

Chitosan-Vanillin-Montmorillonite Composite Hydrogel: Preparation and Mechanical Properties

Hadis Eghbali*

Department of Chemical Engineering, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Postal Code 7718897111, Rafsanjan, Iran

Received: 27 December 2021, accepted: 17 April 2022

ABSTRACT

Keywords:

chitosan,
vanillin,
crosslinker,
montmorillonite,
hydrogel

Hypothesis: Chitosan is a biodegradable biopolymer used today as an effective and practical material in various industries. To produce chitosan hydrogels, different crosslinkers are utilized, most of which are toxic and, dangerous. Due to the many applications of chitosan in medicine, pharmaceuticals, tissue engineering and food industries, it is better to use safe and non-toxic crosslinkers to produce biopolymers and hydrogels. Vanillin is a natural and non-toxic aldehyde that can be used as a crosslinker to produce chitosan hydrogels. The cross-links that vanillin make with chitosan are, on the one hand, the Schiff base type bond, and on the other hand, the hydrogen bond, which makes the chitosan-vanillin (CV) hydrogel more mechanically weaker than other chitosan-dialdehyde hydrogels. Chitosan-vanillin hydrogels have been studied in micro- and nanoscale and biofilm shape. In this study, montmorillonite (MMT) fillers have been used to fabricate chitosan-vanillin-montmorillonite (CMV) macrohydrogels, and their effect on improving mechanical properties has been investigated.

Methods: In this study, chitosan hydrogels were fabricated with vanillin crosslinker and montmorillonite as fillers. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM) were performed to identify the bonds formed and to examine the morphology of the hydrogels, respectively. Then, the gel content, swelling, porosity, and mechanical properties of hydrogels were investigated.

Findings: The results showed that the presence of vanillin increased the porosity and caused regular porosity in the chitosan hydrogel. Chitosan and vanillin macrohydrogels have good mechanical properties with a porosity greater than 90%, gel content > 86%, swelling, and mechanical strength. The addition of filler to chitosan-vanillin hydrogels also reduces the porosity and swelling and increases the mechanical properties of this system

*E-mail: h.eghbali@vru.ac.ir

هیدروژل کامپوزیتی کیتوسان-وانیلین-مونت موریلونیت: تهیه و خواص مکانیکی

حدیث اقبالی*

رفسنجان، دانشگاه ولی عصر(عج)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی شیمی، کد پستی ۷۷۱۸۹۷۱۱

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۶، پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۸

دسترسی پذیر در نشانی: <http://jips.ippi.ac.ir>

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال سی و چهارم، شماره ۶

صفحه ۵۵۶-۵۴۷، ۱۴۰۰

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2022.3075.2123

چکیده

فرضیه: کیتوسان زیست پلیمری تجدیدپذیر است که امروزه به عنوان ماده ای مؤثر و پرکاربرد در صنایع مختلف به کار می رود. برای تولید هیدروژل های کیتوسان از عوامل اتصال عرضی مختلفی استفاده می شود که اغلب آن ها سمی و خطر آفرین هستند با توجه به کاربردهای فراوان کیتوسان در پزشکی، دارورسانی، مهندسی بافت و صنایع غذایی بهتر است که از عوامل اتصال عرضی ایمن و غیرسمی برای تولید زیست پلیمرها و هیدروژل های کیتوسانی استفاده شود. وانیلین، آلدهیدی طبیعی و غیرسمی است که می تواند به عنوان عامل اتصال عرضی برای تولید هیدروژل های کیتوسانی به کار گرفته شود. اتصال های عرضی که وانیلین با کیتوسان برقرار می کند، از یک طرف پیوند نوع باز شیف و از طرف دیگر پیوند هیدروژنی است که باعث می شود، هیدروژل کیتوسان-وانیلین (CV) نسبت به سایر هیدروژل های کیتوسان-دی آلدهیدها از نظر مکانیکی ضعیف تر باشد. در اغلب مطالعات، هیدروژل کیتوسان-وانیلین با مقیاس میکرو و نانو و نیز به شکل زیست لایه بررسی می شود. هدف در این مطالعه ساخت درشت هیدروژل های متخلخل CV و بررسی خواص مکانیکی آن ها است. همچنین، اثر استفاده از پرکننده های مونت موریلونیت (MMT) بر بهبود خواص مکانیکی درشت هیدروژل های کیتوسان-وانیلین-مونت موریلونیت (CMV) بررسی شد.

روش ها: هیدروژل های کیتوسان با عامل اتصال عرضی وانیلین و پرکننده های مونت موریلونیت ساخته شدند. طیف شناسی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) و میکروسکوپی الکترون پویشی (SEM) به ترتیب برای شناسایی پیوندهای تشکیل شده و بررسی شکل شناسی هیدروژل ها انجام شد. سپس، مقدار ژل شدن، جذب آب، تخلخل و خواص مکانیکی هیدروژل ها بررسی شد.

یافته ها: نتایج نشان داد، درشت هیدروژل های حاصل از کیتوسان و عامل اتصال عرضی وانیلین (CV, CMV) خواص مکانیکی مناسبی به لحاظ تخلخل (< ۹۰٪)، محتوای ژل (< ۸۶٪)، تورم و استحکام مکانیکی دارند. وجود وانیلین سبب افزایش تخلخل و ایجاد تخلخل های منظم در هیدروژل کیتوسان شد. همچنین، افزودن پرکننده به هیدروژل های کیتوسان-وانیلین مقدار تخلخل و تورم در مخلوط آب و اتانول (۹۶٪ اتانول) را کاهش و خواص مکانیکی و تورم در آب را افزایش داد.

واژه های کلیدی

کیتوسان،
وانیلین،
عامل اتصال عرضی،
مونت موریلونیت،
هیدروژل

* پیام نگار:

h.eghbali@vru.ac.ir

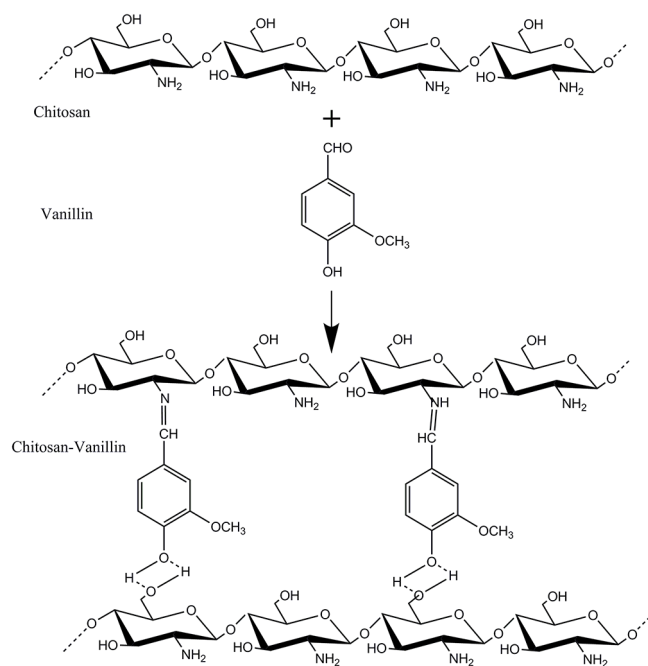
مقدمه

کیتوسان یکی از فراوان‌ترین زیست‌پلیمرهای طبیعی است که از استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید. در ساختار کیتوسان ($C_6H_{11}O_4N$) مقدار زیادی گروه‌های عاملی هیدروکسید و آمین وجود دارد و مشتقات ارزشمند بسیاری از کیتوسان تهیه می‌شود (شکل ۱). همچنین، کیتوسان خواص زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، ضد میکروبی و ضدسرطانی دارد که آن را گزینه بسیار مناسبی برای کاربرد در پزشکی، دارورسانی، تغذیه، مهندسی بافت، کشاورزی و تصفیه آب و فاضلاب کرده است. عامل محدودکننده اصلی کیتوسان، خواص مکانیکی و پایداری ضعیف آن است که به ایجاد اتصال عرضی یا ترکیب‌شدن با سایر مواد برای تقویت نیاز دارد [۱].

عوامل اتصال عرضی شیمیایی که برای کیتوسان به‌کار رفته‌اند، اغلب دی‌آلدهیدها هستند که از میان آن‌ها از گلو تارآلدهید بسیار استفاده شده است، دی‌آلدهیدها سمی هستند و می‌توانند روی ماهیت مواد اثر بگذارند [۲،۳]. در مطالعات اخیر، وانیلین به‌عنوان عامل اتصال عرضی امن پیشنهاد شده است، وانیلین (۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدهید) ماده مؤثر لوبیای وانیل و ترکیبی آروماتیک و زیست‌پایه است که به‌صورت سنتزی نیز تولید می‌شود (شکل ۱) [۴]. وانیلین عامل بو، عطر و طعم و خواص ضد اکسندگی و ضدباکتریایی وانیل است [۵،۶]. وانیلین یک گروه آلدهیدی دارد و اتصال‌های عرضی که با کیتوسان برقرار می‌کند، از یک سو پیوند نوع باز شیف (پیوند میان گروه آلدهید وانیلین و آمین کیتوسان) و از سوی دیگر پیوند هیدروژنی میان گروه‌های هیدروکسی کیتوسان و وانیلین است (شکل ۱) [۷]. این پیوند مانند پیوندهای کووالانسی قوی نیست و تابع pH محیط است و در محیط‌های اسیدی، ضعیف می‌شود [۸] به‌همین دلیل خواص مکانیکی پلیمر حاصل از کیتوسان و وانیلین نسبت به کیتوسان و سایر آلدهیدها ضعیف‌تر است و در مطالعات انجام‌شده اغلب از زیست‌پلیمر کیتوسان-وانیلین در مقیاس میکرو و نانو یا به‌شکل زیست‌لایه استفاده شده است [۹]. وانیلین افزون بر بهبود خاصیت مکانیکی کیتوسان، به‌دلیل خواص ضد اکسندگی، ضد میکروبی و ضدسرطانی که دارد، می‌تواند از این جنبه‌ها نیز موجب تقویت کیتوسان شود [۱۰]. یکی از راه‌های افزایش استحکام زیست‌پلیمرها افزودن نانوپرکننده‌ها از جمله نانولوله‌های کربن، گرافن، رس، بنتونیت و مونت موریلونیت (MMT) است [۱۱،۱۲].

مونت موریلونیت به گروهی از کانی‌های رسی متعلق است که در آب متورم می‌شود و ظرفیت تبادل کاتیون زیادی دارد. مونت موریلونیت با فرمول نظری $(OH)_4Si_8Al_4O_{20} \cdot nH_2O$ [۱۳] ساختاری چندلایه از سیلیسیم اکسید و آلومینیم دارد، بار منفی مونت موریلونیت به‌دلیل

تبادل هم‌شکل به‌وسیله کاتیون‌های درون‌لایه‌ای مانند سدیم (Na^+) و منیزیم (Mg^{2+}) جبران می‌شود. مونت موریلونیت از نظر زیست‌شناختی بی‌اثر است و می‌تواند سموم باکتری، الگوی غذایی و استروئیدی را جذب کند، برتری‌هایی مانند آب‌دوستی، داشتن ساختار لایه‌ای قابل ارتقا با چند موقعیت برهم‌کنش، ظرفیت تبادل یون و پایداری در محیط‌های اسیدی باعث شده است تا از مونت موریلونیت در مطالعات مختلف مانند دارورسانی، جذب فلزات سنگین، مهندسی بافت و به‌ویژه در چسب زخم استفاده شود [۱۶-۱۴]. مونت موریلونیت در فهرست مواد امن سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار دارد و خواص ضدباکتریایی دارد و خواص مکانیکی پلیمرها را افزایش می‌دهد [۱۹-۱۶]. همان‌طور که بیان شد، در مطالعات معدودی هیدروژل کیتوسان و وانیلین به‌شکل هیدروژل‌هایی در مقیاس درشت بررسی شده است. در مطالعه‌ای درشت هیدروژل کیتوسان-وانیلین با غلظت کیتوسان ۵٪ (w/v) و وانیلین بیش از ۲/۵٪ (w/v) به‌منظور کاربرد در چسب زخم تهیه شد، تمرکز مطالعه بر خواص خودترمیمی این هیدروژل بود، همچنین این هیدروژل‌ها خواص مکانیکی ضعیفی داشتند [۷]. این هیدروژل‌ها به‌دلیل غلظت زیاد کیتوسان و وانیلین و به‌تبع آن افزایش پیوندها به‌هم فشرده بودند. در مطالعه دیگری ترکیب کیتوسان ۴٪-وانیلین ۲٪ برای استفاده به‌عنوان داربست سلول‌های



شکل ۱- ساختار شیمیایی کیتوسان، وانیلین و هیدروژل وانیلین-کیتوسان (CV).

Fig. 1 Chemical structure of chitosan, vanillin and chitosan-vanillin (CV) hydrogel.

وانیلین در هیدروژل نهایی (۳٪ w/w باشد) و کاملاً هم‌زده شد تا محلول کیتوسان با رنگ سفید غبار آلود به رنگ زرد متمایل شود که نشان‌دهنده ایجاد ژل است. نمونه‌ها در ظرف (پلیت کشت یاخته) ریخته شد و به مدت ۲۴ h در فریزر با دمای 20°C - و سپس به مدت ۴۸ h در دمای 50°C - و فشار ۰ bar درون خشک‌کن انجمادی قرار داده شدند. تهیه هیدروژل کامپوزیتی کیتوسان (CMV): ۵ g مونت موریلونیت در ۵۰ mL آب ریخته شد و به مدت ۲۴ h برای انحلال کامل در دمای محیط روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس، ۶ mL از این محلول به ۶۰ mL محلول کیتوسان اضافه و به مدت ۲۴ h هم‌زده شد [۲۰، ۲۱، ۳]. ۶ mL محلول وانیلین در استون به مخلوط کیتوسان و مونت موریلونیت اضافه شد، به طوری که نسبت وزنی کیتوسان به وانیل و مونت موریلونیت به ترتیب ۳:۱:۱ در هیدروژل نهایی بود. بقیه مراحل مانند تهیه هیدروژل کیتوسان-وانیلین انجام شد.

طیف‌شناسی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR)

برای تهیه طیف‌های FTIR، نمونه‌های خشک‌شده آسیاب شدند و طبق استاندارد ASTM E1252 با استفاده از طیف‌نورسنج زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) بررسی شدند. پودر حاصل از آسیاب داربست‌ها با پودر KBr خشک‌شده درون گرم‌خانه خلأ مخلوط و جذب در محدوده طیف $4000-500\text{ cm}^{-1}$ ثبت شد.

میکروسکوپی الکترونی پوششی گسیل میدانی (FE-SEM)

خواص شکل‌شناسی هیدروژل‌ها با میکروسکوپی الکترونی پوششی گسیل میدانی (FE-SEM) بررسی شد.

آزمون محتوای ژل و مقدار شبکه‌ای شدن

به‌منظور انجام آزمون محتوای ژل ابتدا نمونه‌های هیدروژل به مدت ۴۸ h درون گرم‌خانه با دمای 50°C قرار داده شدند و وزن خشک (W_d) آن‌ها به دست آمد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۷۲ h در آب مقطر غوطه‌ور شده و هر ۲۴ h یک‌بار آب آن عوض شد. دوباره نمونه‌ها درون گرم‌خانه در دمای 50°C به مدت ۴۸ h قرار داده شده و سپس وزن (W_g) شدند [۲۲، ۲۳]:

$$\% \text{ Gel content} = \frac{W_g}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

اندازه‌گیری تورم

مقدار تورم نمونه‌ها یک‌بار در آب و بار دیگر در محلول آب-اتانول (۹۶٪) بررسی شد. بدین منظور، مقداری از هر نمونه جدا و

استخوانی ساخته شد. در این مطالعه برای افزایش خواص مکانیکی هیدروژل، از میکروذرات شیشه زیست‌فعال استفاده شد این ذرات توانستند به‌عنوان کمک‌کننده در برقراری اتصال‌های عرضی عمل کنند و خواص مکانیکی ترکیب را بهبود بخشند [۲]. در این مطالعه هیدروژل کیتوسان-وانیلین به‌همراه پرکننده مونت موریلونیت به شکل درشت‌هیدروژل و اثر آن بر بهبود خواص مکانیکی مطالعه شد. هدف از انجام مطالعه حاضر ساخت درشت‌هیدروژل‌های کیتوسان-وانیلین (CV) و کیتوسان-مونت موریلونیت-وانیلین (CMV) کامپوزیتی و بررسی خواص مکانیکی این هیدروژل‌هاست. در این پژوهش، از کیتوسان شبکه‌ای‌نشده (C) به‌عنوان شاهد استفاده شد.

تجربی

مواد

کیتوسان (C) با درجه استیل‌زدایی ۷۵٪ و وزن مولکولی زیاد و نانورس مونت موریلونیت از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند. سایر مواد مورد نیاز شامل، وانیلین (V)، استیک اسید، پتاسیم برمید، استون و اتانول از شرکت Merck خریداری شدند. از آب یون‌زدایی‌شده برای تهیه همه محلول‌های آبی استفاده شد.

دستگاه‌ها

طیف‌نورسنج زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) Thermo Fisher مدل Nicolet IS10، ساخت آمریکا، میکروسکوپی الکترونی پوششی گسیل میدانی (FE-SEM) ساخت شرکت TESCAN جمهوری چک، گرم‌خانه Wiseven مدل Wov-30 ساخت کره و دستگاه اندازه‌گیری خواص مکانیکی Universal ساخت شرکت Hounsfield انگلستان برای بررسی نمونه‌ها به کار گرفته شدند.

روش‌ها

ساخت هیدروژل‌ها

تهیه محلول کیتوسان: ۶ g کیتوسان در ۲۰۰ mL محلول آبی استیک اسید ۱٪ (v/v) ریخته شده و به مدت ۴ h در دمای محیط با همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا محلولی یکنواخت حاصل شود.

تهیه محلول وانیلین: ۵ g وانیلین در ۵۰ mL استون ریخته و خوب مخلوط شد تا کاملاً حل شده و شفاف و بی‌رنگ شود.

تهیه هیدروژل کیتوسان-وانیلین (CV): ۶ mL از محلول وانیلین به ۶۰ mL محلول کیتوسان اضافه (به طوری که نسبت وزنی کیتوسان به

ثبت شد (شکل ۲). در طیف کیتوسان پیک جذبی در 3424 cm^{-1} به گروه‌های N-H و O-H و در 2920 cm^{-1} به گروه C-H مربوط است از سایر پیک‌های جذبی می‌توان به ارتعاش کششی گروه‌های C=O در 1655 cm^{-1} ، ارتعاش خمشی پیوندهای N-H در 1597 cm^{-1} و ارتعاش کششی پیوندهای C-N (پیوند آمید III) در 1320 cm^{-1} اشاره کرد افزون بر این‌ها، جذب در 1381 cm^{-1} به گروه‌های استامید (حاکي از استیل‌زدایی‌نشده کامل کیتوسان است) و ارتعاش کششی پیوندهای C-O در ناحیه 1073 و 1157 cm^{-1} به پیکره پلی‌ساکاریدها مربوط است که وجود زیست‌پلیمر کیتوسان را نشان می‌دهد [۲۵]. در طیف FTIR وانیلین پیک‌های جذبی گروه آلدهید (C=O) در 1666 cm^{-1} و گروه هیدروکسیل فنولی در 3423 cm^{-1} ظاهر شدند [۷]. برای هیدروژل‌های CV و CMV یک پیک جدید در 1640 cm^{-1} ظاهر شد که با ارتعاش کششی C=N مطابقت دارد [۷، ۱۳]. نتایج طیف FTIR تشکیل باز شیف بین کیتوسان و وانیلین را که نتیجه پیوند گروه آلدهید وانیلین و آمین کیتوسان است، در داربست‌های CV و CMV تأیید می‌کند. پیوند هیدروژنی جدید میان کیتوسان، وانیلین و MMT باعث جابه‌جایی پیک جذبی 3424 cm^{-1}

به مدت ۲۴ h درون گرم‌خانه در دمای 37°C قرار داده شده و سپس وزن شد (W_s). در مرحله بعد، نمونه‌های خشک به‌طور جداگانه در آب و اتانول ۹۶٪ به مدت ۲ h در دمای محیط (25°C) غوطه‌ور شدند و سپس از محلول‌ها خارج و وزن شدند (W_d). مراحل برای هر نوع هیدروژل حداقل سه مرتبه تکرار شد و مقدار تورم از معادله (۲) محاسبه شد [۲۴]:

$$\% \text{Swelling} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

اندازه‌گیری مقدار تخلخل

مقدار تخلخل داربست‌های شبکه‌ای شده با روش جابه‌جایی مایع و با استفاده از اتانول اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۲۴ h درون گرم‌خانه در دمای 50°C قرار داده شده و سپس وزن شدند (W_d). نمونه‌ها به مدت ۳۰ min درون اتانول قرار داده شده و دوباره نمونه‌های دارای اتانول وزن شدند (W_l). سپس، اتانول باقی‌مانده در ظرف وزن شد (W_w). مقدار تخلخل از معادله (۳) تعیین و نتایج به‌صورت میانگین و به‌همراه خطای استاندارد گزارش شد [۲۲]:

$$\% \text{Porosity} = \frac{W_w - W_d}{W_w - W_l} \times 100 \quad (3)$$

اندازه‌گیری خواص مکانیکی و استحکام فشاری هیدروژل‌ها

از دستگاه اندازه‌گیری خواص مکانیکی Universal برای بررسی استحکام فشاری نمونه‌ها با نیروی فشاری ۲۵ kN و سرعت ۵ mm/min استفاده شد [۱۹]. نمونه‌ها استوانه‌ای‌شکل با قطر ۱۲ mm و ارتفاع ۱۴ mm در دو حالت خشک و تر بررسی شدند. برای هر نمونه حداقل سه مرتبه تکرار در نظر گرفته شد.

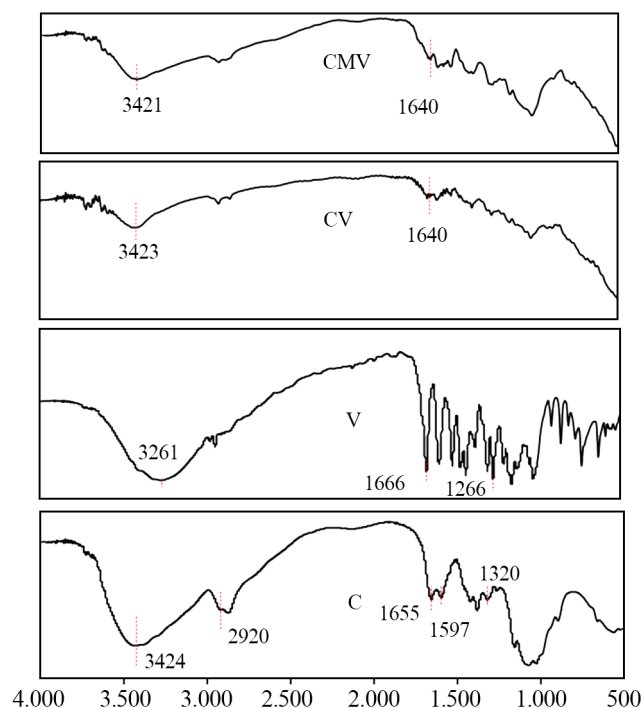
تحلیل آماری

به‌منظور ارزیابی آماری داده‌ها، نمونه‌ها با حداقل سه تکرار بررسی شده و نتایج با میانگین $\pm$ پراکندگی در سطح معنی‌داری $\alpha < 0.05$ گزارش شدند. برای بررسی داده‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفی (one-way ANOVA) به‌منظور مقایسه سطح معنی‌داری بین گروه‌ها استفاده شد.

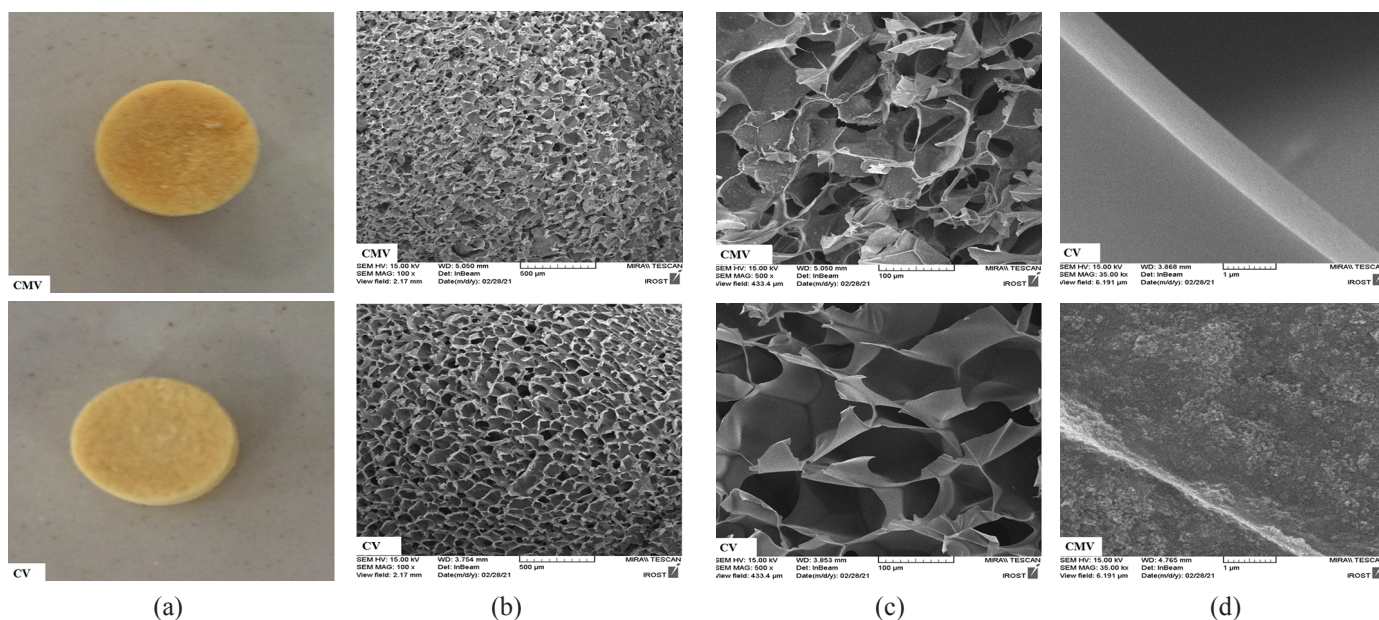
نتایج و بحث

طیف‌شناسی زیرقرمز تبدیل فوری (FTIR)

طیف FTIR نمونه‌های C، V، CV و CMV در محدوده $4000-500 \text{ cm}^{-1}$



شکل ۲- طیف‌های FTIR کیتوسان (C)، وانیلین (V)، هیدروژل کیتوسان-وانیلین (CV) و هیدروژل کیتوسان-وانیلین-MMT (CMV).
Fig. 2. FTIR spectra of chitosan (C), vanillin (V), chitosan-vanillin (CV) hydrogel and chitosan-vanillin-MMT (CMV) hydrogel.



شکل ۳- (a) عکس‌های هیدروژل‌های CV و CMV نمونه‌های هیدروژل با قطر ۱۲ mm و عکس‌های FE-SEM هیدروژل‌ها با بزرگ‌نمایی‌های مختلف (b) ۵۰۰ μm (۱۰۰ برابر)، (c) ۱۰۰ μm (۵۰۰ برابر)، و (d) ۱ μm (۵۰۰۰ برابر).

Fig. 3. (a) Images of CV and CMV hydrogels 12 mm diameter hydrogel specimens, FE-SEM images of hydrogels with different magnification (b) 500 μm (100x), (c) 100 μm (500x), and (d) 1 μm (5000x).

ذرات دیده می‌شود، زیرا اتصال عرضی کیتوسان با وانیلین به افزایش گرانشی محلول و نیز کاهش گروه‌های آمینی آب‌دوست موجود در کیتوسان منجر می‌شود. افزون بر این، تشکیل اتصال‌های عرضی کووالانسی باعث تحرک کمتر زنجیر کیتوسان می‌شود و پراکندگی یکنواخت پرکننده MMT را در شبکه کیتوسان دشوار می‌کند [۱۳] که در شکل ۳ (d)، بزرگ‌نمایی از قسمتی نشان داده شده است که ذرات تجمع کرده‌اند.

بررسی مقدار تورم

درجه تورم ویژگی شایان توجه هیدروژل‌هاست و به قابلیت جذب مایعات در هیدروژل اشاره دارد. درصد تورم هیدروژل‌ها تحت تأثیر ترکیب شیمیایی، قدرت یونی، چگالی اتصال عرضی، مقدار تخلخل، دما و pH آن‌ها قرار دارد. اتصال عرضی موجب افزایش تورم می‌شود، اما هر گونه افزایش در چگالی اتصال عرضی احتمال نفوذ مایعات به شبکه هیدروژل را کاهش می‌دهد [۳، ۱۱]. رفتار تورم داربست‌های C، CV، CMV با غوطه‌وری این مواد به مدت ۲ h درون دو حلال (محلول اتانول-آب و آب) در دمای محیط بررسی شد. در محلول اتانول زنجیرهای کیتوسان متورم نمی‌شوند و مقادیر اندازه‌گیری شده نشان‌دهنده مایع جذب‌شده به وسیله شبکه تخلخل نمونه‌هاست. نمونه‌های C کمترین مقدار تورم را در الکل نسبت به CV و CMV

کیتوسان به 3421 cm^{-1} در نمونه‌های CMV شده است.

بررسی شکل‌شناسی هیدروژل‌ها با FE-SEM

شکل‌شناسی هیدروژل‌ها با میکروسکوپی الکترونی پوششی گسیل میدانی (FE-SEM) بررسی شد. با توجه به عکس‌ها مشخص شد، هیدروژل‌های CV و CMV ساختاری متخلخل دارند و تخلخل‌های آن‌ها منظم و به هم پیوسته است. بر اساس شکل ۳، در نمونه CV تخلخل‌ها نسبت به نمونه CMV بزرگ‌تر هستند، زیرا در نمونه CMV به دلیل وجود ذرات MMT، برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی که در نتیجه جذب بین بار منفی لایه بیرونی ذرات MMT و بار مثبت کیتوسان است، افزایش یافته و ساختار متراکم‌تر شده است. این کاهش اندازه تخلخل‌ها همان‌طور که نتایج آزمون مکانیکی فشاری نشان داده است، موجب افزایش خواص مکانیکی CMV شده است. در نمونه CV تخلخل‌ها به شکل پنج‌ضلعی هستند و ساختاری یکنواخت دارند که این ویژگی‌ها همراه با پیوستگی بین تخلخل‌ها، آن‌ها را گزینه مناسبی برای استفاده در مهندسی زیست‌پزشکی و بافت می‌کند، زیرا شکل‌شناسی چنین تخلخل‌هایی باعث رشد یکنواخت سلول‌ها در داربست به دلیل توزیع یکنواخت تخلخل‌ها، اندازه مناسب و کاهش تنش‌های برشی ناشی از عبور سیال و افزایش انتقال اکسیژن و مواد غذایی به سلول‌ها، می‌شود [۲۶، ۲۷]. در نمونه‌های CMV تجمع

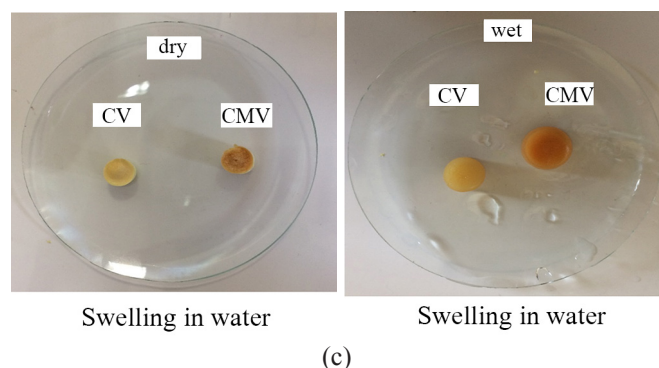
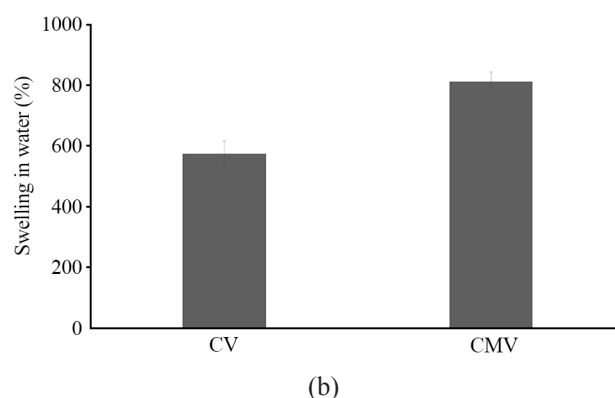
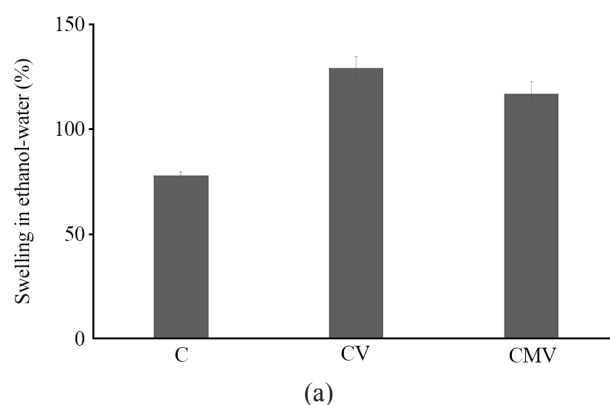
در نتیجه تخلخل کمتر هیدروژل‌های CMV باشد که در عکس‌های SEM شکل‌های ۳ و ۵ نیز نشان داده شده است. همچنین، رفتار تورم نمونه‌های C، CV، CMV در آب بررسی شد. نمونه‌های کیتوسان بدون اتصال عرضی (شبکه‌ای نشده) در آب حل شدند. نمونه‌های CV و CVM تورم شایان توجهی در آب داشتند که دلیل آن وجود پیوندهای عرضی در این هیدروژل‌ها و وجود گروه‌های آب‌دوست در کیتوسان و وانیلین است. وجود اتصال عرضی اثر زیادی بر مقدار تورم دارد و با افزایش مایعات جذب‌شده، تحرک درشت‌مولکول‌های کیتوسانی افزایش می‌یابد و کیتوسان می‌تواند آب بیشتری را جذب کند [۳]. همچنین، نمونه CMV نسبت به نمونه CV در آب تورم بیشتری نشان داد ($\alpha < 0.05$) که با توجه به گزارش‌های مربوط به هیدروژل کیتوسان-مونت موریلونیت این موضوع می‌تواند به دلیل آب‌دوستی ذرات MMT باشد [۱۹، ۱۶].

بررسی مقدار تخلخل

از عوامل مهم در اندازه تخلخل‌ها و پیوستگی آن‌ها، اثر عامل اتصال عرضی و نسبت این ماده به مونومر و نیز وجود برهم‌کنش‌های الکترولیتی میان مواد تشکیل‌دهنده هیدروژل است [۲۴]. مقدار تخلخل‌ها از روش جابه‌جایی مایع (اتانول) و با استفاده از معادله (۳) برای نمونه‌های C، CV، CMV محاسبه شد. تخلخل داربست‌ها طبق روش بیان‌شده اندازه‌گیری و نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است. افزودن وانیلین به کیتوسان باعث افزایش معنادار تخلخل شده است که با نتایج سایر گزارش‌ها در این زمینه هم‌خوانی دارد [۲۴، ۲۵]. مقدار تخلخل نمونه C نسبت به دو نمونه دیگر کمتر به دست آمد که با توجه به نتایج آزمون تورم با محلول اتانول که در شکل ۴ (b) دیده می‌شود، می‌تواند به دلیل نبود پیوستگی تخلخل‌ها در این نمونه باشد. بیشترین تخلخل به نمونه‌های CV و سپس CMV مربوط است. هر دو نمونه تخلخل بیش از ۹۰٪ دارند، مقدار تخلخل کمتر برای نمونه‌های CMV نسبت به CV می‌تواند به دلیل برهم‌کنش‌های بیشتر میان ذرات MMT با مولکول‌های کیتوسان باشد که در عکس‌های SEM نیز این تخلخل کمتر، قابل مشاهده است.

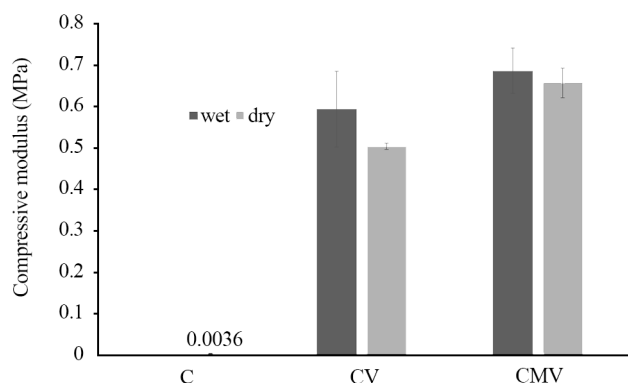
بررسی محتوای ژل و چگالی اتصال‌های عرضی

مقدار ژل‌شدگی مقیاسی از مقدار اتصال‌های عرضی ایجادشده در شبکه هیدروژل است. فرایند شبکه‌ای شدن به‌منظور بهبود خواص مکانیکی هیدروژل‌ها انجام می‌شود [۲۳، ۲۷]. در این پژوهش، نمونه‌های C، CV، CMV به مدت ۷۲ h در آب یون‌زدایی‌شده غوطه‌ور شدند و هر ۲۴ h آب عوض شد تا قسمت‌هایی از هیدروژل



شکل ۴- تغییرات درصد تورم هیدروژل‌ها در (a) محلول الکل-آب و (b) آب و (c) تصویر نمونه‌های CV و CMV در حالت خشک و تر.
Fig. 4. Variation of swelling percentage of hydrogels in (a) ethanol-water mixture and (b) water, and (c) photos of CV and CMV samples in wet and dry conditions.

داشتند و اختلاف بین همه نمونه‌ها به شدت معنادار بود ($\alpha < 0.05$) (شکل ۴). دلیل این موضوع تخلخل کمتر این نمونه‌هاست که در شکل ۵ نیز دیده می‌شود. تورم نمونه‌های CMV در اتانول کمتر از CV است که دلیل آن می‌تواند اثرهای متقابل جذبی بین بار منفی MMT و بار مثبت کیتوسان و افزایش چگالی اتصال عرضی بین آن‌ها [۱۶] و

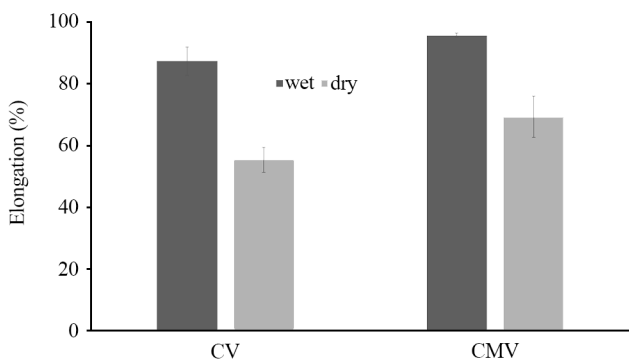


شکل ۷- نتایج مدول فشاری در شرایط خشک و تر برای نمونه‌های C، CV و CMV.

Fig. 7. Results of compressive modulus in dry and wet conditions for C, CV and CMV samples.

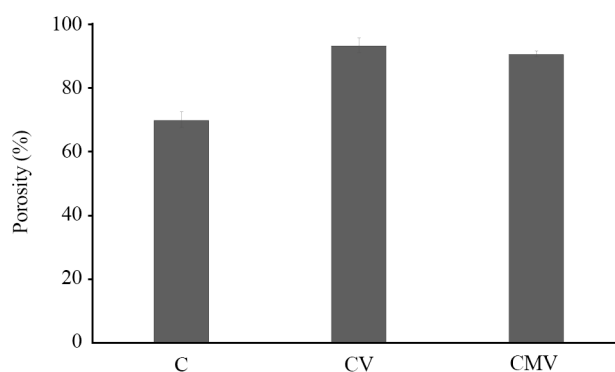
در فواصل خالی میان صفحه‌های مونت‌موریلونیت نفوذ کرده و با آن‌ها پیوند برقرار کنند. به نظر می‌رسد، افزایش مقدار ازدیاد طول تا پارگی، نسبت به هیدروژل‌های CV وجود چنین صفحه‌هایی است که به زنجیرهای پلیمری متصل به آن‌ها اجازه می‌دهد تا در اثر تنش‌های خارجی به مدت بیشتری مقاومت کنند. همچنین بار منفی صفحه‌های خارجی مونت‌موریلونیت به وسیله بار مثبت گروه‌های عاملی پیوندخورده کیتوسان مانند آمین و هیدروکسید می‌تواند جذب شود تا MMT اثر کمکی در پیوندهای عرضی هیدروژل داشته باشد [۲، ۱۳، ۱۹].

ساختار نمونه C در حالت تر پیش از انجام آزمون مکانیکی تغییر کرد و در حالت خشک نیروی بسیار کمی را نسبت به نمونه‌های



شکل ۸- افزایش طول در شرایط خشک و تر برای نمونه‌های CV و CMV.

Fig. 8. Elongation in dry and wet conditions for CV and CMV samples.



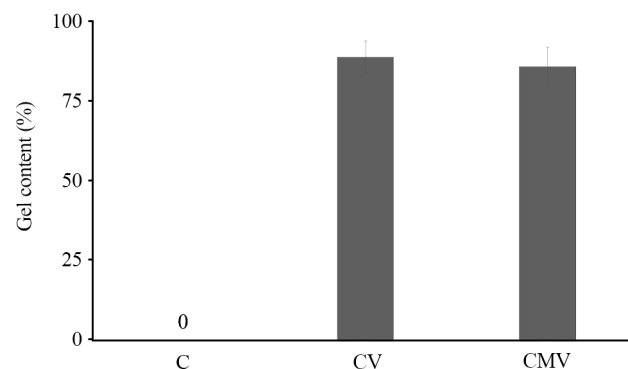
شکل ۵- تغییرات درصد تخلخل هیدروژل‌ها.

Fig. 5. Variation of porosity percentage of hydrogels.

شبکه‌ای نشده در آب حل شده و از هیدروژل‌ها جدا شود. نمونه C پس از مدت زمان اندکی کاملاً در آب حل شد و ساختار آن از دست رفت. اما، نمونه‌های CMV ۸۶٪ و نمونه‌های CV تقریباً ۹۰٪ محتوای ژل داشتند (شکل ۶). مقدار کمتر محتوای ژل ($\alpha < 0.05$) در CMV نسبت به CV شاید به دلیل باز شدن بخشی از پیوندهای یونی میان MMT و مولکول‌های کیتوسان باشد که در آب حل شده‌اند.

اندازه‌گیری خواص مکانیکی و استحکام فشاری هیدروژل‌ها

آزمون فشاری برای هیدروژل‌ها در دو حالت خشک و تر انجام شد. همان‌طور که در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است، نمونه‌های CMV نسبت به CV فشار بیشتری را تا نقطه شکست در هر دو حالت خشک و تر تحمل کرده‌اند (شکل ۷). همچنین مقدار تغییر طول بیشتری را تحت فشار داشته‌اند (شکل ۸) که نشان‌دهنده اثر پرکننده‌های MMT بر افزایش خواص مکانیکی است، زیرا عامل تقویت‌کننده مونت‌موریلونیت موجب می‌شود تا زنجیرهای پلیمری



شکل ۶- تغییرات محتوای ژل هیدروژل‌ها.

Fig. 6. Variation of gel content of hydrogels.

وانیلین شامل CV و CMV تهیه و بررسی شدند. اثر هم‌افزایی وانیلین و مونت‌موریلونیت بر خواص فیزیکی و شیمیایی زیست‌پلیمر کیتوسان از جمله مقدار تورم، تخلخل، محتوای ژل، شکل‌شناسی و خواص مکانیکی بررسی شد. برای شناسایی پیوندهای تشکیل‌شده در هیدروژل‌ها و بررسی شکل‌شناسی سطح آن‌ها از طیف‌شناسی زیرقرمز و میکروسکوپی الکترونی پویشی استفاده شد که نتایج بیانگر وجود اتصال عرضی میان وانیلین و کیتوسان و برهم‌کنش بین MMT و زیست‌پلیمر و ایجاد تخلخل‌هایی منظم بود. مقدار تورم و تخلخل در هیدروژل‌های CV از هیدروژل‌های CMV بیشتر بود که دلیل آن برهم‌کنش‌های بیشتر در نمونه‌های CMV به دلیل وجود پرکننده‌های MMT است. نمونه‌ها دارای تخلخل بیش از ۹۰٪ بودند که با توجه به خواص مکانیکی به‌دست‌آمده، برای استفاده در فرایندهای زیستی به‌ویژه به‌عنوان داربست در مهندسی بافت گزینه مناسبی هستند. محتوای ژل در هر دو نمونه CV و CMV شایان توجه و بیش از ۸۵٪ بود. وجود پرکننده‌های MMT در هیدروژل کیتوسان-وانیلین مانند کمک‌کننده در برقراری اتصال‌های عرضی میان پلیمر عمل می‌کند و باعث افزایش استحکام مکانیکی هیدروژل نسبت به نمونه بدون پرکننده می‌شود.

CV و CMV تحمل کرد که نشان‌دهنده اثر شایان توجه وجود اتصال عرضی و ساختار شبکه‌ای بر استحکام مکانیکی هیدروژل‌هاست [۲]. برای این مطالعه، آزمون چند مرتبه روی نمونه تر و خشک انجام شد و در همه نمونه‌ها خواص مکانیکی در حالت تر نسبت به حالت خشک بیشتر بوده است، این ویژگی در مطالعه Hu و همکاران [۲] نیز دیده شده است. دلیل استحکام بیشتر نمونه‌ها در حالت تر نسبت به حالت خشک می‌تواند وجود مقادیری از وانیلین واکنش‌نداده در ترکیب باشد که در حالت خشک ساختاری بلوری دارد و باعث ناهمگنی هیدروژل و ایجاد تمرکز تنش در آن نقاط می‌شود. در حالی که در حالت تر وانیلین اضافی در آب حل شده و نیز پیوند هیدروژنی میان وانیلین و کیتوسان با جذب آب باعث حرکت مولکول‌های کیتوسان، انعطاف‌پذیری بیشتر هیدروژل و مقاومت در برابر تنش می‌شود [۲،۴]. شایان ذکر است، بررسی و تحلیل‌های دقیق‌تر نیازمند انجام آزمون‌های بیشتر است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، هیدروژل‌های کیتوسان با عامل اتصال عرضی

مراجع

1. Hamed H., Moradi S., Hudson S.M., and Tonelli A.E., Chitosan Based Hydrogels and Their Applications for Drug Delivery in Wound Dressings: A Review, *Carbohydr. Polym.*, **199**, 445-460, 2018.
2. Hu J., Wang Z., Miszuk J.M., Zhu M., Lansakara T.I., Tivanski A.V., Banas J.A., and Sun H., Vanillin-Bioglass Cross-Linked 3D Porous Chitosan Scaffolds with Strong Osteopromotive and Antibacterial Abilities for Bone Tissue Engineering, *Carbohydr. Polym.*, **271**, 118440, 2021.
3. Zou Q., Li J., and Li Y., Preparation and Characterization of Vanillin-Crosslinked Chitosan Therapeutic Bioactive Microcarriers, *Int. J. Biolog. Macromol.*, **79**, 736-747, 2015.
4. Fache M., Boutevin B., and Caillol S., Vanillin, a Key-Intermediate of Biobased Polymers, *Eur. Polym.*, **68**, 488-502, 2015.
5. Hernández-Fernández M.Á., García-Pinilla S., Ocampo-Salinas O.I., Gutiérrez-López G.F., Hernández-Sánchez H., Cornejo-Mazón M., Perea-Flores M.D.J., and Dávila-Ortiz G., Microencapsulation of Vanilla Oleoresin (V. Planifolia Andrews) by Complex Coacervation and Spray Drying: Physicochemical and Microstructural Characterization, *Foods*, **10**, 1375, 2020.
6. Li P.W., Wang G., Yang Z.M., Duan W., Peng Z., Kong L.X., and Wang Q.H., Development of Drug-Loaded Chitosan-Vanillin Nanoparticles and Its Cytotoxicity Against HT-29 Cells, *Drug Deliv.*, **23**, 30-35, 2016.
7. Xu C., Zhan W., Tang X., Mo F., Fu L., and Lin B., Self-Healing Chitosan/Vanillin Hydrogels Based on Schiff-Base Bond/Hydrogen Bond Hybrid Linkages, *Polym. Test.*, **66**, 155-163, 2018.
8. Ghorpade V.S., Preparation of Hydrogels Based on Natural Polymers via Chemical Reaction and Cross-Linking, *Hydrogels Based on Natural Polymers*, Elsevier, 91-118, 2020.
9. Sadeghi M. and Eghbali H., Investigation of Properties and Applications of Chitosan-Vanillin Hydrogels: A Review, *Iran. Chem. Eng. J.*, 2021. DOI: 10.22034/ijche.2021.280638.1101
10. Kenawy E., Abdel-Hay F., Eldin M.M., Tamer T.M., and Abo-

- Elghit E.M., Novel Aminated Chitosan-Aromatic Aldehydes Schiff Bases: Synthesis, Characterization and Bio-evaluation, *Int. J. Adv. Res.*, **3**, 563-572, 2015.
11. Pooresmaeil M. and Namazi H., Application of Polysaccharide-Based Hydrogels for Water Treatments, *Hydrogels Based on Natural Polymers*, 411-455, 2020.
12. Firouzabadi V.J. and Kokabi M., Triple Stimuli Responsive Poly(vinyl alcohol)Chitosan/Nanoclay/Nanosilver Nanocomposit Ehydrogel, *Iran J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **39**, 3-14, 2019.
13. Gierszewska M., Jakubowska E., and Olewnik-Kruszkowska E., Effect of Chemical Crosslinking on Properties of Chitosan-Montmorillonite Composites, *Polym. Test.*, **77**, 105872, 2019.
14. Gupta S.S. and Bhattacharyya K.G., Adsorption of Heavy Metals on Kaolinite and Montmorillonite: A Review, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 6698-723, 2012.
15. Ambrogi V., Pietrella D., Nocchetti M., Casagrande S., Moretti V., De Marco S., and Ricci M., Montmorillonite-Chitosan-Chlorhexidine Composite Films with Antibiofilm Activity and Improved Cytotoxicity for Wound Dressing, *J. Colloid Interface Sci.*, **491**, 265-272, 2017.
16. Mousa M., Evans N.D., Oreffo R.O., and Dawson J.I., Clay Nanoparticles for Regenerative Medicine and Biomaterial Design: A Review of Clay Bioactivity, *Biomaterials*, **159**, 204-214, 2018.
17. Gulzar A., Gai S., Yang P., Li C., Ansari M.B., and Lin J., Stimuli Responsive Drug Delivery Application of Polymer and Silica in Biomedicine, *J. Mater. Chem. B*, **44**, 8599-8622, 2015.
18. Youssef K., de Oliveira A.G., Tischer C.A., Hussain I., and Roberto S.R., Synergistic Effect of a Novel Chitosan/Silica Nanocomposites-Based Formulation Against Gray Mold of Table Grapes and Its Possible Mode of Action, *Int. J. Biolog. Macromol.*, **141**, 247-258, 2019.
19. Olad A., Hagh H.B.K., Mirmohseni A., and Azhar F.F., Graphene Oxide and Montmorillonite Enriched Natural Polymeric Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Ceramic. Int.*, **12**, 15609-15619, 2019.
20. Sowjanya J.A., Singh J., Mohita T., Sarvanan S., Moorthi A., Srinivasan N., and Selvamurugan N., Biocomposite Scaffolds Containing Chitosan/Alginate/Nano-silica for Bone Tissue Engineering, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **109**, 294-300, 2013.
21. Wang S.F., Shen L., Tong Y.J., Chen L., Phang I.Y., Lim P.Q., and Liu T.X., Biopolymer Chitosan/Montmorillonite Nanocomposites: Preparation and Characterization, *Polym. Degrad. Stab.*, **90**, 123-131, 2005.
22. Shamekhi M.A., Mirzadeh H., Mahdavi H., Rabiee A., Mohebbi-Kalhari D., and Eslaminejad M.B., Graphene Oxide Containing Chitosan Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering, *Int. J. Biolog. Macromol.*, **127**, 396-405, 2019.
23. Ammar N.E.B., Barbouche M., and Hamzaoui A.H., Historical View of Hydrogel Characterization, *Hydrogels Based on Natural Polymers*, Elsevier, Chapt. 15, 459-479, 2020.
24. Stroescu M., Stoica-Guzun A., Isopencu G., Jinga S.I., Parvulescu O., Dobre T., and Vasilescu M., Chitosan-Vanillin Composites with Antimicrobial Properties, *Food Hydrocoll.*, **48**, 62-71, 2015.
25. Kabiri K., Mirzadeh H., Zohuriaan-Mehr M.J. and Daliri M., Chitosan-Modified Nanoclay-Poly(AMPS) Nanocomposite Hydrogels with Improved Gel Strength, *Polym. Int.*, **11**, 1252-1259, 2009.
26. Prochor P. and Gryko A., Numerical Analysis of the Influence of Porosity and Pore Geometry on Functionality of Scaffolds Designated for Orthopedic Regenerative Medicine, *Materials*, **14**, 109, 2021.
27. Shamekhi M.A., Rabiee A., Mirzadeh H., Mahdavi H., Mohebbi-Kalhari D., and Eslaminejad M.B., Fabrication and Characterization of Hydrothermal Cross-Linked Chitosan Porous Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering Applications, *Mater. Sci. Eng. C*, **80**, 532-542, 2017.