PREPARATION OF POLYVINYL ACETATE LOADED WITH MANGOSTEEN EXTRACT FOR USE AS ANTIBACTERIAL SPRAY DRESSING

Nattapol Boonmak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University
2015

T 28309464

Thesis Title: Preparation of Polyvinyl Acetate Loaded with Mangosteen Extract for Use as Antibacterial Spray Dressing

By: Nattapol Boonmak

Program: Polymer Science

Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol

Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science.

.... College Dean

(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:

....

(Prof. Pitt Supaphol)

....

(Assistant Prof. Hathaikarn Manuspiya)

....

(Dr. Pimolpun Niamlang)

580050

ABSTRACT

5672011063: Polymer Science Program

Nattapol Boonmak: Preparation of Polyvinyl Acetate Loaded with Mangosteen Extract for Use as Antibacterial Spray Dressing.

Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol 51 pp.

Keywords: Mangosteen extract/ Antibacterial property/ Spray application/ Wound dressing

A new kind product of wound care dressing was fabricated in spray formation. To cover skin and wound, polyvinyl acetate (PVAc) was chosen by biocompatibility and transparent film forming property. Firstly, polyvinyl acetate was dissolved in mixing solvent which are ethyl acetate, ethanol, and propanol. To detect solubility of solvent, all varying mixing solvent were investigated by UV-visible machine at 660 nm and then the proper ratio of mixing is 30:50:20, respectively. To improve antibacterial activity, mangosteen extract was loaded into spray's solution based on MIC and MBC value which obtained by MIC and MBC techniques. The minimal inhibitory concentration (MIC) that can inhibit visible growth of both representative of gram-positive and gram negative bacteria for instant is 50 μg/ml and the minimum bactericidal concentration is 100 μg/ml. Moreover, there are several techniques use to support the antibacterial property which are disk diffusion method ATCC147 and Time-kill assay. The inhibition zone is proportional to mangosteen concentration and the highest at 3% w/w of mangosteen extract. As the same results in Time-kill assay, 3% w/w of mangosteen extract is the most effectiveness on prohibit microbial. The bacteria survivors reduced within 24 hours. For the indirect cytotoxicity of cell, the materails were evaluated with mouse fibroblast (L929), normal human fibroblast cells (NHF) and keratinocyte cells (HaCat) by culturing on the extraction media of wound dressing surface to determine cell viability using MTT assay. Then, the testing of mats showed good results for cell viability of L929, NHF and HaCat cells.

บทคัดย่อ

ณัฐพล บุญมาก : การเตรียมพอลิไวนิลอะซิเตตที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเปลือกมังคุดสำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหับปิดแผลในรูปแบบของสเปรย์ (Preparation of Polyvinyl Acetate Loaded with Mangosteen Extract for Use as Antibacterial Spray Dressing) อ. ที่ปรึกษา : ศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล 51 หน้า

วัสดุปิดแผลชนิดใหม่ในรูปแบบสเปรย์ถูกผลิตขึ้นจากพอลิไวนิลอะซิเตตด้วยคุณสมบัติความไม่เป็นพิษและความใสของวัสดุในรูปแบบของฟิล์ม ในขั้นแรกพอลิไวนิลอะซิเตตถูกละลายในสารละลายผสมที่มีส่วนผสมของ Ethyl acetate, Ethanol และ Propanol. เนื่องจากการเตรียมสารละลายนั้นต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพการละลายที่ดี ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการตรวจสอบการละลายโดย UV-visible machine ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ซึ่งพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 30:50:20 ตามลำดับ เพื่อที่จะปรับปรุงคุณสมบัติด้านการต้านแบคทีเรีย จึงเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดลงไปในสารละลายของสเปรย์โดยอัตราการเติมนั้นอ้างอิงจากค่า MIC และ MBC ซึ่งมีการทดสอบกับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งค่า MIC มีค่าเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC มีค่าเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีการใช้การทดสอบอื่นเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดเช่น Disk diffusion method ATCC147 และ Time-kill assay ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยที่รอบ ๆ ของวัสดุตัวอย่างจะมี Inhibition zone แสดงถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และที่ 3% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากเปลือกมังคุดเป็นอัตราส่วนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มากที่สุด เช่นเดียวกันกับการทดสอบ Time-kill assay พบว่าที่ 3% โดยน้ำหนักของสารสกัดจากเปลือกมังคุดแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ โดยใช้ Mouse fibroblast cells (L929), NHF กับ Human fibroblast cells ซึ่งจากผลของการทดสอบนั้นพบว่าวัสดุปิดแผลที่พัฒนาขึ้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิด

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to say sincerely thank to Prof. Pitt Supaphol for advising the roles and direction of this thesis and also all members in PS group, especially Mr. Pongpol Ekabutr for helping and giving suggestions or techniques to solve some trouble in my work until I have overcome successfully my project without any trouble. Moreover, I am so grateful for all committee, Assistant Prof. Hathaikarn Manuspiya and Dr. Pimolpun Niamlang to recommend and participate in my thesis presentation and also direct me to do in better way for my lab.

Moreover, I am going to thank to Prof. Prasit Pavasant from Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for your kindness and all supports in his laboratory.

In addition, I am grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by the petroleum and Petrochemical College.

Furthermore, I would like to thank the Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology (PETROMAT) for research funding.

Lastly, this thesis work is funded by The Petroleum and Petrochemical College; and The National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	ix
List of Figures	x
Abbreviations	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	3
2.1 Wounds	3
2.1.1 Opened Wounds	3
2.1.2 Closed Wounds	3
2.1.3 Acute Wounds	3
2.1.4 Chronic Wounds	3
2.2 Mechanism of Wound Healing	4
2.2.1 The Inflammatory Phase	4
2.2.2 Proliferation Phase	4
2.2.3 Remodeling Phase	4
2.3 Wound Dressings	5
2.3.1 Low or Non-adherent Contact Layer Dressing	5
2.3.2 Hydrogel Dressing	6
2.3.3 Alginate Dressing	6
2.3.4 Foam Dressing	7

CHAPTER		PAGE
	2.4 Materials	7
	2.4.1 Polyvinyl Acetate (PVAc)	7
	2.4.2 Mangosteen Extract	9
	2.5 Spray Dressing Application	13
III	**EXPERIMENTAL**	15
	3.1 Materials	15
	3.1.1 Spray Solution	15
	3.1.2 Bacteria Culture	15
	3.1.3 Cytotoxicity Test	15
	3.1.4 In Vitro Drug Release	16
	3.2 Equipment	16
	3.3 Methodology	16
	3.3.1 Turbidity Measurement	16
	3.3.2 Evaporation Rate	17
	3.2.3 Solution Viscosity	17
	3.2.4 Contact Angle	17
	3.3.5 In Vitro Drug Release	17
	3.3.6 MIC and MBC	18
	3.3.7 Disk Diffusion Method ATCC147	18
	3.3.8 Time-kill Assay	19
	3.3.9 Cell Cytotoxicity	19
IV	**RESULTS AND DISCUSSION**	21
	4.1 Polyvinyl Acetate Solubility	21
	4.2 Effect of Mixing Solvent on Spray Solution	22
	4.3 Polyvinyl Acetate Concentration	24
	4.4 Antibacterial Activities of Xantones	27
	4.5 Cytotoxicity	38
	4.6 Waterproof Property	41

CHAPTER		PAGE
	4.7 In Vitro Drug Release	42
V	**CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS**	44
	REFERENCES	45
	CURRICULUM VITAE	51

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Antioxidant properties of mangosteen extract	10
2.2	Antitumoral properties of mangosteen extract	11
2.3	Anti-imflammatory properties of mangosteen extract	12
2.4	Antibacterial properties of mangosteen extract	13
4.1	MIC and MBC value of Mangosteen extract	27
4.2	Water contact angle of samples and commercial products	41

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Cellulitis cause by A. buamannii on the left leg and forefoot.	5
2.2	The structure polyvinyl acetate.	8
2.3	The diagram of spray drying process.	13
2.4	The diagram of affecting factor on spray drying process.	14
4.1	Characteristic of PVAc solutions after left for 2 weeks.	21
4.2	Absorbed light turbidity by varying amount of ethyl acetate.	22
4.3	Absorbed light turbidity of mixing solvent.	23
4.4	Characteristic of PVAc solutions after left for 2 weeks based on mixing solvent.	23
4.5	Evaporation rate of mixing solvent.	24
4.6	Solution viscosity of solution by varying polymer concentration.	25
4.7	Rate of evaporation based on concentration of PVAc.	26
4.8	Solid content of each specimens by varying sprayed times.	27
4.9	Solution viscosity of spray's solution due to varying amount of mangosteen extract.	28
4.10	Inhibition zone of each sample.	29
4.11	Illustration of inhibition zone around samples A) *E. coli* B) *E. farcalis* C) MDR D) MRSA E) *P. aeruginosa* F) *S.aureus* G) *S. epidermidis* H) VRE.	30

FIGURE **PAGE**

4.12	Effect of mangosteen extract concentration on bacteria reduction A) *P. aeroginosa* B) MDR C) E. coli D) MRSA E) *E. faecalis*.	33
4.13	Bacteria on broth agar plate at the same dilution after dropping bacteria solution on each samples for 24 hours.	36
4.14	Cell viability of L929 of each sample.	39
4.15	Cell viability of HaCat of each sample.	40
4.16	Cell viability of NHF of each sample.	40
4.17	Contact angle of water on each samples.	42
4.18	Illustration of mangosteen extract release in PBH buffer (pH 7.4).	43
4.19	Illustration of mangosteen extract release in acetate buffer (pH 5.5).	43

ABBREVIATIONS

PVAc	=	Polyvinyl acetate
MG1	=	PVAc loaded 1% w/w of mangosteen extract
MG2	=	PVAc loaded 2% w/w of mangosteen extract
MG3	=	PVAc loaded 3% w/w of mangosteen extract
CM1	=	Commercial product 1
CM1	=	Commercial product 1
CFUs	=	Colony forming units
MBC	=	Minimum bactericidal concentration
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
L929	=	Mouse fibroblast cell NCTC clone 929 of strain L
HaCat	=	Keratinocyte cell line from adult human skin
NHF	=	Normal human fibroblast cell