

**DEVELOPMENT OF NOVEL ANTIBACTERIAL WOUND DRESSING
COATED WITH CALCIUM ALGINATE LOADED GARCINIA
MANGOSTANA EXTRACT**

Saikhim Panawes

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment 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,
and Case Western Reserve University

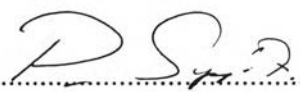
2015

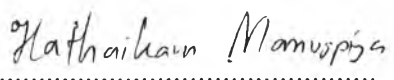
Thesis Title: Development of Novel Antibacterial Wound Dressing Coated with Calcium Alginate Loaded Garcinia Mangostana Extract
By: Saikhim Panawes
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Prof. Pitt Supaphol

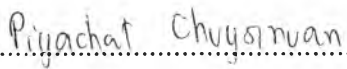
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.


..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


.....
(Prof. Pitt Supaphol)


.....
(Assist.Prof. Hathaikarn Manuspiya)


.....
(Dr. Piyachat Chuysinuan)

ABSTRACT

5672021063: Polymer Science Program
Saikhim Panawes: Development of Novel Antibacterial Wound
Dressing Coated with Calcium Alginate Loaded
GarciniaMangostanaExtractDressing.
Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol49 pp.

Keywords: Mangosteen extracts/ Wound dressing/ Calcium alginate/
Antibacterial/ Blood clotting

At the present, gauze dressing is a most popular dressing, but traditional gauze is a non-cremate moist environment, non-antibacterial and non-blood coagulation material. Therefore, in this research, calcium alginate used to enhance traditional gauze properties; swelling ratio, moist environment and blood coagulation. The calcium alginate was used to coat on gauze by dipping gauze in sodium alginate solution and calcium chlorine solution. According to experiment, the swelling ratio increased with the increase of calcium alginate concentration. However, the coated gauze with more than 1% w/v of alginate showed a rough surface. On the other hand, the oxygen permeability decreased with the increase of concentration. The blood coagulation was also investigated by estimating blood clotting index (BCI). The BCI value was found decrease when increase the alginate concentration. Furthermore, antibacterial prosperity of gauze dressing was enhanced by mangosteen extracts. The antibacterial efficacy of mangosteen extracts was studied by using disc diffusion method (ATCC 147), the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and bacterial reduction method. We found that initial traditional gauze cannot inhibit all bacteria and pure calcium alginate cannot completely against all bacteria. Thus, a small of mangosteen extract was added to improve the antibacterial properties. The results showed none of bacteria was found after 24 hours in a bacterial reduction method and the increase of clear zone in a disc diffusion method. However, the increase of mangosteen extracts displayed toxicity on human cell in cytotoxicity testing.

บทคัดย่อ

สายจิม พนาเวศร์ : การพัฒนาผ้าปิดแผลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยแคลเซียมแอลจิเนตและสารสกัดจากเปลือกมังคุด (Development of Novel Antibacterial Wound Dressing Coated with Calcium Alginate Loaded Garcinia Mangostana Extract.) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ.ดร. พิชญ์ สุภผล 49 หน้า

ในปัจจุบันผ้าก๊อชปิดแผลเป็นที่นิยมใช้กันมาก แต่เนื่องจากผ้าก๊อชปิดแผลเป็นวัสดุที่ไม่สามารถสร้างสิ่งแวดล้อมที่ชื้น ยับยั้งแบคทีเรีย และไม่สามารถส่งเสริมการแข็งตัวของเลือดได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงใช้แคลเซียมแอลจิเนตเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติต่าง ๆ ของผ้าก๊อชปิดแผล คือ อัตราการบวมตัว การสร้างสิ่งแวดล้อมที่ชื้น และการสนับสนุนการแข็งตัวของเลือด แคลเซียมแอลจิเนตถูกเคลือบบนผ้าก๊อชปิดแผล ด้วยการนำผ้าก๊อชจุ่มลงในสารละลายของโซเดียมแอลจิเนต และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จากผลการทดลอง อัตราการบวมตัวมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแอลจิเนตมีค่ามากขึ้น อย่างไรก็ตาม ผ้าก๊อชปิดแผลที่เคลือบด้วยแอลจิเนตที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละหนึ่งของน้ำหนักแอลจิเนตต่อปริมาตรของสารละลาย จะมีผิวหน้าของวัสดุปิดแผลที่ขรุขระ ในทางตรงกันข้ามค่าการซึมผ่านของออกซิเจนลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตมีค่าเพิ่มสูงขึ้น การแข็งตัวของเลือดได้ทำการศึกษาโดยการคำนวณค่า ดัชนีการแข็งตัวของเลือด (Blood Clotting Index) พบว่า ค่าดัชนีการแข็งตัวของเลือดมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอลจิเนต นอกจากนี้ ได้มีการปรับปรุงคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของวัสดุปิดแผลด้วยสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียศึกษาได้จากวิธี Disc diffusion method (ATCC 147) The minimum inhibitory concentration (MIC) The minimum bactericidal concentration (MBC) และ Bacterial reduction method จากงานวิจัยพบว่า ผ้าก๊อชปิดแผลไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดได้ และผ้าก๊อชที่เคลือบด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย ดังนั้นการเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดจำนวนเล็กน้อย (0.02% w/w) สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียได้ เห็นได้จากการทดลองวิธี Bacterial reduction method คือไม่พบแบคทีเรียที่เวลาในการทดลอง 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการใช้วิธี Disc diffusion method พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งแบคทีเรียได้มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อมีสารสกัดจากเปลือกมังคุด อย่างไรก็ตาม การเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่มากเกินไป จะปรากฏความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์เมื่อทดสอบด้วยวิธี Cytotoxicity

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to say sincerely thank to Prof. Pitt Supaphol for providing valuable guidance, direction, encouragement and opportunities. In addition, I would like to thank all the members in PS group, especially, Mr Pongpol Ekabutr and Mr. Jitti Niyompanich for giving a great counsel and suggestion until I have overcome successfully my project without any trouble. I would like to appreciate for all committees, Assistant Prof. Hathaikarn Manuspiya and Dr. Piyachat Chuysinua member of the thesis committee for their kind cooperation.

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

Finally, 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
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
 II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	
2.1 Alginate	3
2.1.1 Source	3
2.1.2 Chemical Structures	3
2.1.3 Ionic Crosslinking	4
2.1.4 Mild Gelation Conditions	5
2.2 Wounds	5
2.2.1 Type of Wounds	5
2.3 Wound Healing	6
2.2.1 Hemostasis and Inflammation	7
2.2.2 Migration	8
2.2.3 Proliferation	8
2.2.4 Maturation	8
2.4 Wound Dressing	8
2.4.1 Classification of Wound Dressing	8
2.5 The Clotting Process (Hemostasis)	9

CHAPTER	PAGE
III EXPERIMENTAL	16
3.1 Materials	16
3.1.1 Preparation of Coated Gauze	16
3.1.2 For Bacterial Culture	16
3.1.3 For Cytotoxicity Test	16
3.1.4 For In vitro Drug Release Study	17
3.2 Equipment	17
3.2.1 Petri Dish Plastic	17
3.2.2 Shaking Bath	17
3.2.3 UV-Vis Spectrophotometer	17
3.2.4 Micropalted Reader	17
3.3 Methodology	18
3.3.1 Characterization and Testing of Coated Gauze with Mangosteen Extract	18
3.3.2 Bacterial Culture Evaluations	19
3.3.3 Biological Characterization	20
IV RESULTS AND DISCUSSION	22
4.1 Weight	22
4.2 Swelling Behaviors	24
4.3 Oxygen Permeability	26
4.4 In vitro Blood Clotting Test	28
4.5 In vitro Drug Release Test	30
4.6 MIC and MBC	32
4.7 Disc Diffusion Method	33
4.8 Bacteria Reduction by Counting the Colony	34
4.9 Cytotoxicity Test	38

CHAPTER		PAGE
V	CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	40
	REFERENCES	41
	APPENDIXS	45
Appendix A	The Percentage of Ratio between Mangosteen Weight and Sodium Alginate Weight	45
Appendix B	The Calibration Curve of Dissolved Mangosteen Extracts by UV-Vis Spectroscopy	46
Appendix C	The Clear Zone from Dish Diffusion Method of Coated Gauze Contented Mangosteen Extracts to Against the Bacteria	48
	CURRICULUM VITAE	49

LIST OF TABLES

Table		PAGE
4.1	The MIC and MBC Value of <i>Garcinia Mangostana</i> Extract	32
A1	The percentage of ratio between mangosteen weight and sodium alginate weight	45

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Representative alginate structure: (a) chain conformation and (b) block distribution.	3
2.2 Possible junction points in alginates.	4
2.3 Layer of the skins.	6
2.4 Schematic representation of different phases of wound healing.	7
2.5 The blood coagulation pathways.	11
4.1 The percentage of sample weight after coating by different immersion times. *Significance at $p < 0.05$ with respect to coated gauze with AG solution at 60 seconds.	23
4.2 The appearance of coated gauze with difference of immersed Time; 5 seconds (a), 10 seconds (b), 20 seconds (c), 40 seconds (d), 1 minute (e), 3 minutes (f), and 5 minutes (g).	23
4.3 The appearance of coated gauze with difference of Na-AG concentration at 5.0% (a.), 3.0% (b.), 1.0% (c) and 0.5% w/v (d.).	24
4.4 Swelling behaviors of coated gauzes with varied alginate concentration of initial gauze (●), 0.0626% (*), 0.25% (×), 0.50% (▲), 1.0% (■) and 3.0% (◆) w/v alginate solution.	25
4.5 The effect of concentrations of calcium alginate solution on oxygen permeability. *Significance at $P < 0.05$ with respect to initial gauze.	27
4.6 The effect of coated gauzes with mangosteen extracts on oxygen permeability. *Significance at $p < 0.05$ with respect to coated gauze by 0.5% w/v AG.	27

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
4.7 The effect of concentrations of calcium alginate solution on blood clotting index (BCI). *Significance at $p < 0.05$ with respect to initial gauze. **Significance at $p < 0.05$ with respect to coated gauze by 0.5% w/v AG.	29
4.8 The effect of coated gauzes with mangosteen extracts on blood clotting index (BCI). *Significance at $p < 0.05$ with respect to coated gauze by 0.5% w/v AG.	29
4.9 The kinetic of released mangosteen extract of coated gauze with 0.01% (◆), 0.02% (■) and 0.06% MT (▲) in acetate buffer (a) and PBS solution (b).	31
4.10 The mean diameter clear zones of coated gauze with varied MT agented all of the bacterial: <i>S. aureus</i> , <i>E. coil</i> , MRSA, <i>S. epidermidis</i> , MDR <i>A. Baumannii</i> , VRE and <i>E. faecalis</i> . *Significance at $p < 0.05$ with respect to coated gauze by 0.5% w/v AG.	34
4.11 The inhibition of MRSA (a), <i>E. Faecalis</i> (b), <i>E. Coil</i> (c), <i>P. Aeruginosa</i> (d) and MDR <i>A. Baumannii</i> (d) by control(◆), initial gauze (■), gauze with Ca-AG(▲), and coated gauze with MT 0.01% (×), 0.02% (*) and 0.06% (●).	35
4.12 The effect of the mandosteen extracts on cell viability; HaCat and FB cell. *Significance at $p < 0.05$ with respect to coated gauze by 0.5% w/v AG.	39
B1 The calibration curve of mangosteen extracts in acetate buffer (pH 5.5).	45

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
B2	The calibration curve of mangosteen extracts in PBS (pH 7.4).	46
C1	The clear zone of initial gauze (a) and coated gauze contented mangosteen extracts 0% (b), 0.01% (c), 0.02% (d) and 0.06% w/v (e) to against bacteria.	48