): بررسی پیک‌های نمونه‌ها توسط دستگاه پراش گر اشعه ایکس (XRD-7000, Shimadzu, Japan) انجام شد (پژوهشگاه مواد و انرژی-کرج). اسکن‌های پیوسته θ در رنج ۶۰-۵ درجه در فاصله‌گذاری‌های ثابت ۰/۰۲ برای ترسیم گراف‌ها انجام شد. مشخصه‌نمایی با استفاده از پراش گر اشعه ایکس در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۴۰ میلی‌آمپر انجام گردید.

آزمایش سمیت سلولی (MTT): بررسی سمیت سلولی مطابق با استاندارد ASTM F895-11 انجام گردید (شرکت ژینوژن پژوهان-تهران). در این مطالعه، نانوالیاف در محیط کشت سلولی برای بررسی اثرات این نانوالیاف بر رشد سلولی بررسی گردید. جهت بررسی و ارزیابی‌های سمیت نانوالیاف کامپوزیتی، سلول‌های کشت‌داده شده در تماس با نانوالیاف یا مواد انتشاریافته قرار گرفت. به‌طور خلاصه، آزمایش‌ها در پلیت‌های کشت پلی‌استیرن ۹۶-چاهکه و با استفاده از سلول‌های فیبروبلاست موشی انجام گردید. نمونه (۲-۱/۵) که با اشعه

UV استریل شده بودند در محیط کشت بدون سرم که شامل DMEM^۱، ال-گلوتامین ۱ درصد، و آنتی‌بیوتیک و آنتی-مایکوتیک ۱٪ غوطه‌ور گردید و به مدت ۲۴ ساعت، انکوباسیون برای تولید مدیوم استخراج انجام شد. پس از فیلتراسیون محیط (۰/۲ میکرومتر)، سلول‌های فیبروبلاست به‌طور جداگانه در پلیت ۹۶ چاهکه با 10^4 سلول/چاهک در سرم به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس محیط با مدیوم استخراج نمونه‌های داربست نانوالیاف روش تک و دو نازله (۱۰۰ میکرولیتر) جایگزین گردید. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، میزان سمیت و زنده‌مانی سلول‌های کشت‌داده شده از هر مدیوم توسط روش MTT^۲ تعیین گردید. جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر و توسط دستگاه الیزاریدر تعیین می‌گردد. زنده‌مانی سلول‌های کشت‌داده‌شده در SFM تازه به‌عنوان کنترل استفاده شد.

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طراحی آزمایش‌ها براساس طرح فاکتوریل صورت گرفت. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف سنجیده شد. همچنین از آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌ها استفاده شد. لازم به ذکر است که تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای Origin، (نسخه ۲۶) SPSS، Excell (2016) انجام شد. همچنین برای تعیین قطر نانوالیاف از نرم‌افزار (Image J 1.52p. USA) استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. الکترورسی کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل

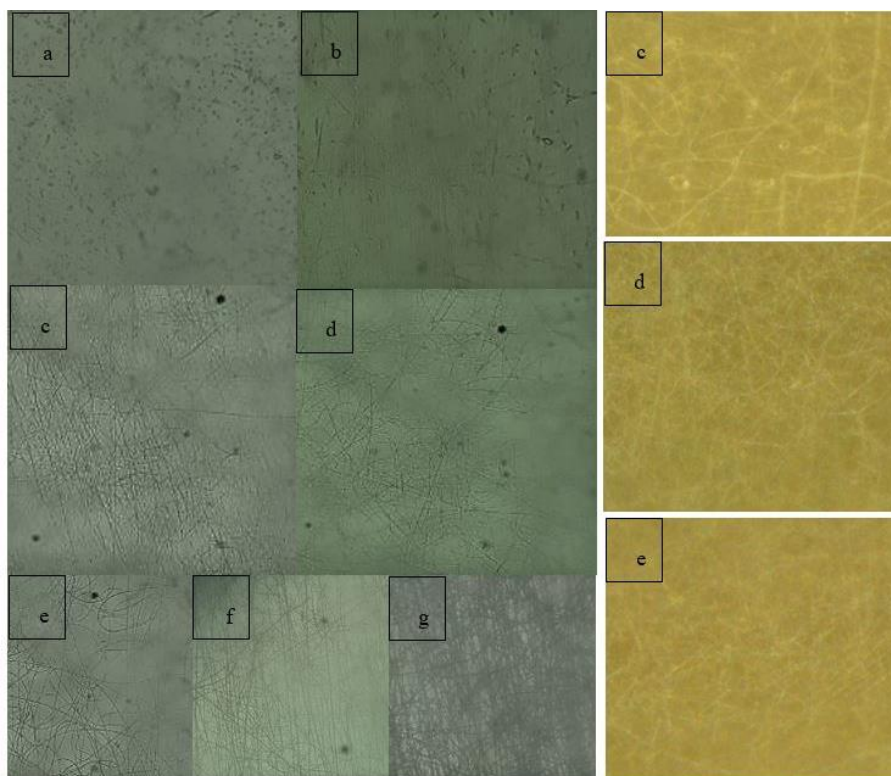
مشخصه‌های ریختی الیاف توسط میکروسکوپ نوری در تیمارهای مختلف بررسی گردید. سپس ساختار الیاف توسط میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است طی فرآیند الکترورسی، با ترکیب نسبت درستی از غلظت پلیمرها و نسبت اختلاط آن‌ها، به الیافی صاف و ممتد در غلظت اسیداستیک ۸۰ درصد دست یافته شد.

^۱ Dulbecco's Modified Eagle Medium

^۲ MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

پلی‌وینیل‌الکل به دلیل کاهش سهم کیتوزان کنار گذاشته شد. نسبت‌های کمتر از ۴۰ درصد کیتوزان نیز به دلیل وجود گره در الیاف با شدت‌های مختلف نیز از تیمارها حذف گردیدند. در دو نسبت کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل ۴۰/۶۰ و ۵۰/۵۰ الیاف مناسبی به دست آمد. نسبت کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل ۴۰/۶۰ هر چند دارای میزان سهم بیشتر کیتوزان و تشکیل الیاف یک‌دست بود اما گاهی به دلیل مشاهده مقدار بسیار کمی گره، نسبت بهینه در نسبت ۵۰/۵۰ قرار داده شد که دارای الیاف کاملاً بی‌نقص بود. در مرحله دوم از نسبت بهینه برای تولید پوسته در الکتروریسی دوناژله همراه بارگذاری هسته کیتوزان ۲ درصد با هدف افزایش میزان کیتوزان در کامپوزیت، استفاده گردید.

هر چه درصد میزان کیتوزان در کامپوزیت افزایش یابد، میزان تشکیل الیاف پیوسته و بدون گره کاهش یافته است. پلیمر کیتوزان به تنهایی قابلیت الکتروریسی و تولید الیاف بدون گره را نداشته و به همین دلیل پلیمر کمکی نیز به مخلوط اضافه گردید. از سایر نسبت‌ها به دلیل مقادیر کمتر کیتوزان در مخلوط صرف- نظر گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوالیاف الکتروریسی تک‌نازله از تیمارهای حاصل از ترکیب دو پلیمر کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل را در نسبت‌های مختلف و در حلال اسیداستیک ۸۰ درصد نشان می‌دهد. میزان گره‌ها با افزایش پلیمر پلی‌وینیل‌الکل و کاهش پلیمر کیتوزان، کاهش یافت. به طوری که تقریباً از نسبت کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل ۶۰/۴۰، الکتروریسی بسیار بهتری مشاهده شد. نسبت‌های با میزان بالاتر از ۶۰ درصد



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ نوری از تیمارهای کیتوزان ۲ درصد پلی‌وینیل‌الکل ۸ درصد در نسبت‌های مختلف a (۰/۱۰۰)، b (۲۰/۸۰)، c (۴۰/۶۰)، d (۵۰/۵۰)، e (۶۰/۴۰)، f (۸۰/۲۰)، g (۱۰۰/۰) - (سمت چپ).
تصاویر میکروسکوپ اینورت از تیمارهای c (۴۰/۶۰)، d (۵۰/۵۰)، e (۶۰/۴۰) - (سمت راست) - روش تک‌نازله.

داده شد و فرآیند الکتروریسی تحت تأثیر متغیر نسبت‌های اختلاط دو پلیمر انجام گردید. شکل‌های ۲ تا ۵ تصاویر نانوالیاف به دست آمده از پلیمرهای کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل را در نسبت بهینه نهایی هر یک از روش‌های الکتروریسی

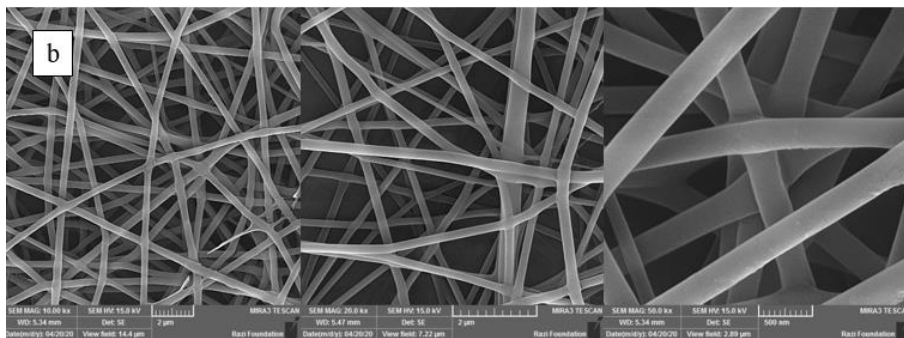
۲.۳. تولید نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل به

روش‌های تک و دو نازله در تیمار بهینه

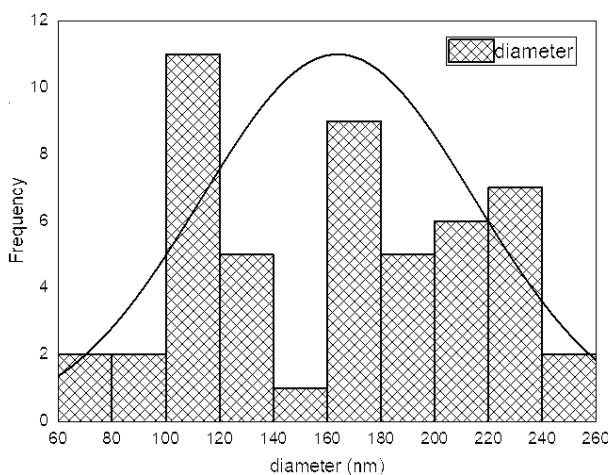
شاخص‌های مؤثر بر الکتروریسی در طول فرآیند تغییر

تک نازله برای کیتوزان/پلی وینیل الکل نشان می‌دهد. کیفیت الیاف و عدم وجود بید در امتداد نانوالیاف به خوبی در بزرگنمایی‌های ارائه شده مشخص است.

تک نازله و دونازله نشان می‌دهد. میانگین قطر نانوالیاف نیز به صورت نمودار میله‌ای به طور مجزا در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طور که از تصاویر میکروسکوپی مشخص است الیاف با کیفیت بسیار عالی، کشیده و بدون گره در روش



شکل ۲ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی کیتوزان ۲٪ / پلی وینیل الکل ۸٪ (۵۰:۵۰) در سه بزرگنمایی مختلف (FE-SEM-10X-20X-50X) - روش تک نازله



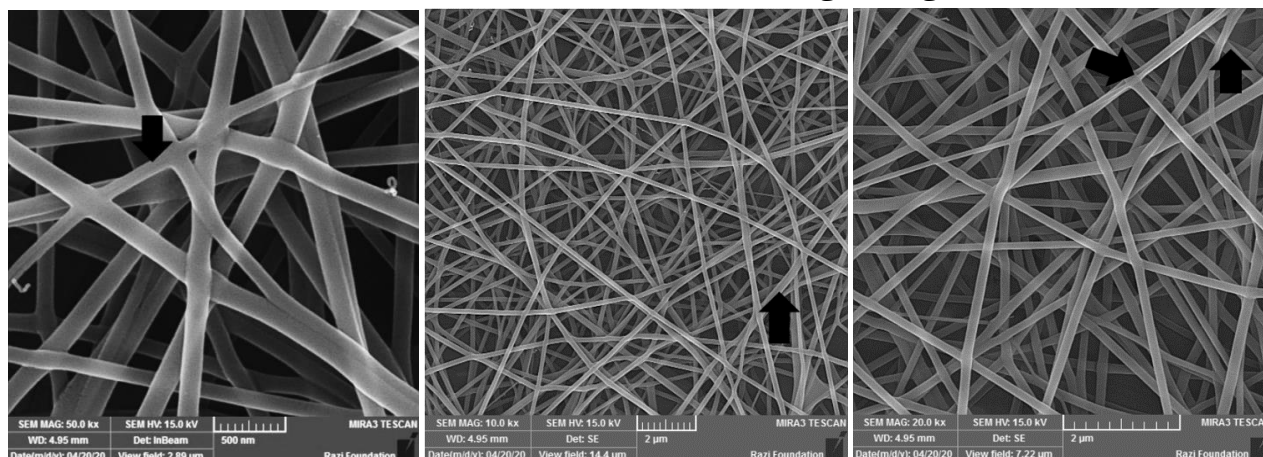
شکل ۳- نمودار تعیین توزیع قطر نانوالیاف کامپوزیت کیتوزان ۲٪ / پلی وینیل الکل ۸٪ (پوسته ۵۰:۵۰) (توسط نرم افزار Image J - روش تک نازله).

ساختار گره‌مانند گردیده است. تأیید تشکیل ساختار هسته-پوسته به خوبی از تصاویر FE-SEM در بزرگنمایی‌های بسیار بالاتر قابل استنباط است که با فلش‌های سیاه در اشکال مختلف علامت‌گذاری گردیده است. بنابراین نسبت بهینه برای تشکیل پوسته به طور موفقیت‌آمیزی توانسته است ساختار هسته را پوشش دهد و منجر به تولید الیاف مناسب با بارگذاری هسته کیتوزان گردد. برر سی میانگین قطر نانوالیاف در شکل ۵ ارائه شده است که توزیع قطر نانوالیاف در محدوده کمتر از ۲۵۰ نانومتر نشان می‌دهد. مقایسه توزیع قطری

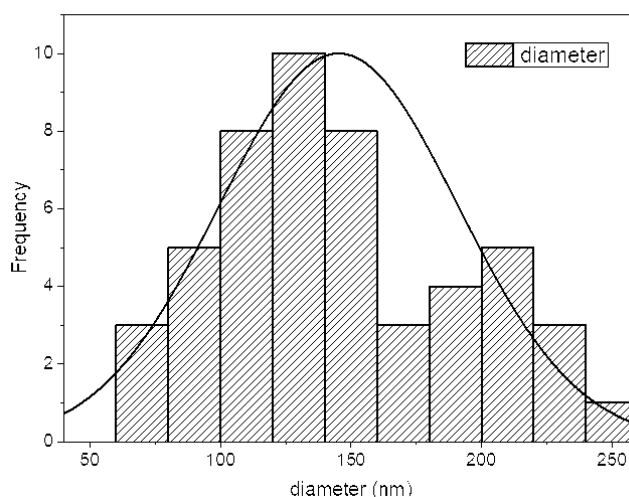
نانوالیاف در نسبت و درصد پلیمری بهینه به خوبی تشکیل شده است. نتایج بررسی قطر نانوالیاف‌ها نشان داد که میانگین قطر نانوالیاف در روش تک نازله به کمتر از ۲۵۰ نانومتر رسیده است. شکل ۴ تصاویر FE-SEM نانوالیاف را در نسبت بهینه کیتوزان/پلی وینیل الکل ۵۰/۵۰ (پوسته) و کیتوزان ۲درصد (هسته) را در روش الکترورسی دونازله نشان می‌دهد. همان طور که از شکل‌های میکروسکوپی در بزرگنمایی‌های مختلف مشخص است الکترورسی در روش دونازله و در نسبت بهینه کاملاً موفق به تولید نانوالیاف صاف، کشیده و بدون

قشری نانوالیاف تولید شده نشان نداد.

روش های تک نازله و دونازله تفاوتی واضحی را در میانگین



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی کامپوزیت کیتوزان ۲٪ (هسته) - کیتوزان ۲٪ / پلی وینیل الکل ۸٪ (پوسته) ۵۰:۵۰ در سه بزرگنمایی مختلف (FE-SEM-10X-20X-50X) - روش دو نازله (هسته-پوسته)



شکل ۵- نمودار تعیین توزیع قطر نانوالیاف کامپوزیت کیتوزان ۲٪ (هسته) - کیتوزان ۲٪ / پلی وینیل الکل ۸٪ (پوسته) ۵۰:۵۰ (توسط نرم افزار Image J. روش دو نازله (هسته-پوسته))

کنترل منفی (عدم کشت با داربست‌های نانوالیافی) هیچ تفاوت معنی‌داری را در زنده‌مانی سلولی نشان ندادند. شکل ۶ میزان درصد سمیت پلیمر خالص کیتوزان و نانوالیاف کامپوزیتی حاوی کیتوزان را در دو روش تک و دونازله نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که داربست‌های الکترورسی شده اثرات سمی معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست موشی نداشتند. بنابراین عدم سمیت نانوکامپوزیت‌ها در هر دو روش تک‌نازله و هسته-پوسته به‌وضوح تأیید شده و پتانسیل خوبی برای تهیه داربست‌های درمانی نشان دادند. میزان زنده‌مانی

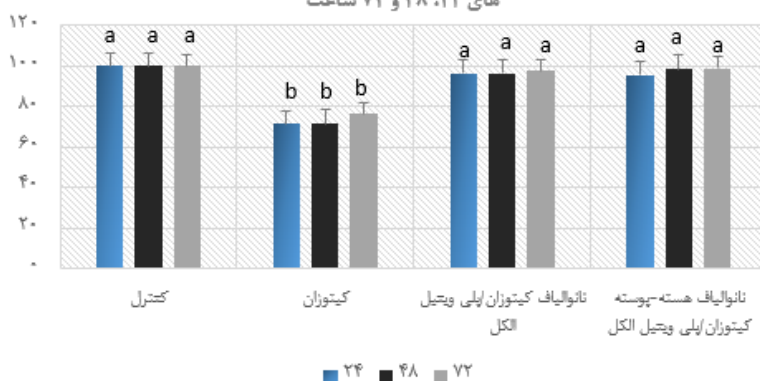
۳.۳. بررسی سمیت سلولی

سلول‌های ابتدایی فیبروبلاست پو ستی موش با نمونه‌های کیتوزان خالص، نانوالیاف تک نازله کیتوزان ۲درصد / پلی وینیل الکل، نانوالیاف هسته-پوسته کیتوزان ۲درصد / پلی وینیل الکل و نمونه کنترل منفی به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. نتایج سمیت شناسی تمامی نمونه‌ها توسط تست MTT بررسی گردید. سلول‌های کشت‌داده شده با داربست‌های نانوالیافی کیتوزان در هر دو روش تک و دونازله در مقایسه با

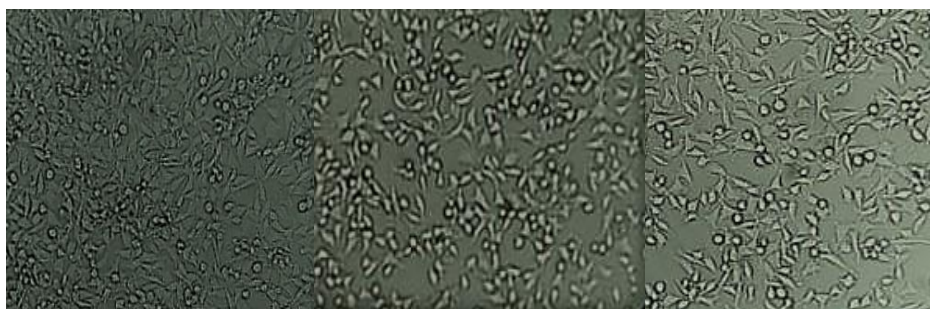
پوسته نسبت به الیاف تک نازله دیده شد که نشان از رهايش مداوم با زمان بوده که میزان شوک سلولی را کاهش داده است. اما در نهایت دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۵ درصد (شکل ۶) علاوه بر اثبات عدم سمیت و تطابق زیستی عالی ترکیبات کامپوزیت، همچنین می‌تواند تأثیر ابعاد نانو را تغییر خصوصیات ماده و افزایش پتانسیل کاربری پلیمر را نشان دهد. شکل ۷ نتایج تکثیر کشت‌های سلولی را در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از کشت نشان می‌دهد.

سلول‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت از کشت سلولی، در مت‌های کامپوزیتی کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل در روش تک‌نازله (۹۷/۷۵ درصد) و دونازله (۹۹/۰۹ درصد) بوده که نسبت به پلیمر خالص کیتوزان (۷۶/۳۳ درصد) میزان بالاتر و معنی‌داری نشان داد. رشد سلول‌ها در ابتدا یک کاهش نسبی نشان داد که به با افزایش زمان کشت، پس از ۳ روز میزان تطابق‌پذیری سلولی بسیار افزایش یافته و میزان سمیت کاملاً کاهش پیدا نمود. حتی نکته جالب میزان زنده‌مانی سلولی بالاتری در الیاف هسته-پوسته-

نمودار بررسی سمیت سلولی کیتوزان و نانوالیاف روش تک و دونازله طی زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



شکل ۶- نمودارهای مقایسه‌ای آنالیز سمیت سلولی (MTT) شامل پلیمر خالص کیتوزان، نانوالیاف کیتوزان ۲٪/پلی‌وینیل‌الکل-روش تک‌نازله و نانوالیاف کیتوزان ۲٪/پلی‌وینیل‌الکل (پوسته) کیتوزان ۲٪ (هسته)-روش دونازله طی زمان‌های ۲۴-۴۸ و ۷۲ ساعت- روش تک‌نازله. حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر زمان سنجش شده می‌باشد.



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپی زنده‌مانی سلول‌های کشت‌داده شده بر پلیمر کیتوزان (تصویر چپ)، داربست‌های نانوالیاف کیتوزان ۲٪/پلی‌وینیل‌الکل در روش تک‌نازله (تصویر وسط) و دو نازله (تصویر راست) در طی زمان‌های ۲۴-۴۸ و ۷۲ ساعت

کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل انجام شد. شکل ۸ نمودار FT-IR نمونه‌های ذکر شده را نشان می‌دهد. آنالیز پراش اشعه ایکس با توجه به ذات مواد آماده‌شده (کریستال/ آمورف) انجام گردید. شکل ۹ الگوی XRD نمونه-های نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل در روش‌های تک‌نازله و

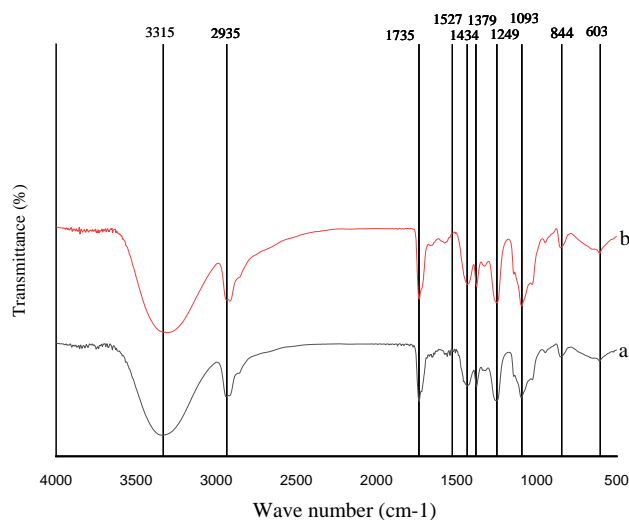
۴.۳. مشخصه‌نمایی طیف‌سنجی مادون قرمز

تبدیل فوریه و پراش اشعه ایکس

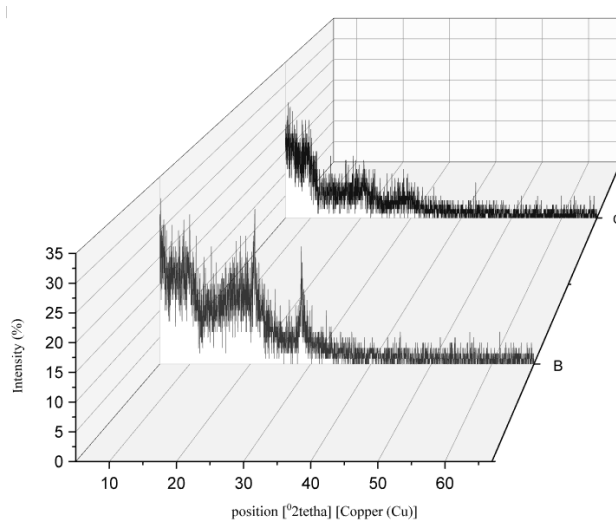
طیف‌سنجی FT-IR نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل در روش تک و دونازله با هدف بررسی گروه‌های عاملی پلیمرهای

درجه، در نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل الکل نشان از تعامل قوی بین دو پلیمر و از بین رفتن تبلور کیتوزان دارد.

دونازله را نشان می‌دهد. طیف پراش کیتوزان پیک‌های قوی را در $2\theta = 10-9$ و 20 نشان داد. پیک‌های کیتوزان در 10 و 20



شکل ۸- نمودار مقایسه‌ای آنالیز طیف‌سنجی مادون فوریه (FTIR) -a کیتوزان ۲٪/PVA: روش تک نازله. b- کیتوزان ۲٪/PVA: روش دو نازله.



شکل ۹- نمودارهای مقایسه‌ای آنالیز پراش اشعه‌ی ایکس (XRD): نانوالیاف کیتوزان ۲٪/پلی‌وینیل الکل B: روش تک نازله C- روش دو نازله

تشکیل نانوالیاف برخوردار است. برای تولید الیاف خالص پلیمر کیتوزان، می‌بایست از حلال‌های قوی‌تر غیرمعمول که غالباً نیز دارای سمیت هستند، استفاده نمود که مغایر با معیارهای محیط‌زیستی در زمینه‌های تحقیقاتی و صنعتی است. کیتوزان به‌دلیل ویژگی‌های جذابی چون عدم سمیت و زیست‌سازگاری، جاذب بودن و خواص آنتی‌باکتریال مورد توجه قرار گرفته است. طبیعت پلی‌کاتیونی آن می‌تواند منجر به اتصال به یون‌های

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

۱.۴. الکتروریسی کیتوزان/پلی‌وینیل الکل

الکتروریسی کیتوزان و دیگر پلیمرهای طبیعی فرآیندی پیچیده بوده که به‌دلیل رفتار خاص محلول این پلیمر، ویژگی‌های پلی‌کاتیونی، وزن مولکولی بالا و دامنه‌ی گسترده‌ی آن است. کیتوزان به‌دلیل طبیعت پلی‌کاتیونیک، از قابلیت کمتری برای

Homayoni *et al.*, 2009a; Ignatova *et al.*, 2009;)
 Homayoni *et al.*, 2014; Abdelgawad *et al.*, 2014; و همکاران
 (۲۰۰۹) گزارش نمودند با کاهش اسید به میزان ۷۰-۶۰ درصد،
 کیفیت نانوالیاف به حد بسیار ضعیف تنزل پیدا نمود. در واقع
 گروه‌های آمینی کیتوزان در محلول به صورت پروتونه درمی‌آیند
 که منجر به ایجاد یک محلول ویسکوز می‌شود که نیاز به ولتاژ
 بالاتری برای کشیدن جت دارد. جالب توجه است که در مطالعه
 Ohkawa و همکاران (۲۰۰۴)، از میان حلال‌های مختلف شامل
 اسیداستیک ۰/۲ مولار، اسیدفرمیک خالص، دی‌کلرومتان و
 مخلوط این حلال‌ها با حلال‌های ارگانیک فرار مانند متانول،
 اتانول، دی‌متیل‌فرمالدهید و دی‌اتیل‌سولفوگراید، تنها زمانی که
 حلال تری‌فلورواستیک‌اسید استفاده گردید، جت الکتروریسی
 تشکیل و الیاف‌های کیتوزان بر سطح جمع‌کننده مشاهده
 گردید. آنها همچنین در بیان نتایج خود به این موضوع اشاره
 داشتند که ریخت الیاف کیتوزان رسوب‌کرده روی جمع‌کننده
 به میزان غلظت تری‌فلورواستیک‌اسید بستگی دارد. از نظر آنان
 دو دلیل برای الکتروریسی موفق کیتوزان با استفاده از حلال
 تری‌فلورواستیک‌اسید وجود دارد، زیرا این حلال با گروه‌های
 آمینی کیتوزان تشکیل نمک داده که واکنش‌های متقابل سخت
 بین مولکول‌های کیتوزان را تخریب و آن‌ها را برای الکتروریسی
 آماده می‌نماید. دیگر اینکه فراریت تری‌فلورواستیک‌اسید برای
 جامدسازی سریع جت الکتروریسی شده محلول کیتوزان-تری-
 فلورواستیک‌اسید یک مزیت محسوب می‌گردد و این ویژگی
 امکان الکتروریسی درصد وزنی بالاتری از کیتوزان را فراهم می-
 نماید (Ohkawa *et al.*, 2006).

در بیان نتایج Abdelgawad و همکاران (۲۰۱۴) عنوان
 شد که نسبت بالایی از پلیمر همراه پلی‌وینیل‌الکل (بالاتر
 از ۷۰٪) در ترکیب با کیتوزان، برای تولید الیاف یک‌دست و بدون
 گره لازم است. افزایش میزان کیتوزان به میزان بیش از ۴۰ درصد
 مجموع، منجر به تولید گره در مت تولید شده گردید، که میزان
 این گره‌ها در نانوالیاف با نسبت پلیمری ۵۰/۵۰ قابل توجه بود.
 همچنین بیان گردید زمانی که میزان کیتوزان به بیش از
 ۵۰ درصد مجموع افزایش یافت، نانوالیاف به‌سختی تشکیل
 شدند. این نتایج نشان می‌دهد زمانی که غلظت کیتوزان (یک
 پلی‌کاتیون) در محلول افزایش می‌یابد، نیروهای دفع‌کننده بین

فلزی، رنگ‌ها و نیز پاتوژن‌ها گردد. وجود گروه‌های آمینی در
 این پلیمر، محققین را از کاربردهای چندگانه‌اش مطمئن نموده
 است (Habiba *et al.*, 2017). وجود گروه‌های آمینی زنجیره
 و طبیعت ذاتی پلیمر، ویسکوزیته بالا و نیروی دافعه بین‌پلی-
 کاتیون‌ها از جمله دلایلی است که مانع الکتروریسی پلیمرخالص
 می‌گردد. در غلظت‌های نامناسب پلیمر و حلال، تولید
 ساختارهای لیفی همراه با اجزای مهره‌ای و الیاف به شکل کوتاه
 و منقطع خواهد بود. بنابراین ایجاد ترکیب و نسبت درستی از
 اختلاط پلیمرها در غلظت مناسب، از مهمترین فاکتورهای یک
 الکتروریسی موفق است، که در مطالعه ما به آن دست‌یافته شد
 (Yang *et al.*, 2018). افزودن پلیمرهای همراه مانند پلی-
 وینیل‌پرولیدین^۱، پلی‌اتیلن‌اکساید^۲، پلی‌وینیل‌الکل^۳ و ... می‌تواند
 در تشکیل الیاف صاف بسیار مؤثر باشد (Duan *et al.*, 2004; Kriegel *et al.*, 2009; Homayoni *et al.*, 2009b; Shalumon *et al.*, 2010; Pakravan *et al.*, 2011; Gholipour-Kanani *et al.*, 2014; Abdelgawad *et al.*, 2015; Sarhan and Azzazy, 2014). از پلیمر پلی‌وینیل
 الکل برای تثبیت مولکول کیتوزان و کاهش تبلور کیتوزان
 می‌توان استفاده نمود (Habiba *et al.*, 2017).

با توجه به تصاویر گرفته شده از نانوالیاف مشخص است که
 غلظت محلول‌های پلیمری در این تیمارها دارای ویسکوزیته
 مناسب بوده که به درگیری و کنش مناسب زنجیرهای پلیمری
 اشاره دارد. به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های
 عملکردی کیتوزان با پلی‌وینیل‌الکل، نانوالیافی بدون نقص و
 خالی از گره تشکیل شد. آنچه مشخص است قابلیت تشکیل
 نانوالیاف در نمونه‌هایی که میزان بالاتری کیتوزان دارند بسیار
 کمتر بوده که به دلیل ویسکوزیته بالا، نوع و نسبت نامناسب
 حلال است. براساس یافته‌های مطالعات مختلف در غلظت پایین
 اسیداستیک (کمتر از ۵۰ درصد)، به دلیل کاهش ویسکوزیته و
 افزایش کشش سطحی کیفیت نانوالیاف تولید شده کاهش می-
 یابد (Geng *et al.*, 2005; Homayoni *et al.*, 2009a).
 براساس نتایج میکروسکوپی، زمانی که سهم نسبتی کیتوزان
 بسیار بیشتر از پلیمر همراه باشد، الکتروریسی و تولید الیاف
 سالم امکان‌پذیر نیست. وجود ساختارهای گره‌ای، شبه‌الیافی
 همراه با قطرات محلول، به وضوح ساختارهای الیافی
 الکتروریسی شده را غیرقابل قبول ارزیابی می‌نماید

^۳Poly (Vinyl Alcohol) (PVA)^۱Poly (vinyl Pyrrolidone) (PVP)^۲Poly (Ethylene Oxide) (PEO)

گروه‌های کاتیونی مستقر در اسکلت ساختاری پلیمر افزایش و در نهایت از تشکیل الیاف ممتد در حین فرآیند الکتروروسی و تحت یک میدان مغناطیسی با ولتاژ بالا جلوگیری می‌کند. این نتایج با مطالعه حاضر به طور کلی دارای همخوانی است اگرچه در این مطالعه نسبت اختلاط کیتوزان با پلیمر همراه در نسبت ۵۰/۵۰ به ارتقاء کیفیت الکتروروسی و تثبیت فرآیند رسید. همچنین غلظت اسیداستیک در آب به شدت بر کشش سطحی محلول کیتوزان تأثیرگذار بوده که به طور قابل توجه بر الکتروروسی کیتوزان دارای اهمیت است. به طوری که در مطالعه Geng و همکاران (۲۰۰۵) افزایش غلظت اسیداستیک از ۱۰ درصد به ۹۰ درصد، باعث کاهش کشش سطحی از ۵۴/۶۰ به ۳۱/۵۰ dyn/cm شده که بدون ایجاد تغییر در میزان ویسکوزیته بوده است. در بین غلظت‌های مختلف اسیداستیک در مطالعات مختلف الکتروروسی، غلظت ۹۰ درصد به عنوان مناسب‌ترین غلظت برای تشکیل نانوالیاف یکسان گزارش شده است. اما در غلظت‌های ۳۰ درصد یا بیشتر، نانوالیاف نازک با قطر حدود ۴۰ نانومتر که همراه با گره‌های بزرگ هستند تشکیل می‌گردد. بنابراین، مشکل اصلی شناخته شده در الکتروروسی نانوالیاف کیتوزان، با انحلال آن در اسیداستیک به شدت قوی که منجر به کاهش کشش سطحی و افزایش تراکم بار محلول آبی کیتوزان می‌گردد، قابل حل خواهد بود. ازین رو می‌بایست رفتار مناسب الکتروروسی محلول کیتوزان از طریق پیدانمودن غلظت مناسب پلیمر در اسیداستیک شناخته شود. کاهش کشش سطحی و افزایش تراکم جت در یک زمان منجر به آن می‌شود که میدان الکتریکی ضعیف‌تری برای تشکیل جت مورد نیاز باشد (Geng et al., 2005). همچنین دلیلی که برای کاهش ویسکوزیته محلول پلیمری وجود دارد می‌تواند در رابطه با دخالت و نقش مشارکتی پلیمر پلی‌وینیل‌الکل بر ویسکوزیته محلول کیتوزان باشد که در ارتباط با واکنش‌هایی است که بین زنجیره‌های کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل رخ داده است. همچنین زنجیره‌های پلیمر کیتوزان ممکن است درگیر واکنش‌های ثانویه‌ای شوند که بین زنجیره‌های پلی‌وینیل‌الکل اتفاق افتاده است که منجر به کاهش ویسکوزیته محلول الکتروروسی گردیده است (Gutha et al., 2017).

گروه‌های کاتیونی مستقر در اسکلت ساختاری پلیمر افزایش و در نهایت از تشکیل الیاف ممتد در حین فرآیند الکتروروسی و تحت یک میدان مغناطیسی با ولتاژ بالا جلوگیری می‌کند. این نتایج با مطالعه حاضر به طور کلی دارای همخوانی است اگرچه در این مطالعه نسبت اختلاط کیتوزان با پلیمر همراه در نسبت ۵۰/۵۰ به ارتقاء کیفیت الکتروروسی و تثبیت فرآیند رسید. همچنین غلظت اسیداستیک در آب به شدت بر کشش سطحی محلول کیتوزان تأثیرگذار بوده که به طور قابل توجه بر الکتروروسی کیتوزان دارای اهمیت است. به طوری که در مطالعه Geng و همکاران (۲۰۰۵) افزایش غلظت اسیداستیک از ۱۰ درصد به ۹۰ درصد، باعث کاهش کشش سطحی از ۵۴/۶۰ به ۳۱/۵۰ dyn/cm شده که بدون ایجاد تغییر در میزان ویسکوزیته بوده است. در بین غلظت‌های مختلف اسیداستیک در مطالعات مختلف الکتروروسی، غلظت ۹۰ درصد به عنوان مناسب‌ترین غلظت برای تشکیل نانوالیاف یکسان گزارش شده است. اما در غلظت‌های ۳۰ درصد یا بیشتر، نانوالیاف نازک با قطر حدود ۴۰ نانومتر که همراه با گره‌های بزرگ هستند تشکیل می‌گردد. بنابراین، مشکل اصلی شناخته شده در الکتروروسی نانوالیاف کیتوزان، با انحلال آن در اسیداستیک به شدت قوی که منجر به کاهش کشش سطحی و افزایش تراکم بار محلول آبی کیتوزان می‌گردد، قابل حل خواهد بود. ازین رو می‌بایست رفتار مناسب الکتروروسی محلول کیتوزان از طریق پیدانمودن غلظت مناسب پلیمر در اسیداستیک شناخته شود. کاهش کشش سطحی و افزایش تراکم جت در یک زمان منجر به آن می‌شود که میدان الکتریکی ضعیف‌تری برای تشکیل جت مورد نیاز باشد (Geng et al., 2005). همچنین دلیلی که برای کاهش ویسکوزیته محلول پلیمری وجود دارد می‌تواند در رابطه با دخالت و نقش مشارکتی پلیمر پلی‌وینیل‌الکل بر ویسکوزیته محلول کیتوزان باشد که در ارتباط با واکنش‌هایی است که بین زنجیره‌های کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل رخ داده است. همچنین زنجیره‌های پلیمر کیتوزان ممکن است درگیر واکنش‌های ثانویه‌ای شوند که بین زنجیره‌های پلی‌وینیل‌الکل اتفاق افتاده است که منجر به کاهش ویسکوزیته محلول الکتروروسی گردیده است (Gutha et al., 2017).

۲.۴. طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و

پراش اشعه ایکس

گروه‌های عاملی مت‌های تهیه‌شده توسط آنالیز طیف‌سنجی فوریه مورد بررسی قرار گرفت. پیک‌های مربوط به هر پلیمر و تعامل آن‌ها به خوبی در شکل نشان داده شده است. طیف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل یک باند گسترده را در 3500 cm^{-1} - نشان داد که حاکی از کشش ارتعاشی OH- بوده که می‌تواند با باندهای NH- آمین و آمید همپوشانی داشته باشد. پیک‌ها در 1642 cm^{-1} و 1577 cm^{-1} می‌تواند به دلیل تعامل بین ارتعاش خمش OH- و NH- کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل باشد و پیک 1085 cm^{-1} می‌تواند در ارتباط با کشش ارتعاشی گروه C-O باشد. پیک در 1148 cm^{-1} نشان‌دهنده تشکیل حلقه

در نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل کاهش پیدا نمود (Habiba *et al.*, 2017). این نتایج با آنچه که از نتایج Habiba و همکاران (۲۰۱۷) به دست آمده است، تطابق داشته و دارای همخوانی است. در مطالعه آنان شدت و اوج پیک 1591 cm^{-1} در نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل کاهش پیدا نمود. از آنجا که پیوند هیدروژنی منجر به کاهش فرکانس کشش‌های ارتعاشی می‌گردد، نشان می‌دهد که پیوندهای هیدروژنی بین کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل از طریق گروه عاملی -NH_2 ایجاد گردیده است. باند گسترده در $3650\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ ارتعاشات گروه -OH نسبت داده می‌شود که نشان‌دهنده اوج با این شاخص برای هر دو پلیمر است. از آنجا که این اوج تیز نبود، گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت C_2 و C_6 کیتوزان، توسط پیوندهای هیدروژنی خارج و درون مولکولی متصل گردیده‌اند (Habiba *et al.*, 2017).

طیف پراش اشعه ایکس کیتوزان پیک‌های قوی را در $22\text{-}20$ و $9\text{-}10$ نشان داد. که اشاره به حضور هیدروکسیل و آمین دارد. وجود پیک‌ها در حدود 10 و 20 درجه، در نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل نیز نشان از تعامل قوی بین این دو پلیمر و از بین رفتن ضمنی تبلور کیتوزان دارد. نتایج پراش اشعه ایکس شواهدی برای نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه ارائه می‌دهد که برخی تعاملات بین کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل رخ داده است (Habiba *et al.*, 2017). همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند کیتوزان خالص دو پیک را در 20 و 10 نشان می‌دهد و کامپوزیت پلیمر کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل نیز پیک‌هایی را در $19/70$ و دیگری را با تراکم کمتری در $11/50$ نشان داد که این نتایج نشان از سازگاری خوب بین دو پلیمر داشته است. در پلی‌وینیل‌الکل، دو پیک در 16 و $22/50$ درجه مشاهده می‌شود که در کامپوزیت کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل به حالت گسترده درمی‌آید که کاهش بلورینگی اولیه پلی‌وینیل‌الکل را با افزودن کیتوزان نشان می‌دهد (Yang *et al.*, 2018). براساس گزارش Shalumon و همکاران (۲۰۱۱)، اگر دو پلیمر به خوبی مخلوط نشده باشند، همه پیک‌های مربوط به هر پلیمر می‌بایست به‌طور مجزا در طیف پراش مشاهده گردد. همچنین به دلیل وسعتی که در قله پراش نانوالیاف ترکیبی دیده می‌شد، این موضوع قابل تأیید است که فرآیند الکترورسی موجب کاهش کریستاله شدن مخلوط پلیمری و تشکیل نانوالیافی با میکروساختارهای غیر کریستاله گردیده است (Shalumon *et al.*, 2011).

استال از طریق اتصال عرضی است. پیک‌های بین $1750\text{-}1735 \text{ cm}^{-1}$ به دلیل کشیدگی C=O و C-O از گروه‌های استات پلی‌وینیل‌الکل و پیک 1148 cm^{-1} نشان‌دهنده تعامل اتفاق افتاده بین کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل است (Gutha *et al.*, 2019; Mei *et al.*, 2017). پودر پلی‌وینیل‌الکل باند نامتقارن کربوکسیلات خود را در حدود 1635 cm^{-1} نشان می‌دهد و باند هیدروکسیل که در حدود 3444 cm^{-1} و به صورت بسیار تیز است. باندهای مربوط به این پلیمر پس از ترکیب در مخلوط پلیمری می‌تواند به موج‌های بالاتر انتقال و با شدت متفاوت مشاهده گردد (Shalumon *et al.*, 2011).

طیف FT-IR این نانوالیاف‌ها مطابق با نتایج بیان شده توسط Homayoni و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل تنها به صورت فیزیکی اختلاط پیدا کرده و این اختلاط بر خواص شیمیایی کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل تأثیری نداشته است (Homayoni *et al.*, 2009b). بیشتر پیک‌های مشخصه‌ای کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل مشاهده گردید. گروه‌های عاملی کیتوزان خالص و پلی‌وینیل‌الکل در همان جایگاه باقی‌مانده که نشان‌دهنده تغییرات اندک باندهای ثانویه جدیدی است که در واکنش‌های متقابل بین پلی‌وینیل‌الکل-کیتوزان رخ می‌دهد (Homayoni *et al.*, 2009b). طیف FT-IR کیتوزان دارای باندهای لرزشی در 1154 cm^{-1} و 893 cm^{-1} که نشان‌دهنده گروه‌های پلی‌ساکاریدی آن است (Homayoni *et al.*, 2009a). براساس مطالعات علمی، دیگر باندها شامل 1600 cm^{-1} ، 1651 cm^{-1} و 3425 cm^{-1} است که به ترتیب مشخص‌کننده خمیدگی N-H گروه‌های آمینی اولیه، کشش کربونیل باندهای آمیدی و کشش N-H گروه‌های آمینی اولیه است. بیان شده است در طیف FT-IR پلی‌وینیل‌الکل، جذب در 1790 cm^{-1} ، 1730 cm^{-1} و 2946 cm^{-1} لرزش کششی گروه‌های C-OH ، C=O و C-H آلیفاتیک را به ترتیب نشان می‌دهد. پیک‌های جذب در 1256 cm^{-1} ، 1375 cm^{-1} و 1432 cm^{-1} متعلق به لرزش C-H ، O-H و ارتعاشات C-H است. در ساختار نانوالیاف، این پیک‌ها احتمالاً به دلیل پیوندهای هیدروژنی میان گروه‌های عملکردی کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل به سمت پایین منتقل شده‌اند. اما اوج تغییر در کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل در کیتوزانی با میزان درجه استیل‌زدایی بالاتر دیده می‌شود که به دلیل گروه‌های -NH_2 بیشتری است که برای ایجاد پیوند هیدروژنی با پلی‌وینیل‌الکل باز می‌باشد. پیک 660 cm^{-1} باند حساس به بلورینگی کیتوزان است. شدت این پیک

۳.۴. بررسی سمیت سلولی

از آنجا که رشد سلول‌های فیروبلاستی و مهار فعالیت‌های باکتریایی یکی از مراحل مهم و مؤثر در بهبود زخم‌هایی مانند سوختگی و جراحی است، می‌توان گفت این نانوالیاف کامپوزیتی پتانسیل استفاده برای تسریع درمان و جلوگیری از رشد باکتریایی را در محل زخم دارند. میزان زنده‌مانی سلولی در نمونه‌های داربست‌های الکتروسی شده میزان بالایی نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل خواص پلیمر طبیعی کیتوزان، ساختار نانوالیاف، ایجاد فضای هسته و همچنین میزان رهایش آهسته مواد هسته باشد. افزایش رشد سلولی که از نتایج آزمون سمیت قابل اقباس بود، می‌تواند سازگاری سلولی این داربست کامپوزیتی را برای کاربردهای درمان و پانسمان نشان دهد (Movahedi et al., 2020).

۵. نتیجه‌گیری نهایی

فرآیند الکتروسی ابتدا در روش تک‌نازله انجام گردید و تولید نانوالیاف در شرایط بهینه‌شده شامل غلظت اسیداستیک ۸۰ درصد و نسبت کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل ۵۰/۵۰ درصد با موفقیت انجام شد. ریخت‌شناختی تشکیل الیاف ممتد و بدون گره توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی تأیید گردید. در مرحله بعد الکتروسی نانوالیاف در حالت الکتروسی دونا زله با هدف امکان تولید الیاف هسته (کیتوزان)-پوسته (شامل غلظت بهینه-شده) انجام شد. جهت افزایش سهم کیتوزان، هسته از ماده کیتوزان و پوسته از نسبت بهینه‌شده روش تک‌نازله انتخاب گردید. ریخت و امکان شناسایی فازهای هسته و پوسته تا حد ممکن از تصاویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM اقباس گردید. نتایج آنالیزهای مختلف FT-IR، SEM و XRD تطابق‌پذیری خوبی بین کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل را نشان داد. بررسی میزان سمیت کیتوزان و نانوالیاف حاوی کیتوزان نشان داد این کامپوزیت‌ها هیچ گونه سمیت سلولی نشان نداشته و موجب حفظ و بقای سلولی در سه روز کشت سلولی گردیده‌اند. همچنین تبدیل کیتوزان به حالت نانوالیاف، میزان این سمیت را به حداقل ممکن رسانیده است. محیط استخراج میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر داربست‌های نانوالیافی در روش تک و دونا زله را بیش از درصد ۷۲ ساعت پس از کشت نشان داد. این نتایج بیانگر این حقیقت است که این ساختارهای نانو می‌تواند تطابق‌پذیری بسیار بالاتر و مورد اطمینانی را برای کاربردهای پزشکی و دارویی به همراه داشته باشد.

تست MTT برای ارزیابی زنده‌مانی سلولی لاین سلولی L929 بر نانوالیاف الکتروسی شده تک و دونا زله طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ انجام گردید. نتایج به‌خوبی تطابق‌پذیری زیستی بالای کیتوزان و داربست‌های نانوالیافی کیتوزان در هر دو روش تک و دو نازله را نشان داد. میزان تطابق‌پذیری زیستی کیتوزان و داربست‌های الکتروسی شده طی زمان افزایش پیدا نمود. مطالعات نشان داده که ترکیب پلیمر در ساختار نانوالیاف می‌تواند میزان زنده‌مانی سلولی را افزایش دهد (Kmour et al., 2017). در مطالعه Sarhan و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده گردید که غلظت نوری سلول‌های فیروبلاست پوست موش روی تمامی سابسترهای الکتروسی شده به تدریج افزایش پیدا نمود که نشان از فعالیت متابولیکی سلول‌های فیروبلاست موش بر داربست‌های کشت‌شده داشت (Sarhan and Azzazy, 2015). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که داربست‌های حاوی کیتوزان به همراه پلیمرهای همراه در هر دو روش هیچ گونه اثر سمیتی از خود نشان ندادند. همچنین مشارکت کیتوزان همراه با پلی‌وینیل‌الکل در مت‌های تولیدشده، می‌تواند منجر به افزایش فعالیت زیستی داربست گردد که در واقع در ارتباط با اثر کیتوزان در افزایش آبدوستی داربست‌ها و در نهایت کنش و واکنش‌های سلولی بهتر است. در مطالعه Sarhan و همکاران (۲۰۱۵)، رشد سلول‌ها در عصاره حاوی نانوالیاف کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل و عسل، ریخت مشابهی را با نمونه کنترل منفی نشان داد. سلول‌های فیروبلاستی پوست اولیه، به مدت ۳ روز کشت داده شدند و سمیت آن‌ها با استفاده از تست MTT ارزیابی گردید. این داربست‌ها حاوی ۵/۵ - ۱/۵ درصد کیتوزان، ۷ درصد پلی‌وینیل‌الکل و ۳۰ درصد عسل بودند. سلول‌های کشت‌داده‌شده با داربست‌های نانولیفی کیتوزان هیچ تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی سلولی با کنترل منفی (کشت‌داده شده بدون داربست‌های نانولیفی) نشان ندادند. همچنین به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی متفاوت و ارتقایافته‌ای نسبت به سلول‌های کشت‌داده شده با کنترل مثبت نشان داد. این نتایج زیست-تطابق‌پذیری داربست‌های کیتوزان/پلی‌وینیل‌الکل/عسل را نشان داد. بررسی رشد سلول‌های فیروبلاست موشی پس از کشت بر کیتوزان و نانوالیاف تولیدشده و همچنین میزان سمیت آن‌ها نشان داد که این داربست‌ها تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های کنترل منفی از لحاظ مرگ و میر سلولی و ریختی نداشته است.

تشکر و قدردانی

کارشناس آزمایشگاه بیومواد) و خانم مهندس جعفری (کارشناس آزمایشگاه نانومواد) پژوهشگاه مواد و انرژی کرج و همچنین آقای مهندس هدهدی که نقش بسیار مؤثری در پیشبرد این پژوهش داشتند ابراز داشته و صمیمانه قدردان زحمات ایشان هستند.

نویسندگان قدردانی خود را از آقای دکتر موسی پور (کارشناس آزمایشگاه فرآوری آبزیان)، آقای مهندس زمانی (کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی) دانشگاه گیلان و خانم مهندس زنوزی

References

۶. منابع

- Abdelgawad, A.M., Hudson, S. M., Rojas, O.J., 2014. "Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems". *Carbohydrate Polymers* 100(12), 166-178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.12.043
- Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Elsabee, M.Z., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99(5), 1359-1367. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.051
- Duan, B., Dong, C., Yuan, X., Yao, K., 2004. "Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide)". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15(6), 797-811. DOI: 10.1163/156856204774196171
- Furuike, T., Komoto, D., Hashimoto, H., Tamura, H., 2017. Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids. *International Journal of Biological Macromolecules* 104, 1620-1625. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.099
- Geng, X., Kwon, O.H., Jang, J., 2005. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution". *Biomaterials* 26(27), 5427-5432. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.066
- Gholipour-Kanani, A., Bahrami, S.H., Joghataie, M.T., Samadikuchaksaraei, A., Ahmadi-Taftie, H., Rabbani, S., Erfani, E., 2014. "Tissue engineered poly(caprolactone)-chitosan-poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for burn and cutting wound healing". *IET Nanobiotechnol* 8(2), 123-131. DOI: 10.1049/iet-nbt.2012.0050
- Gutha, Y., Pathak, J.L., Zhang, W., Zhang, Y., Jiao, X., 2017. Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly(vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO)". *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 234-241. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.020
- Habiba, U., Siddique, T. A., Talebian, S., Lee, J. J. L., Salleh, A., Ang, B. C., Afifi, A. M., 2011. "Effect of deacetylation on property of electrospun chitosan/PVA nanofibrous membrane and removal of methyl orange, Fe(III) and Cr(VI) ions". *Carbohydrate Polymers*, 177(Supplement C), 32-39. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.08.115
- Hadjianfar, M., Semnani, D., Varshosaz, J., 2019. An investigation on polycaprolactone /chitosan/Fe₃O₄ nanofibrous composite used for hyperthermia. *Polymers for Advanced Technologies* 30(11), 2729-2741. DOI: 10.1002/pat.4704
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., Jellouli, K., 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules* 65, 298-306. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045
- Hamdi, M., Hammami, A., Hajji, S., Jridi, M., Nasri, M., Nasri, R., 2017. "Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera". *International Journal of Biological Macromolecules* 101, 455-463. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.103
- Homayoni, H., Ravandi, S.A.H., Valizadeh, M., 2009a. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* 77(3), 656-661. DOI: 10.1002/app.30148
- Homayoni, H., Ravandi, S.A.H., Valizadeh, M., 2009b. Influence of the molecular weight of chitosan on the spinnability of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend nanofibers". *Journal of Applied Polymer Science* 113(4), 2507-2513. DOI: 10.1002/app.30148
- Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., Jing, X., 2014. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications". *Journal of Control Release* 185, 12-21. DOI: 10.1002/pi.2695

- Ignatova, M., Manolova, N., Markova, N., Rashkov, I., 2009. Electrospun Non-Woven Nanofibrous Hybrid Mats Based on Chitosan and PLA for Wound-Dressing Applications. *Macromolecular Bioscience* 9(1), 102-111. DOI: 10.1002/mabi.200800189
- Komur, B., 2017. Starch/PCL composite nanofibers by co-axial electrospinning technique for biomedical applications. *Biomedical Engineering Online* 16(1), 40. DOI: 10.1186/s12938-017-0334-y
- Kriegel, C., Kit, K.M., Mc Clements, D.J., Weiss, J., 2009. "Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer* 50(1), 189-200. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.09.041
- Mei, Y., Runjun, S., Yan, F., Honghong, W., Hao, D., Chengkun, L., 2019. Preparation, characterization and kinetics study of chitosan/PVA electrospun nanofiber membranes for the adsorption of dye from water. *Journal of Polymer Engineering* 39(5), 459-471. DOI: 10.1515/polyeng-2018-0275
- Movahedi, M., Asefnejad, A., Rafienia, M., Khorasani, M.T., 2020. Potential of novel electrospun core-shell structured polyurethane/starch (hyaluronic acid) nanofibers for skin tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules* 146, 627-637. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.233
- Nguyen, T.T.T., Chung, O.H., Park, J.S., 2011. "Coaxial electrospun poly (lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity". *Carbohydrate Polymers* 86(4), 1799-1806. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.014
- Pakravan, M., Heuzey, M. C., Ajji, A., 2011. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer* 52(21), 4813-4824. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.08.034
- Ohkawa, K., Minato, K., Kumagai, G., Hayashi, S., Yamamoto, H., 2006. Chitosan Nanofiber. *Biomacromolecules* 7, 3291-3294. DOI: 10.1021/bm0604395
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- Safari, P., Zakipour Rahimabadi, E., Vaezi, M. R., Behnamghader, A.A., 2021. Physico-chemical properties and characterization of chitosan extracted from *Penaeus monodon* wastes via two different conventional extraction method. *Journal of Fisheries* 74(2), 247-258. (In Persian) DOI: 10.22059/jfisheries.2021.318514.1230
- Sarhan, W.A., Azzazy, H.M., 2015. High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: biocompatibility and antibacterial effects". *Carbohydr Polym* 122, 135-143. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.12.051
- Shalumon, K.T., Anulekha, K.H., Girish, C.M., Prasanth, R., Nair, S.V., Jayakumar, R., 2010. "Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture". *Carbohydrate Polymers* 80(2), 413-419. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.039
- Tchemtchoua, V. T., Atanasova, G., Aqil, A., Filee, P., Garbacki, N., Vanhootehem, O., Colige, A., 2011. "Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules* 12(9), 3194-3204. DOI: 10.1021/bm200680q
- Teng, Y., Li, Y., Li, Y., Song, Q., 2020. Preparation of Fe₃O₄/PVP magnetic nanofibers via in situ method with electrospinning. In: (Eds.), *Proceeding of Journal of Physics: Conference Series*, 032087. DOI: 10.1088/1742-6596/1549/3/032087
- Venugopal, V., 2011. Marine polysaccharides: Food applications. CRC press, Taylor & Francis Group. LLC, Boca Raton, USA, 372 p.
- Wang, S. F., Shen, L., Zhang, W.D., Tong, Y.J., 2005. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules* 6(6), 3067-3072. DOI: 10.1021/bm050378v
- Yang, S., Lei, P., Shan, Y., Zhang, D., 2018. "Preparation and characterization of antibacterial electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide composite nanofibrous membrane". *Applied Surface Science*, 435, 832-840. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.11.191
- Zeng, J., Xu, X., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., Jing, X., 2003. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 92(3), 227-231. DOI: 10.1016/S0168-3659(03)00372-9