Arak Medical University Journal (AMUJ)
2011; 14(56): 20-26

Original Article

Evaluation of the efficiency of bacterial cellulose synthesized by acetobacter xylinum in absorption and release of tetracycline hydrochloride

Poormohammadi Mojaveri A[1*], Sattari M[2], Jafari Azar Z[3], Ghaffari AR[3], Ariapanah P[4]

1- Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran
2- Faculty of Bacteriology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Department of Pharmaceutics, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran
4-Department of Microbiology, Research and Science Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 16 Mar 2010, Accepted: 14 Apr 2010

Abstract

***Background*:** Bacterial cellulose synthesized by acetobacter xylinum is a harmless microbial product with unique characteristics as an ideal dress that many studies have been done on. The aim of this study was to consider the capability of this product in absorption and release of tetracycline hydrochloride. Indication of this capability can pave the way for supplying a new dressing containing antibiotic from bacterial cellulose.

Materials and Methods: In this experimental study, cellulose sheet was initially impregnated on aqueous solution of tetracycline hydrochloride. Then the release process was considered in diluted water and normal saline. Ultra violet spectrophotometry method was applied to the detection of the antibiotic during absorption and release processes.

***Results*:** The results of data analysis demonstrated that bacterial cellulose has a great potential in absorption of tetracycline hydrochloride and can release it in a wet environment.

Conclusion: Considering the advantages of bacterial cellulose over traditional dressings, the results of this study can provide the ground for further research on supplying an ideal dressing containing antibiotic from this microbial product.

Keywords: Absorption, Acetobacter Xylinum, Bacterial Cellulose, Release, Tetracycline Hydrochloride

*Corresponding author:
Address: Tarbiat Modares University, Ale-Ahmad Highway, Tehran, Iran:
Email: sattarym@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 14، شماره 3 (شماره پیاپی 56)، مرداد و شهریور 1390، 26-20

توانایی سلولز باکتریایی حاصل از استو باکتر گزیلینوم در جذب و رهایش تتراسایکلین هیدروکلراید

آدنیس پورمحمدی مجاوری[1*]، مرتضی ستاری[2]، زهرا جعفری آذر[3]، علیرضا غفاری[3]، پدرام آریا پناه[4]

1- دکتری داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد، تهران، ایران

2- دانشیار،گروه باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- استادیار،گروه فارماسوتیکس، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد، تهران، ایران

4- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت 88/12/25، تاریخ پذیرش 89/1/25

چکیده

زمینه و هدف: سلولز میکروبی تولید شده از باکتری استوباکتر گزیلینوم یک محصول بی ضرر باکتریایی بوده که ویژگی های منحصر به فردی به عنوان یک پانسمان ایده آل داشته و لذا تحقیقات زیادی بر روی آن صورت پذیرفته است. هدف از این تحقیق بررسی توانایی این فرآورده زیستی در جذب و رهایش تتراسایکلین هیدروکلراید می باشد. اثبات این توانایی زمینه را جهت تولید یک پانسمان حاوی آنتی بیوتیک از سلولز باکتریایی میسر می سازد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا قطعات سلولز به منظور جذب تتراسایکلین هیدروکلراید در محلول مائی آن غوطه ور شده و سپس فرآیند رهایش در دو محیط آب مقطر و نرمال سالین مورد بررسی قرار گرفت. جهت ردیابی این آنتی بیوتیک در طول فرآیندهای جذب و رهایش، از روش اسپکتروفتومتری ماوراء بنفش استفاده شد.

یافته ها: پس از بررسی داده ها مشخص گردیدکه سلولز باکتریایی دارای توانایی بالایی در جذب تتراسایکلین هیدروکلراید بوده و می تواند آنرا در محیط مرطوب رها سازد.

نتیجه گیری: با توجه به برتری های سلولز باکتریایی نسبت به پانسمان های سنتی، نتایج این بررسی زمینه تحقیقات بیشتر جهت تولید یک پانسمان ایده آل حاوی آنتی بیوتیک از این فرآورده میکروبی را میسر می سازد.

واژگان کلیدی: جذب، استوباکترگزیلینوم، سلولز میکروبی، تتراسایکلین هیدروکلراید، رهایش

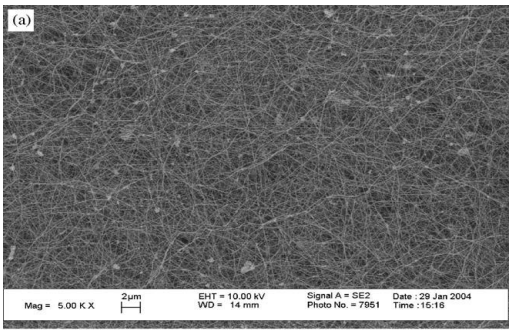
***نویسنده مسئول:** تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس تهران، گروه باکتری شناسی پزشکی

Email: sattarym@gmail.com

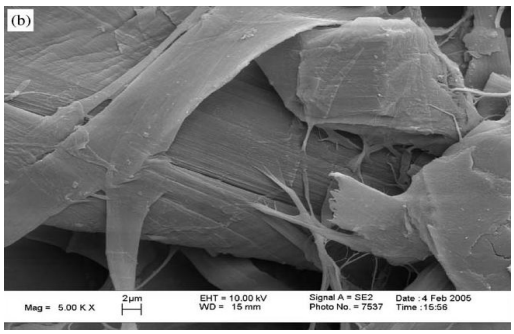
مقدمه

پانسمان زخم به منظور تسریع التیام و جلوگیری از عفونی شدن آن انجام می شود. پانسمان های مرسوم اکثراً پنبه ای(فرم اکسید شده سلولز گیاهی) و دارای نقاط ضعفی می باشند که از آن جمله می توان به خشک کردن زخم، چسبیدن به آن و نیز ایجاد حساسیت در برخی افراد اشاره کرد. این موارد باعث افزایش زمان ترمیم زخم، تعویض دردناک پانسمان و بسیاری از مشکلات دیگر برای بیمار خواهند شد. به همین دلیل سالهاست که محققین در صدد تولید پانسمانی با ویژگی های متمایز از انواع سنتی می باشند. این تحقیقات با کشف سلولز باکتریایی، که دارای بسیاری از ویژگی های یک پانسمان ایده آل می باشد، به نتایج خوبی دست یافت. سلولزباکتریایی پلی ساکاریدی میکربی است که از نظر شیمیایی با سلولز گیاهی مشابهت دارد(1-2). سلولز باکتریایی توسط باکتری های جنس استوباکتر به عنوان یک بیوفیلم ساخته می شود. در این جنس،گونه گزیلینوم بیشترین میزان سلولز را تولید می کند. در طول بیوسنتز سلولز، این باکتری ترکیبات مختلف محیط شرام - هسترین(Schramm-Hestrin) را مورد مصرف قرار داده و زنجیره های خطی بتا-1و4 گلوکان (β-1,4 Glucan) را تولید می کند. این زنجیره ها توسط منافذی از سطح سلول به خارج ترشح و با اتصال به یکدیگر نهایتا یک نوار شل و ژلاتینه با ماهیت سه بعدی را تشکیل داده که شامل نانوفیبریل های سلولزی فوق نازک (3-8 نانومتر) و بسیار شفاف (60-80%) با مقاومت مکانیکی بالا می باشند(3-4). ساختار ظریف و منظم موجود در بافت سلولز باکتریایی را عامل برتری های آن نسبت به پانسمان های سنتی می دانندکه شامل ویژگی های منحصر به فرد دیگری نیز می باشد که شامل ظرفیت بالای نگهداری آب و مبادله بخار آب با محیط، وجود منافذ در حد نانومتر که اجازه ورود به مولکول ها را می دهد، انعطاف پذیری بسیار بالا و سازگاری با سیستم ایمنی بدن می باشد(5).

به واسطه خصوصیات فوق، تحقیقات وسیعی بر روی سلولز باکتریایی به عنوان پانسمانی جایگزین صورت گرفته است(1). مقایسه بافت میکروسکوپی این نوع سلولز با سلولز گیاهی توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ وجود منافذ ریز نانومتری را درآن تایید می کند(شکل1)(5). در دهه های اخیر انواعی از پلیمرهای میکروبی و غیر میکروبی در تولید فرآورده های مختلف پزشکی کاربرد زیادی یافته اند. آلژینات، پلی ساکاریدی آنیونیک در جلبک های قهوه ای بوده که به عنوان یک ماتریکس جهت جذب و رهایش عوامل بیولوژیک در سطوح مخاطی، تحقیقاتی بر روی آن انجام شده است(6). از چیتوزان نیزکه حاصل داستیله شدن کیتین موجود در سخت پوستان می باشد پانسمان های حاوی آنتی بیوتیک جهت درمان سوختگی تولید شده است(7). بسیاری از زخم ها نظیر زخم های سوختگی نیازمند پانسمان های طولانی مدت حاوی پماد می باشند. پانسمان های پنبه ای به دلیل عدم توانایی در حفظ آب، بعد از مدت زمان کوتاهی آب درون پماد و زخم را جذب کرده و باعث کاهش رطوبت موضع می گردند.که همین مسئله جذب دارو را کاهش



شکل 1. الف: نمایی از سلولز باکتریایی(5000×)



ب: نمایی از سلولز گیاهی(5000×)

داده و نیز باعث چسبیدن پانسمان به زخم خواهد شد. بنابراین چنین پانسمانی باید هر روز تعویض گردد(8). این در حالی است که سلولز باکتریایی با حفظ رطوبت درون خود نه تنها تعویض پانسمان را تسهیل کرده بلکه اثر مفیدی بر روی تکثیر سلولی خواهد گذاشت(5, 9). از دیگر کاربردهای زیستی این فرآورده باکتریال می توان به تهیه سیستم های بازدارنده خونریزی(3)، تهیه رگ های مصنوعی (10) و همچنین کاربرد به عنوان داربست در مهندسی بافت(11) اشاره کرد. در یک مطالعه، سلولز باکتریایی را درون محلول آبی نیترات نقره شناور ساخته و مشاهده کردند که نانو ذرات نقره به واسطه پیوند هیدروکسیل سلولز با کاتیون های نقره به سطح منافذ سلولز متصل شدند و همچنین دیسک های تهیه شده از این سلولز پس از قرارگیری بر روی محیط کشت استافیلوکوکوس ارئوس و اشریشیا کولی هاله عدم رشد ایجاد کردندکه این تحقیق توانایی سلولز در جذب و رها سازی کاتیون های نقره را مورد تایید قرار داد(12). تمامی نتایج بدست آمده در کنار ویژگی های منحصر به فرد سلولز باکتریایی آینده روشنی رابرای تولید فرآورده های بیولوژیک ارزان قیمت با کاربردهای متنوع پیش بینی می کنند. (13). هدف این مطالعه بررسی توان سلولز باکتریایی در جذب و رها سازی یک آنتی بوتیک نظیر تتراسایکلین هیدروکلراید می باشد. در صورت تایید این فرضیه، توانایی غشاء سلولزی در جذب و رهایش مولکول های درشت نیز اثبات خواهد شد که می تواند گامی موثر در تحقیقات بر روی تولید انواع پانسمان های حاوی دارو (آنتی بوتیک ها، ترمیم کننده ها، مسکن ها وغیره) باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه یک مطالعه تجربی می باشد که مراحل انجام آن به شرح زیر بوده است:

آماده سازی ورقه های سلولز: ورقه های سلولز از کشت 7 روزه استوباکتر گزیلینوم در محیط شرام - هسترین جدا شده و به مدت 3 ساعت در سدیم دو دسیل سولفات 5% و پس از آن 1 ساعت در هیدروکسید سدیم 8% در حال جوش به جهت رنگ بری و تیمار قرار گرفتند. سپس 24 ساعت به منظور خروج باقیمانده مواد احتمالی درون آب مقطر قرار داده شده و نهایتا در دمای اتاق خشک شدند(4). پس از مرحله تیمار، رنگ ورقه های سلولز از قهوه ای به شیری تبدیل شد و طی مرحله خشک شدن درصد بسیار زیادی (حدود 95%) آب از دست داده که باعث شد ضخامت آنها از 5 به 0/3 میلی متر کاهش یابد. شکل 2 به روشنی تفاوت ظاهری سلولز پیش و پس از تیمار را نشان می دهد.

ردیابی تتراسایکلین هیدروکلراید: تترا سایکلین هیدروکلراید یک داروی محلول در آب بوده و برای ردیابی آن روش اسپکتروفوتومتری ماوراء بنفش برگزیده شد. از میان انواع روش های موجود برای ردیابی این آنتی بیوتیک روش جذب در طول موج ماوراء بنفش به واسطه سهولت آن انتخاب شد و برای این منظور از دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش مرئی مدل شیمادزو استفاده شد. ردیابی این دارو طی رهایش از سلولز، در دو حلال آب مقطر و نرمال سالین انجام گرفت. تهیه نمودار استاندارد تتراسایکلین هیدروکلراید در محیط آب مقطر و نرمال سالین: ابتدا ماکزیمم طول موج جذب برای تتراسایکلین هیدروکلراید تعیین شد و سپس سه سری سریال رقت از تتراسایکلین هیدروکلراید (ساخت NINGXIA QIYUAN PHARMACETICAL CO., LTD) شامل رقت های 2/5، 5، 10، 15، 20، 25 و 30 میکروگرم در هر میلی لیتر آب مقطر و نرمال سالین تهیه و جذب آنها در ماکزیمم طول موج جذب تعیین شده و برای هر یک از حلال ها مشخص گردید. پس از محاسبه میانگین جذب در هر سری و بدست آوردن فاکتورهای انحراف معیار و ضریب رگرسیون، دو معادله خط استاندارد برای تتراسایکلین هیدروکلراید در آب مقطر و نرمال سالین بدست آمد. توسط این معادلات غلظت نامعلوم تتراسایکلین هیدروکلراید (X) درون آب مقطر و یا نرمال سالین بر اساس مقدار جذب خوانده شده (Y) در ماکزیمم طول موج جذب مربوط به هر

یک از حلال ها تعیین شد.

بارگیری تتراسایکلین هیدروکلراید بر ورقه های سلولز: از یک قطعه خشک شده از سلولز (شکل 2-ب) چندین قطعه به اندازه 2×1 سانتی متر بریده و این قطعات درون محلول های مائی تتراسایکلین هیدروکلراید با رقت های 5 و 10% به مدت 24 ساعت قرار گرفتند و سپس از محلول خارج و در دمای اتاق خشک شدند.

بررسی روند رهایش: اگر یک غشای تراوا ترکیبی را جذب کرده باشد و سپس درون حلال ماده جذب شده قرار گیرد، بر حسب نوع پیوند بین غشاء و ماده جذب شده، درصدی از آن ماده آزاد خواهد شد. در این مطالعه از قطعه های 2×1 سانتی متر سلولز که قبلا در محلول 10% تتراسایکلین هیدروکلراید قرار داشته اند جهت رهایش در آب مقطر و نرمال سالین استفاده شد. از آنجایی که آب مقطر حلال خوبی برای تتراسایکلین هیدروکلراید می باشد جهت بررسی روند رهایش انتخاب شد، نرمال سالین نیز به واسطه نزدیکی به شرایط فیزیولوژیک بدن به عنوان محیط حلالیت دوم به کار گرفته شد.

رهایش 8 ساعته: درون پنج عدد بشر حاوی 5 میلی لیترآب مقطر پنج قطعه سلولز را به همراه تعدادی گلوله شیشه ای انداخته، سپس در شرایط دمایی کنترل شده (25 درجه سانتیگراد) بشرها را بر روی شیکر با سرعت ثابت قرار داده و هر یک ساعت 1 میلی لیتر از محیط حلالیت را برداشته و 1 میلی لیتر آب مقطر به محیط افزوده شد، این روند به مدت 8 ساعت ادامه یافت. مشابه این روش برای نرمال سالین در پنج عدد بشر مجزا نیز صورت گرفت نهایتا جذب نمونه های بدست آمده از رهایش درون آب مقطر در طول موج 275/8 نانومتر و برای نرمال سالین در طول موج 278/4 نانومتر تعیین و میانگین جذب در هر ساعت برای پنج سری مشخص شد. با استفاده از نمودارهای استاندارد مربوط به هر محیط غلظت ظاهری داروی آزاد شده در هر زمان تعیین و طبق فرمول $Ct_n = C_{on} + V/V_0 \times \Sigma(Ct_{n-1})$ غلظت حقیقی نمونه ها تعیین گردید ($\mathbf{Ct_n}$: غلظت حقیقی در نمونه n، $\mathbf{C_{on}}$: غلظت ظاهری در هر زمان، $\mathbf{V}$: حجم نمونه برداشته شد ، $\mathbf{V_0}$: حجم محیط و $\mathbf{C_{tn-1}}$: مجموع غلظت های واقعی پیش از نمونه n). پس از بدست آوردن غلظت حقیقی تتراسایکلین هیدروکلراید رها شده در هر ساعت (درون آب مقطر یا نرمال سالین) وزن آنتی بیوتیک رهایش یافته از واحد سطح سلولز به صورت میکروگرم محاسبه شد.(غلظت تتراسایکلین × حجم محیط = مقدار تتراسایکلین). 3 قطعه (2×1 سانتی متر) سلولز بدون دارو نیز به عنوان شاهد جهت بررسی تاثیر احتمالی ترکیبات باقیمانده موجود در بافت سلولز در بشرهای جداگانه ای حاوی 5 میلی لیترآب مقطر و نرمال سالین در شرایطی نظیر آنچه گفته شد قرار داده شدند و مشابه نمونه های حاوی آنتی بیوتیک از آنها نمونه برداری صورت گرفت. محلول های بدست آمده نیز تعیین جذب شدند.

تعیین مقدار: جهت تعیین دقیق میزان آنتی بیوتیک جذب شده در قطعات سلولز، پنج قطعه سلولز (2×1 سانتی متر) حاوی تتراسایکلین هیدروکلراید 10% به همراه گلوله های شیشه ای و 50 میلی لیتر آب مقطر را درون پنج بشر 100 میلی لیتر انداخته و سپس به مدت 10 ساعت با حفظ شرایط دمایی بر روی شیکر با سرعت ثابت قرار داده شدند. نمونه های شاهد نیز به همین ترتیب تهیه شده و سپس آزمون تعیین مقدار بر اساس روش کلی در زمان معین صورت پذیرفت. مشابه این مراحل برای سلولز در پنج بشر حاوی 50 میلی لیتر نرمال سالین نیز انجام و توسط محاسباتی نظیر آنچه در قسمت رهایش ذکر شد، میانگین تتراسایکلین هیدروکلراید جذب شده در واحد سطح سلولز بر اساس میکروگرم در دو محیط آب مقطر و نرمال سالین گزارش شد.

پس از بدست آوردن مقدار تتراسایکلین هیدروکلراید جذب شده در واحد سطح سلولز و تعیین میزان آنتی بیوتیک آزاد شده در هر ساعت از آزمون رهایش 8 ساعته، درصد تتراسایکلین هیدروکلراید آزاد شده در هر ساعت برای آزمون های رهایش در آب مقطر و نرمال سالین

مشخص شد.

نتایج

در شکل 2 (الف و ب) تفاوت ظاهری سلولز از نظر رنگ، ضخامت و نیز میزان آب موجود پیش و پس از تیمار آن به راحتی قابل مشاهده می باشد. جذب نمونه های شاهد در تمامی آزمونهای صورت گرفته ناچیز بوده (در حد چند صدم درصد)، بنابراین تاثیر سلولز بر روی مقدار جذب ماورا بنفش محلول های حاصل از رهایش قابل چشم پوشی بود.

داده های جدول1 نشانگر آزادی تدریجی تتراسایکلین هیدروکلراید در محیط آب مقطر از غشای سلولزی بوده که نشان می دهند پس از گذشت 8 ساعت معادل ۶۲/۷۱ درصد دارو از قطعه سلولزی 2×1 سانتی متری آزاد شده است. داده های جدول 1 مبین آزادی تدریجی تتراسایکلین هیدروکلراید در محیط نرمال سالین از غشای سلولزی بوده که نشان می دهند پس از گذشت 8 ساعت معادل 96/12 درصد دارو از قطعه سلولزی 2×1 سانتی متری آزاد شده است. لازم به ذکر است که میزان و سرعت رهایش در محیط نرمال سالین نسبت به آب مقطر بیشتر بوده که مربوط به نوع پیوند ایجاد شده بین ذرات تتراسایکلین هیدروکلراید و نرمال سالین نسبت به آب مقطر می باشد.

بحث

یکی از بزرگ ترین گروه های بیماران محتاج به پانسمان، بیماران دچار سوختگی می باشند که به واسطه نوع ضایعه و وسعت آن با مشکلات متنوعی چون دشواری تعویض پانسمان، خشک شدن زخم و چسبیدن پانسمان به آن رو به رو هستند. سلولز باکتریایی یک فرآورده نوین بیولوژیک بوده که دارای ویژگی های متمایزی نسبت به انواع پانسمان های سنتی است و علاوه بر توان بالا در حفظ آب، قادر به تسریع ترمیم زخم می باشد(5) بررسی های پیشین نشان داده اند که این محصول توان جذب و رهایش کاتیون های نقره را نیز دارد(12).

در این مطالعه به بررسی توانایی سلولز میکروبی در جذب و رهایش تتراسایکلین هیدروکلراید پرداخته شد. با توجه به آزمایشات انجام شده و نتایج بدست آمده مشخص شد که سلولز باکتریایی توان جذب آنتی بیوتیک تتراسایکلین هیدروکلراید را داشته و می تواند آن را در محیط مرطوب رها سازد. بر اساس داده های جدول 1 به نظر می رسد نوع

شکل 2. الف: نمایی از سلولز پیش از تیمار ب: نمایی از سلولز پس از تیمار و خشک شدن

جدول1. درصد تتراسایکلین هیدروکلراید آزاد شده از واحد سطح سلولز در رهایش 8 ساعته در محیط آب مقطر و محیط نرمال سالین(n=5) (**انحراف معیار درصد داروی آزاد شده)**

محیط	1	2	3	4	5	6	7	8
محیط آب مقطر	13/51(3/4)	20/2(6/2)	23/74(8/6)	32/67(6/7)	40/53(5/7)	41/39(5/9)	53/92(7/6)	62/71(3/9)
محیط نرمال سالین	20/11(3/3)	30/95(4/3)	37/10(2/5)	46/13(1/9)	57/14(4/4)	68/49(5/8)	80/32(5/4)	96/12(5/2)

حلال بر سرعت آزاد سازی طی فرآیند رهایش تاثیر به سزایی داشته باشد، چرا که آنتی بیوتیک جذب شده در سلولز باکتریایی، پس از 8 ساعت درون محیط نرمال سالین رهایش بیشتری نسبت به محیط آب مقطر داشته، در صورتی که از لحاظ شیمیایی تصور می شد رهایش در محیط آب مقطرکامل تر انجام شود. لذا به نظر می رسد بررسی روند رهایش در محیط درون بدن بتواند گویای نتایج کامل تری باشد.

با توجه به تمامی برتری های ذکر شده این فرآورده باکتریایی نسبت به انواع پانسمان های سنتی و تاثیر مثبت آن بر روی ترمیم جراحات(13) و از سویی دیگر نتایج بدست آمده در این مطالعه، به نظر می رسد زمینه برای تحقیقات گسترده تر به جهت تولید پانسمان های حاوی دارو (آنتی بیوتیک، ترمیم کننده ها، مسکن ها و غیره) از این فرآورده میکروبی که به دلیل رهایش تدریجی دارو، غلظت درمانی مناسبی را در محیط ایجاد و عوارض جانبی را کاهش می دهد، مساعد باشد.

نتیجه گیری

بر پایه داده های بدست آمده می توان نتیجه گرفت که سلولز تولیدی توسط استوباکترگزیلینوم در کنار تمام ویژگی هایی منحصر به فردی که به عنوان یک پانسمان دارد می تواند آنتی بیوتیک تتراسایکلین هیدروکلراید را جذب و آن را به طور آهسته رها سازد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه آزاد، واحد علوم دارویی که حمایت های مالی این طرح (شماره 2004) را به عهده داشتند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1.Cooper DM. Wound healing: new understandings. Nurse Pract Forum. 1999; 10(2):74-86.

2.Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews. 2002;66(3):506-577.

3.Hoenich N. Cellulose for medical applications: Past, present, and future. BioResources. 2006; 1(2): 270-280.

4.Schramm M, Gromet Z, Hestrin S. Synthesis of cellulose by Acetobacter Xylinum. 3. Substrates and inhibitors. Biochemical Journal. 1957; 67(4): 669-679.

5.Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. Biomaterials. 2006;27(2):145-151.

6.Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. Advanced drug delivery reviews. 1998; 31(3): 267-285.

7.Dai T, Tegos GP, Burkatovskaya M, Castano AP, Hamblin MR. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53(2):393-400.

8.Papini R. ABC of burns: Management of burn injuries of various depths. BMJ: British Medical Journal. 2004; 329(7458): 158-160.

9.Smith DJ, Pulfer S, Shabani M. Polymeric wound healing accelerators. Google Patents; 1996.

10.Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. Progress in Polymer Science. 2001; 26(9): 1561-1603.

11.Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan D, Brittberg M, et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. Biomaterials. 2005; 26(4): 419-431.

12.Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Carbohydrate polymers. 2008; 72(1): 43-51.

13.Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown Jr RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. Biomacromolecules. 2007; 8(1): 1-12.