ELECTROSPUN FIBER MATS CONTAINING SILVER NANOPARTICLES WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Pim-on Rujitanaroj

A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University
2009

Thesis Title:	Electrospun Fiber Mats Containing Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity
By:	Pim-on Rujitanaroj
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Pitt Supaphol
	Dr. Nuttaporn Pimpha

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

..... Dean

(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:

....

(Asst. Prof. Pomthong Malakul) (Assoc. Prof. Pitt Supaphol)

....

(Dr. Nuttaporn Pimpha) (Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya)

.....

(Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue)

ABSTRACT

4882002063: Polymer Science Program

Pim-on Rujitanaroj: Electrospun Fiber Mats Containing Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity.

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Pitt Supaphol and Dr. Nuttaporn Pimpha, 258 pp.

Keywords: Silver nanoparticles/ Electrospinning/ Gelatin/ Polyacrylonitrile

Silver has a long history as an antimicrobial agent, especially in the treatment of burns. Several products have incorporated silver for use as a topical antibacterial agent, such as silver nitrate, silver sulphadiazine (SSD), silver sulphadiazine/chlorhexidine. Moreover, nanotechnology has provided a way of producing pure silver nanoparticles (nanoAg^0). This system also markedly increases the rate of silver ion release. NanoAg^0 is one of the most effective antimicrobial agents because of the high specific surface or volume fraction so that a large proportion of metal atoms are directly contact with the environment and can kill a wide range of bacteria. In this work, mats of poly(acrylonitrile) (PAN; $M_w \approx 55{,}500$) and gelatine (GT; Bloom $\approx$ 180) fibers containing nanoAg^0 were prepared by e-spinning and these e-spun fiber mats were prepared to be used as surgical mask and wound dressing pads, respectively. The nanoAg^0-containing poly(acrylonitrile) and gelatin fiber mats were characterized for various properties (i.e., morphological, mechanical, swelling, and weight loss), the release characteristic of the as-loaded silver as well as their anti-bacterial activity. Moreover, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of neat and nanoAg^0-containing e-spun gelatin fiber mats with intended uses as wound dressing materials were investigated by studying the cytotoxicity and cell spreading of human dermal fibroblast (NHDF) or monocytes/macrophage on materials. In addition, morphologies of NHDF and monocytes/macrophage attached on these fibers were also observed by scanning electron microscope (SEM) and confocal microscopy, respectively.

บทคัดย่อ

พิมพ์อร รุจิธนโรจน์ : การพัฒนาแผ่นเส้นใยอิเล็คโตรสปันที่มีอนุภาคซิลเวอร์นาโนสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นวัสดุต้านเชื้อแบคทีเรีย (Electrospun Fiber Mats Containing Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พิชญ์ สุภผล และ ดร. ณัฏฐพร พิมพะ 258 หน้า

เป็นที่ทราบกันดีว่า ซิลเวอร์มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี ซิลเวอร์จึงถูกนำผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆเพื่อใช้เป็นแผ่นฆ่าเชื้อโรคหรือวัสดุปิดแผล ไม่ว่าจะเป็นซิลเวอร์ไนเตรต ซิลเวอร์ซัลไฟด์ และอื่นๆ นอกจากนี้นาโนเทคโนโลยีได้ถูกพัฒนานำมาใช้ในการขึ้นรูปซิลเวอร์หรือที่เรียกกันว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโน (silver nanoparticles; nanoAg^0) ด้วยขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เล็กมาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโรคสูงยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงเป็นการเตรียมเส้นใยพอลิอะคริโลไนไตร์และเส้นใยเจลาตินที่ผสมอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วนกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต โดยเส้นใยทั้งสองชนิดนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแผ่นกรองอากาศหรือวัสดุปิดแผลตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาสมบัติพื้นฐานต่างๆ เช่น ลักษณะพื้นผิวของเส้นใย ขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโนในเส้นใย รวมทั้งศึกษาสมบัติเชิงกล การบวมน้ำและการสูญเสียน้ำหนักของแผ่นเส้นใยเหล่านั้น และยังได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการปลดปล่อยของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากแผ่นเส้นใย โดยใช้วิธีการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ เนื่องจากความต้องการที่จะประยุกต์ใช้แผ่นเส้นใยอิเล็คโตรสปันเหล่านี้สำหรับเป็นวัสดุที่ฆ่าเชื้อโรคได้ จึงได้ศึกษาถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อโรคของเส้นใยที่ผสมอนุภาคซิลเวอร์นาโน อีกทั้งเส้นใยเจลาตินสามารถประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผล จึงได้ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ กับเซลล์ผิวหนัง (NHDF) หรือเซลล์เม็ดเลือดขาว (monocyte/macrophage) โดยทดสอบความเป็นพิษ, การเกาะของเซลล์, การเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลักษณะของเซลล์ผิวหนังที่เกาะบนแผ่นเส้นใยอิเล็คโตรสปัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้กล้องคอนโฟคอลไมโครสโคปปีด้วย

ACKNOWLEDGEMENTS

Appreciation is expressed to those who have made contributions to this dissertation. First the author gratefully acknowledges her advisor, Assoc. Prof. Pitt Supaphol from The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University and Dr. Nuttaporn Pimpha from National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency for giving her invaluable knowledge, meaningful guidance and their encouragement all along the way. She also would like to express her sincere thanks to Professor James M. Anderson and colleagues from Case Western Reserve University for giving her useful advises and suggestions while she did a short research at Case Western Reserve University.

She gratefully acknowledges all faculty members and staffs at The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their knowledge and assistance. Moreover she would like to give her special thanks to all members in her research group and all of her friends for their kind assistance

Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Pitt Supaphol, Asst. Prof. Hathaikarn Manuspiya, Dr. Nuttaporn Pimpha and Asst. Prof. Chidchanok Meechaisue are further acknowledged for being her dissertation committees, making valuable comments and suggestions.

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

Finally, she is grateful for the partial fund by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology, and by the Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Thailand, National Nanotechnology Center (through an in-house research grant) and a doctoral scholarship received from the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) (TG-55-09-49-067D). This work would not be carried out successfully without all financial supports.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER **PAGE**

LIST OF TABLES

TABLE **PAGE**

TABLE **PAGE**

TABLE **PAGE**

CHAPTER VI

TABLE **PAGE**

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

CHAPTER IV

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

CHAPTER VI

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

ABBREVIATIONS

$nanoAg^0$	Silver nanoparticles
$AgNO_3$	Silver nitrate
PAN	Poly(acrylonitrile)
GT	Gelatin
PLLA	Poly(L-lactic acid)
PCL	Polycaprolactone
PBSu-DCH	Poly (1,4-butylene succinate) extended with 1,6-diisocyanatohexane
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
MRSA	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
E.coli	*Escherichia coli*
B.subtilis	*Bacillus subtilis*
M_w	Molecular weight
PV	Pervaporation
D	Dialysis
GS	Gas separation
ED	Electrodialysis
NF	Nanofiltration
UF	Ultrafiltration
MF	Microfiltration
RO	Reverse Osmosis
AFM	Atomic force microscope
SEM	Scanning electron microscope
TEM	Transmission electron microscope
EDX	Energy dispersive X-ray
TG-DTA	Thermogravimetric/differential thermal analyzer
AAS	Atomic absorption spectroscope
GTA	Glutaraldehyde
SBF	Simulated body fluid
PBS	Phosphate buffer solution

DMF	*N,N*-dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
NHDF	Normal human dermal fibroblasts
ECM	Extracellular matrix
TCPS	Tissue-culture polystyrene plate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovine serum
SFM	Serum-free medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
RGD	Fibronectin-like protein polymer
RNAse	Ribonuclease A
H&E	Hematoxylin and Eosin
h	Hour

LIST OF SYMBOLS

γ	Surface tension
ρ	Density
V_*	Critical Potential
V_c	Critical Voltage
DC	Direct current
M	Weight of sample after submersion in the testing solution
M_i	Initial weight of the sample in its dry state
M_d	Weight of the sample after submersion in the testing solution in its dry state
R	Percentage of reduction
A	The number of bacteria recovered from the incubated treated test specimen (GT/$AgNO_3$) after 37°C for 24 hr
B	The number of bacteria recovered from the incubated untreated control specimen (Neat GT) after incubation at 37°C for 24 hr