

**PREPARATION OF POLY(VINYL ALCOHOL) FILM BLENDED WITH
QUATERNARY AMMONIUM CHITOSAN NANOPARTICLES LOADED
TETRACYCLINE FOR ANTIBACTERIAL WOUND DRESSING**

Titiyaporn Tongrain

**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**

2014

F 28369774

570035

Thesis Title: Preparation of Poly(vinyl alcohol) Film Blended with Quaternary Ammonium Chitosan Nanoparticles Loaded Tetracycline for Antibacterial Wound Dressing

By: Titiyaporn Tongrain

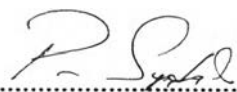
Program: Polymer Science


Thesis Advisors: Prof. Pitt Supaphol

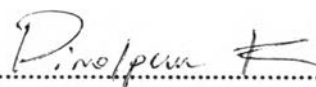
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.


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

Thesis Committee:


.....
(Prof. Pitt Supaphol)


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


.....
(Dr. Pimolpun Niamlang)

ABSTRACT

5572026063: Polymer Science Program
Titiyaporn Tongrain: Preparation of Poly(Vinyl Alcohol) Film
Blended with Quaternary Ammonium Chitosan Nanoparticles Loaded
Tetracycline for Antibacterial Wound Dressing.
Thesis Advisor: Prof. Pitt Supaphol 56 pp.

Keywords: Tetracycline/ Wound dressing/ Nanoparticles/ Encapsulation
Quaternary ammonium chitosan

Poly(vinyl alcohol) films, intended for wound dressing application, can be prepared by a solution casting method. Hence, the aim of this study was to develop a dressing that can enhance the wound healing process. The QCh, quaternized derivative of chitosan, was synthesized by the quaternization process and exhibited excellent water solubility. Water solubility testing, ¹H NMR, FT-IR, and Zeta potential measurements were used to confirm the success of the quaternization. The degree of quaternization of QCh was in a range of 72.0 ± 0.3 %, and the positively charged surface was about 24-29 mV. The encapsulation of tetracycline (TC) in QCh nanoparticles (QCh_NPs) was prepared by ionic gelation using tripolyphosphate (TPP) as crosslinking agent. The success of TC loaded into the QCh_NPs was confirmed by FT-IR, UV-vis spectrophotometry, and XRD technique. The QCh/TC_NPs samples were spherical with an average size of 230-800 nm observed by SEM and DLS. The encapsulation efficiency (EE) of TC loaded into the QCh_NPs was about 72-94 %, with the use of 2.5–12.5 mg/ml of initial TC. The antibacterial activities of PVA films loaded QCh/TC_NPs containing the ratios of QCh:TC, 1:3, 1:4 and 1:5, against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, and *Staphylococcus aureus* were evaluated systematically by disk diffusion method (AATCC 147) and broth dilution method. Finally, the indirect cytotoxicity of the wound dressings was studied in mouse fibroblast (L929) and human fibroblast cells by using MTT assay. The MTT assay confirmed that the wound dressings of QCh:TC, 1:3, was a promising candidate of high potential antibacterial wound dressing with non-toxicity and compatibility for cells.

บทคัดย่อ

ชิตยาภรณ์ ต้องเรียน : การเตรียมฟิล์มพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ผสมอนุภาคนาโนควอเทอร์นารีไคโตซานที่มีเตตราไซคลินเพื่อประยุกต์เป็นวัสดุปิดแผลที่มีสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย
Preparation of Poly(vinyl alcohol) Film Blended with Quaternary Ammonium Chitosan Nanoparticles Loaded Tetracycline for Antibacterial Wound Dressing อ.ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ พิชญ์ สุภผล 56 หน้า

วัตถุประสงค์ของการศึกษางานวิจัยเรื่องนี้ คือการพัฒนาแผ่นปิดแผลจากการเตรียมฟิล์มพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ด้วยเทคนิคการหล่อแบบสารละลายและเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคด้วยอนุภาคนาโนควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโตซานที่มีองค์ประกอบของ ยาเตตราไซคลิน ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโตซานดังกล่าวถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการควอเทอร์ไนเซชัน และตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสารด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$, FTIR รวมถึงวิเคราะห์ค่าประจุของสารด้วยเทคนิค Zeta potential จากผลการทดลองพบว่า ระดับควอเทอร์ไนเซชันอยู่ในช่วง $72.0 \pm 0.3 \%$ และโมเลกุลสารมีประจุบวก 24-29 มิลลิโวลต์ การห่อหุ้มยาเตตราไซคลินในอนุภาคนาโนควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโตซานถูกเตรียมขึ้น โดยวิธีไอออนิกเจลเลชัน โดยใช้ไครพอลิฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมขวาง การโหลดยาเตตราไซคลินในอนุภาคนาโนได้รับการยืนยันจากเทคนิค FTIR, UV-vis และ XRD โดยตัวอย่างอนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีขนาดเฉลี่ย 230-800 นาโนเมตร ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มยาเตตราไซคลินในอนุภาคนาโนประมาณ 72-94 % ความสามารถการต้านเชื้อของแผ่นปิดแผลที่มีอัตราส่วนของควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโตซานและยาเตตราไซคลินที่ 1:3, 1:4 และ 1:5 กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* และ *Staphylococcus aureus* ถูกทดสอบด้วยวิธี disk diffusion (ATCC 147) และวิธี broth dilution นอกจากนี้ความเป็นพิษของแผ่นปิดแผล ได้ทำการทดสอบในเซลล์หนู (L929) และ เซลล์มนุษย์ (Human fibroblast) ด้วยการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากผลยืนยันว่าแผ่นปิดแผลที่มีอัตราส่วนของควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโตซานและยาเตตราไซคลินที่ 1:3 ให้แนวโน้มการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ 99.9 % สำหรับ *Escherichia coli* กับ *Staphylococcus aureus* และ 90 % สำหรับ *Enterococcus faecium* และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ทดสอบ

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to say sincerely thank you to Prof. Pitt Supaphol for providing valuable guidance, direction, encouragement and opportunities. Also, I am very grateful to Mr.Pongpol Ekabutr for great suggestion and helping to solve some problem of my work. I would like to appreciate for all committees, Assistant Prof. Hathaikarn Manuspiya and Dr. Pimonpun Niamlang 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 your 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 | viii |
| List of Figures | ix |
| Abbreviations | xi |
| | |
| CHAPTER | |
| I INTRODUCTION | 1 |
| | |
| II LITERATURE REVIEW | 4 |
| 2.1 Type of Wounds | 4 |
| 2.2 Principles of Wound Healing | 5 |
| 2.3 Wound Dressings and Properties | 6 |
| 2.4 Poly (Vinyl Alcohol) or PVA | 7 |
| 2.5 Chitosan | 9 |
| 2.6 Nanoparticle in Drug Delivery | 11 |
| 2.7 Tetracycline | 13 |
| | |
| III EXPERIMENTAL | 16 |
| 3.1 Materials | 16 |
| 3.2 Equipments | 18 |
| 3.3 Methodology and Characterization | 19 |
| 3.4 Statistical Analysis | 25 |

| CHAPTER | PAGE |
|---|-------------|
| IV RESULTS AND DISCUSSION | 26 |
| 4.1 Synthesis and Characterization of Quaternized Chitosan | 26 |
| 4.2 Water Solubility of Quaternized Chitosan | 29 |
| 4.3 Determination of MIC and MBC of Tetracycline | 30 |
| 4.4 Preparation of TC-loaded QCh Nanoparticles | 30 |
| 4.5 Preparation of Wound Dressing (PVA Film Blend with QCH/TC_NPs) | 35 |
| 4.6 Antibacterial Activity of Wound Dressing | 38 |
| 4.7 <i>In vitro</i> Biocompatibility of Wound Dressing | 40 |
| V CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS | 42 |
| REFERENCES | 43 |
| APPENDICES | 48 |
| Appendix A Calibration Curve of Tetracycline in Water PBS Buffer and Acetate Buffer | 48 |
| Appendix B NMR Graph, DQ (%) and Zeta Potential of Quaternized Chitosan (QCh) | 48 |
| Appendix C Size Distribution of QCh/TC Nanoparticles and QCh Nanoparticles | 53 |
| CURRICULUMVITAE | 56 |

LIST OF TABLES

| TABLE | | PAGE |
|-------|--|------|
| 4.1 | MIC and MBC of tetracycline against <i>E.coli</i> , <i>S.sureus</i> and <i>Ent.faecium</i> by broth dilution method | 30 |
| 4.2 | Encapsulation efficiency (EE %) of TC-loaded QCh nanoparticles determined by UV-vis spectrophotometry and mean particles size of QCh nanoparticles and TC-loaded QCh nanoparticles by DLS. | - 31 |
| 4.3 | Inhibition zone of wound dressing against <i>E.coli</i> , <i>Ent.faecium</i> and <i>S.aureus</i> | 38 |

LIST OF FIGURES

| FIGURES | PAGE | |
|---------|--|----|
| 2.1 | Schematic Representation of Different phases of wound healing. | 5 |
| 2.2 | Show different types and appearances of passive, interactive, and bioactive wound dressing materials. | 7 |
| 2.3 | Chemical structure of chitosan. | 10 |
| 2.4 | Chemical structure of chitin. | 10 |
| 2.5 | Schematic representation of preparation of chitosan particulate systems by ionic gelation method. | 13 |
| 2.6 | Fundamental structure of tetracycline derivatives showing the most important positions (5, 6, 7) for substitutions. | 14 |
| 2.7 | Schematic representation of the mode of action of tetracycline in sensitive cells and the possible mechanisms of resistance. | 15 |
| 4.1 | Synthesis of Quaternary ammonium chitosan (QCh). | 26 |
| 4.2 | FTIR spectra of Chitosan, Ch (a), and quaternized chitosan, QCh (b). | 27 |
| 4.3 | Show ¹ H NMR spectrum of Chitosan (I), NMTC (II) and QCh (III). | 28 |
| 4.4 | pH dependence of water solubility of chitosan and QCh. | 29 |
| 4.5 | SEM image of QCh nanoparticles (a) and TC-loaded QCh nanoparticles ratio 1:1 (b), 1:2 (c), 1:3 (d), 1:4 (e) and 1:5 (f). | 32 |
| 4.6 | FTIR of QCh, QCh nanoparticles, TC-loaded QCh nanoparticles and tetracycline (TC) for confirming of success encapsulation. | 33 |
| 4.7 | Uv-vis absorption band of solution obtained from dispersion of (a) QCh nanoparticles, QCh/TC nanoparticles of ratio (b) 1:1, (c) 1:2, (d) 1:3 and (e) tetracycline as reference. | 34 |
| 4.8 | XRD patterns of (a) QCh nanoparticles, (b-d) QCh/TC nanoparticles of ratio (8b) 1:3, (8c) 1:4, (8d) 1:5 and (e) TC. | 35 |

| FIGURES | PAGE |
|--|------|
| 4.9 shows appearance of PVA film blend with QCh nanoparticles, (4.9a) and QCh/TC nanoparticles of ratio of 1:3, (4.9b) and 1:4, (4.9c). | 35 |
| 4.10 In vitro release of TC from QCh nanoparticle of ratio QCh: TC was 1:3, 1:4 and 1:5 in difference pH media (a) PBS buffer pH 7.4, (b) Acetate buffer pH 5.5. | 37 |
| 4.11 Inhibition zone of wound dressing of ratio QCh: TC of 1:3, 1:4 and 1:5 against <i>E.coli</i> (a), <i>S.aureus</i> (b) and <i>Ent.faecium</i> (c). | 39 |
| 4.12 Show ability of wound dressing for killing bacterial <i>E.coli</i> (a), <i>Ent.faecium</i> (b) and <i>S.aureus</i> (c). | 40 |
| 4.13 MTT assay were performed to detect the toxicity effect of wound dressing of ratio (QCh: TC) 1:0, 1:3, 1:4, 1:5 and Tetracycline 2.5 mg/ml in <i>L929 cells</i> (a) and <i>FB cells</i> (b). | 41 |

ABBREVIATIONS

| | |
|--------------------|---|
| QCh | Quaternized chitosan |
| TC | Tetracycline |
| NPs | Nanoparticles |
| NTMC | N-(3-chloro-2-hydroxypropyl) trimethylammonium Chloride |
| TPP | Sodium tripolyphosphate |
| CFU | Colony forming unit |
| MIC | Minimum inhibitory concentration |
| MBC | Minimum bactericidal concentration |
| DQ | Degree of quaternization |
| EE | Encapsulation efficiency |
| PBS | Phosphate buffer solution |
| <i>L929</i> | <i>Mouse fibroblasts</i> |
| <i>FB</i> | <i>Human fibroblasts cells</i> |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>S.aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Ent.Faecium</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| FBS | Fetal bovine serum |
| SFM | Serum-free medium |