

**DEVELOPMENT OF ELECTROSPUN ADHESIVE LAYER  
CONTAINING CIPROFLOXACIN/COCONUT OIL FOR  
ANTIBACTERIAL WOUND DRESSING**

Sonthaya Chairwut

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,  
Case Western Reserve University  
2014

I 28369877

57 0139

**Thesis Title:** Development of Electrospun Adhesive Layer Containing Ciprofloxacin/Coconut Oil for Use as Antibacterial Wound Dressing

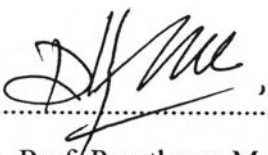
**By:** Sonthaya Chairwut

**Program:** Polymer Science

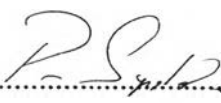
**Thesis Advisor:** Prof. Pitt Supaphol

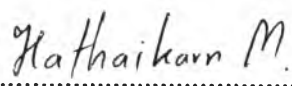
---

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)

  
.....  
(Assistant Prof. Hathaikarn Manuspiya)

  
.....  
(Dr. Pimolpun Niamlang)

## ABSTRACT

5572023063: Polymer Science Program  
Sonthaya Chairwut: Development of Electrospun Adhesive Layer  
Containing Ciprofloxacin/Coconut Oil for Antibacterial Wound  
Dressing. Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol 51 pp.  
Keywords: Ciprofloxacin/ Coconut oil/ Electrospun fibers/ Wound dressing

Poly(vinyl acetate), a non-toxic adhesive, was used to prepare electrospun fibrous membranes by blending an antibiotic and wound healing supporter to cover commercial polyurethane (PU) substrate. PU film has many advantages such as excellent air permeation and good mechanical properties. This study focused on the synergistic interaction between coconut oil and Ciprofloxacin (CPF), which can be toxic to the growth of cells. The surface morphology, drug release were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and UV-Vis spectroscopy. The antibacterial activity was tested against pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* which are the representatives of gram(-) and gram(+) bacteria, respectively. The inhibition zones of *E.coli* and *S.aureus* appeared when CPF and coconut oil was loaded at 1.25 mg/mL and 0.5 mL, respectively. For the cytotoxicity of cell viability, the mats were evaluated with mouse fibroblast (L929) and human fibroblast cells by culturing on the wound dressing surface to determine indirect cytotoxicity using MTT assay and then the testing of mats showed good results for cell viability of both L929 and human fibroblast cells.

## บทคัดย่อ

สนธยา ชัยอาวุธ : การพัฒนาเส้นใยชั้นกาวด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยไฟฟ้าสถิตที่มีส่วนผสมไซโปรฟลอกซาซินและน้ำมันมะพร้าวสำหรับประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผลที่มีคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Development of Electrospun Adhesive Layer Containing Ciprofloxacin/Coconut Oil for Antibacterial Wound Dressing) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล 51 หน้า

พอลิไวนิลอะซีเตตที่มีคุณสมบัติเป็นกาวที่ไม่เป็นพิษต่อผิวหนังของมนุษย์ ในงานวิจัยนี้ได้นำพอลิไวนิลอะซีเตตมาขึ้นรูปโดยวิธีการปั่นเส้นใยไฟฟ้าสถิตให้เป็นชั้นกาวบนแผ่นพอลิยูรีเทนฟิล์ม โดยชั้นกาวดังกล่าวจะมีองค์ประกอบของไซโปรฟลอกซาซินและน้ำมันมะพร้าวแล้วพ่นเคลือบลงบนแผ่นฟิล์มพอลิยูรีเทนซึ่งเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติในการซึมผ่านของแก๊สและมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี เหมาะสำหรับนำมาทำเป็นวัสดุปิดแผล งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาเรื่องฤทธิ์ทางยาและการเสริมฤทธิ์การฆ่าเชื้อโรคของน้ำมันมะพร้าวกับยาไซโปรฟลอกซาซินที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้วัสดุที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นพิษกับเซลล์เมื่อมีการใช้ยาในสัดส่วนที่สูงเกินความจำเป็น การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา การปลดปล่อยของยา และคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นกาวถูกวิเคราะห์โดยเครื่องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโกปี (Scanning Electron Microscopy, SEM) ยูวี-วิสสเปกโทรสโกปี (UV-vis spectroscopy) ส่วนเรื่องการต้านเชื้อแบคทีเรีย วัสดุตัวอย่างได้ถูกทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก(+) และแกรมลบ(-) ตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disk diffusion method (ATCC 147) พบว่า บริเวณที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งปรากฏชัดเจนเมื่อใช้ปริมาณยาไซโปรฟลอกซาซิน และน้ำมันมะพร้าวอยู่ที่ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิกรัมตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ โดยใช้ Mouse fibroblast cells (L929) กับ Human fibroblast cells เพาะเลี้ยงเซลล์กับแผ่นวัสดุตามวิธีการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT ซึ่งผลของการทดสอบนั้นพบว่าวัสดุปิดแผลที่พัฒนาขึ้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 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 committees, 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.

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

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	viii
List of Figures	ix
Abbreviations	xi
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II LITERATURE REVIEW</b>	 <b>4</b>
 <b>III EXPERIMENTAL</b>	 <b>21</b>
3.1 Materials	21
3.1.1 For Electrospinning Process	21
3.1.2 For Bacterial Culture	21
3.1.3 For Cytotoxicity Test	21
3.1.4 For <i>In Vitro</i> Drug Release Study	22
3.2 Equipment	22
3.3 Methodology	22
3.3.1 Evaluating MIC and MBC Value by Dilution Test and Agar Test	22
3.3.2 Blending of Coconut oil and CPF with Poly(Vinyl Acetate) Solution for Electrospinning.	23

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
3.3.3 Bacterial Culture Evaluations	24
3.3.4 Cytotoxicity Test	25
3.3.5 Characterization and Testing	27
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>29</b>
4.1 Evaluating MIC and MBC value by Dilution Test and Agar Test	29
4.2 Electrospinning Process	29
4.3 Bacterial Culture Evaluations	30
4.3.1 Zone Inhibition	30
4.3.2 The Bacterial Reduction Studies	34
4.4 Cytotoxicity Test	36
4.5 Characterization and Testing	38
4.5.1 <i>In Vitro</i> Drug Release Study	38
4.5.2 Contact Angle of Films Made by PVAc Solutions with Various Content of CPF and Coconut Oil	38
4.5.3 FTIR Spectroscopy	41
<b>V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>43</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>44</b>
<b>APPENDIX</b>	<b>50</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>51</b>

**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
4.1	Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of strains used for time-killed study	29
4.2	Antibacterial activity of the mats against tested bacterial strains	34



## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Sequence of molecular and cellular events in skin wound healing.	6
2.2 PU film dressing.	9
2.3 The structure of Ciprofloxacin.	10
2.4 Ciprofloxacin in tablets.	11
2.5 Poly(vinyl acetate) structure.	12
2.6 Coconut oil and fruit.	15
2.7 Setup of electrospinning apparatus with rotating cylinder.	18
2.8 Potential applications of electrospun polymer nanofibers.	18
2.9 SEM images of electrospun (A) PU, (B) PU-CA (1:1), (C) PU-CA (2:1), (D) PU-CA (3:1), PU-CA-zein and (F) PU-CA-zein-drug nanofibrous mat.	19
2.10 SEM photographs of electrospun nanofibers without drug and with 10% w/w drug loaded: A, B) PVA.	20
4.1 SEM images of electrospun fibers at 15 cm of distance and 18 kV of voltage generator : A) PVAc B) PF1.25 C) PFO1.25-5 D) PFO1.25-10 E) PF2.5 F) PFO2.5-5 and G) PFO2.5-10.	31
4.2 Bactericidal activity of pristine PVAc and PVAc with different CPF content electrospun fibers on PU film as mats with A) Gram-negative, <i>E.coli</i> and B) Gram-positive, <i>S.aureus</i> .	32
4.3 Bactericidal activity of pristine PVAc and PVAc with different CPF and 10% v/v of coconut oil content electrospun fibers on PU film as mats with A) Gram-negative, <i>E.coli</i> and B) Gram-positive, <i>S.aureus</i> .	32

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.4 Bactericidal activity of pristine PVAc and PVAc with different CPF and coconut oil content of electrospun fibers on PU film as mats with A) Gram-negative, <i>E.coli</i> and B) Gram-positive, <i>S.aureus</i> .	33
4.5 The percentage of bacterial reduction of <i>E.coli</i> against mats dressings over 1 and 24 h period <i>in vitro</i> .	35
4.6 The percentage of bacterial reduction of <i>S.aureus</i> against mats dressings over 1 and 24 h period <i>in vitro</i> .	36
4.7 Indirect cytotoxicity evaluation of mouse fibroblast cells (L929) cultured on five mats, PU film, PVAc, PFO1.25, PFO1.25-5, and PFO1.25-10.	37
4.8 Indirect cytotoxicity evaluation of human fibroblast cells cultured on five mats, PU film, PVAc, PF1.25, PFO1.25-5, and PFO1.25-10.	37
4.9 Effect of electrospun on the release profile of CPF from medicated electrospun mats containing 1.25 mg/mL of CPF in acetate buffer (pH 5.5).	39
4.10 Effect of electrospun on the release profile of CPF from medicated electrospun mats containing 1.25 mg/mL of CPF in PBS (pH 7.4).	40
4.11 Contact angles as related to various CPF and coconut oil volume ratios of the resulting films.	39
4.12 Photograph of water droplet on the mats (a) PU film (b) PF1.25, (c) PFO1.25-5, and (d) PFO1.25-10.	41
4.13 FT-IR spectrum of pristine PVAc, CPF and coconut oil and PFO1.25-5 and PFO1.25-10 comparing with pure CPF and Coconut oil.	42

**ABBREVIATIONS**

A1	=	PVAc with 10%v/v of oil
AN	=	PVAc
B1	=	PVAc loaded 0.31 mg/L of CPF and 10%v/v of oil
BN	=	PVAc loaded 0.31 mg/mL of CPF
C1	=	PVAc loaded 0.625 mg/L of CPF and 10%v/v of oil
CN	=	PVAc loaded 0.625 mg/mL of CPF
CFUs	=	Colony forming units
CPF	=	Ciprofloxacin
D1	=	PVAc loaded 1.25 mg/L of CPF and 10%v/v of oil
DN	=	PVAc loaded 1.25 mg/mL of CPF
E1	=	PVAc loaded 2.5 mg/L of CPF and 10%v/v of oil
EN	=	PVAc loaded 2.5 mg/mL of CPF
MBC	=	Minimum bactericidal concentration
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
PF1.25	=	PVAc with 1.25 mg/L of CPF
PF2.5	=	PVAc with 2.5 mg/L of CPF
PFO1.25-5	=	PVAc with 1.25 mg/L of CPF and 5%v/v of coconut oil
PFO1.25-10	=	PVAc with 1.25 mg/L of CPF and 10%v/v of coconut oil
PFO2.5-5	=	PVAc with 2.5 mg/L of CPF and 5%v/v of coconut oil
PFO2.5-10	=	PVAc with 2.5 mg/L of CPF and 10%v/v of coconut oil
PU	=	Polyurethane film
PVAc	=	Poly(vinyl acetate)
TFD	=	Transparent film or semi-permeable film dressing