

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ  
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Phan Thị Thanh Tâm**

**CHẾ TẠO VÀ NGHIÊN CỨU ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG HỖ TRỢ  
LÀNH THƯƠNG CỦA TẦM MÀNG ĐA LỚP PCL-AG-COS TRÊN  
MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG  
TRONG BĂNG GẠC VẾT THƯƠNG**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỮU CƠ**

***TP.HCM - 2023***

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Phan Thị Thanh Tâm**

**CHẾ TẠO VÀ NGHIÊN CỨU ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG  
HỖ TRỢ LÀNH THƯƠNG CỦA TẤM MÀNG ĐA LỚP PCL-AG-COS  
TRÊN MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG  
TRONG BĂNG GẠC VẾT THƯƠNG**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỮU CƠ**  
Mã số: 8440113

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :  
PGS.TS. Nguyễn Thị Hiệp**

***TP.HCM - 2023***

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Phan Thị Thanh Tâm**

**CHẾ TẠO VÀ NGHIÊN CỨU ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG HỖ TRỢ  
LÀNH THƯƠNG CỦA TẤM MÀNG ĐA LỚP PCL-AG-COS  
TRÊN MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG  
TRONG BẢNG GẠC VẾT THƯƠNG**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỮU CƠ**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Thị Hiệp', with a long horizontal flourish extending to the right.

**PGS.TS. Nguyễn Thị Hiệp**



### LỜI CAM KẾT

Tôi xin xác nhận rằng công việc được trình bày trong luận án của tôi là hoàn toàn do tôi thực hiện, toàn bộ nội dung được hoàn thành sau khi tôi đăng ký học chương trình Thạc sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ và trước đó nó không phải là một phần của luận án hoặc bài nghiên cứu khác đã học viện hoặc bất kỳ tổ chức nào khác để lấy bằng cấp, bằng tốt nghiệp hoặc các bằng cấp khác. Nếu bất kỳ kết quả nào không chính xác, tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

TP.Hồ Chí Minh, 2023



Phan Thị Thanh Tâm



### LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi đặc biệt cảm ơn người hướng dẫn của tôi, PGS.TS. Nguyễn Thị Hiệp đã cung cấp cho tôi chủ đề thú vị này, cơ hội làm việc độc lập và những cuộc thảo luận có giá trị. Cô đã luôn tin tưởng và động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn này. Cô đã tận tình hướng dẫn tôi trong suốt thời gian nghiên cứu và viết luận văn này. Tôi cũng xin cảm ơn cô vì đã dạy tôi cách làm việc hiệu quả, cách giải quyết vấn đề và cách nghiên cứu một cách độc lập.

Tôi cũng muốn cảm ơn Học viện Hàn lâm Khoa học và Công Nghệ đã tạo điều kiện cho tôi học tập và làm việc.

Luận án này đã nhận được rất nhiều sự hướng dẫn và hỗ trợ từ các đồng nghiệp của tôi: chị Võ Hồng Phúc, anh Vũ Thanh Bình, chị Đặng Ngọc Thảo Nhi, chị Nguyễn Thị Thanh Ngọc, anh Nguyễn Văn Khiêm, và bạn Tăng Tuấn Ngạn, em Lương Đại Tín và em Nguyễn Thị Phương Thảo tại phòng thí nghiệm Kỹ thuật mô & Y học tái tạo (TERM). Sẽ không thể thực hiện được nếu không có những cá nhân hỗ trợ và hướng dẫn tôi cho việc hoàn thành luận án này.

Cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới gia đình tôi. Họ đã hỗ trợ và dành cho tôi mọi điều tốt đẹp nhất trong suốt quá trình làm luận văn. Sự hỗ trợ về tinh thần và vật chất của họ đã giúp tôi vượt qua rất nhiều khó khăn.

Đó là niềm vinh dự của tôi khi có tất cả các bạn ủng hộ tôi. Nếu không có các bạn có lẽ tôi không thể thực hiện thành công luận văn như thế này. Một lần nữa, cảm ơn bạn rất nhiều.

Trân trọng,  
Thanh Tâm

## MỤC LỤC

LỜI CAM KẾT .....	1
LỜI CẢM ƠN .....	3
MỤC LỤC.....	4
DANH MỤC HÌNH .....	7
DANH MỤC BẢNG.....	9
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	10
TÓM TẮT .....	11
GIỚI THIỆU .....	13
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN LÝ THUYẾT .....	15
1.1. Vấn đề nghiên cứu .....	15
1.1.1. Một số khái niệm quan trọng .....	15
1.1.2. Đối tượng nghiên cứu .....	15
1.2. Tình hình nghiên cứu .....	16
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	19
2.1. HÓA CHẤT .....	19
2.2. CHẾ TẠO VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT OLIGOMER CHITOSAN .....	19
2.2.1. Chế tạo Oligomer Chitosan .....	19
2.2.2. Độ đề acetyl của oligomer chitosan.....	20
2.1.1. Khối lượng phân tử (GPC) .....	20
2.1.2. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của Oligomer Chitosan .....	20
2.2. CHẾ TẠO MÀNG PCL-Ag-COS (PAC).....	21
2.2.1. Quy trình chế tạo màng.....	21
2.2.2. Chuẩn bị màng PCL-Ag (PA).....	22
2.2.3. Chuẩn bị màng PCL-Ag-POX(PAP) .....	22
2.2.4. Pha chế dung dịch COS-PVP .....	23



2.2.5.	Lớp phủ COS/ PVP trên màng PAP .....	23
2.3.	ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT MÀNG PAC .....	23
2.3.1.	Khảo sát và đánh giá hình thái bề mặt sản phẩm màng bằng thiết bị SEM .....	23
2.3.2.	Đánh giá tính chất hóa học của màng PAC .....	23
2.3.3.	Khảo sát và đánh giá tính kỵ và ưa nước của màng PAC .....	23
2.3.4.	Khảo sát và đánh giá tính chất cơ lý của màng PAC.....	23
2.3.5.	Khảo sát và đánh giá khả năng hấp thụ nước và thoát hơi nước (MVTR) của màng PAC .....	24
2.1.1.	Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích nano Ag của màng theo thời gian .....	25
2.1.2.	Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích của COS.....	25
2.1.3.	Khảo sát và đánh giá khả năng kháng khuẩn của màng PAC .....	25
2.1.4.	Khảo sát và đánh giá độc tính tế bào của màng.....	26
2.2.	KHẢO SÁT ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG HỖ TRỢ LÀNH THƯƠNG.....	26
2.2.1.	Theo dõi và đánh giá tác dụng điều trị của màng PAC quy mô phòng thí nghiệm....	26
2.2.2.	Đánh giá khả năng hỗ trợ lành thương màng PAC.....	26
2.3.	PHÂN TÍCH THÔNG KÊ .....	27
	CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1.	ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT CỦA OLIGOMER CHITOSAN.....	27
3.1.1.	Độ đề acetyl (DA) của oligomer chitosan .....	27
3.1.2.	Khối lượng phân tử.....	28
3.1.3.	Khảo sát nồng độ kháng khuẩn của COS .....	28
3.2.	ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT MÀNG PAC .....	29
3.2.1.	Hình thái của màng.....	29
3.2.2.	Đánh giá tính chất hóa học của màng.....	33
3.2.3.	Khảo sát và đánh giá tính kỵ và ưa nước của màng .....	36
3.2.4.	Khảo sát và đánh giá tính chất cơ lý của màng .....	37
3.2.5.	Khảo sát và đánh giá khả năng hấp thụ nước và tốc độ thoát hơi nước của màng.....	38
3.2.6.	Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích nano Ag của màng theo thời gian .....	39
3.2.7.	Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích của COS.....	40
3.2.8.	Khảo sát và đánh giá tính kháng khuẩn của màng.....	41

3.2.9. Khảo sát và đánh giá độc tính tế bào của màng.....	42
3.1. KHẢO SÁT ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG HỖ TRỢ LÀNH THƯƠNG.....	43
3.1.1. Tác dụng điều trị bằng màng PAC5-3 .....	43
3.1.2. Đánh giá khả năng hỗ trợ lành thương của màng PAC5-3.....	45
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	49
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ .....	48
PHỤ LỤC .....	53

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1. Cơ chế kháng khuẩn của COS dựa vào cơ chế kháng khuẩn của chitosan. ..	17
Hình 2. Mô tả quy trình chế tạo màng ba lớp PAC. ....	21
Hình 3. Kết quả H-NMR của COS. ....	27
Hình 4. Đường chuẩn PEO/PEG và kết quả GPC từ mẫu COS. ....	28
Hình 5. Kết quả khảo sát nồng độ kháng khuẩn của COS bằng phương pháp đĩa thạch (A) và đường kính trung bình của vòng kháng khuẩn (B) với 1-PCL, 2-COS 1%, 3-COS 3%, 4-COS 5%, 5-COS 7%, 6-Penicillin Streptomycin. ....	29
Hình 6. Ảnh vi mô SEM Bề mặt của các nhóm màng (A) PCL; (B) PA; (C) PAP; (D) PAC5-1; (E) PAC5-2 và (F) PAC5-3. ....	30
Hình 7. Kết quả (1) so sánh đường kính sợi trung bình và (2) độ phân bố đường kính sợi giữa các mẫu A-PCL, B-PA, C-PAP, D-PAC5-1, E-PAC5-2, F-PAC5-3; (3) Độ dày lớp phủ COS và (4) độ phủ bề mặt của COS ở 4 khoảng thời gian 6 tiếng, 12 tiếng, 18 tiếng và 24 tiếng. ....	31
Hình 8. Kết quả (A) độ dày màng PAC5-3 và (B) độ dày lớp phủ COS tại ba vị trí ngẫu nhiên. Bảng kết quả cho thấy độ dày trung bình của màng PAC5-3 và lớp phủ COS. ....	32
Hình 9. Ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của màng PA và biểu đồ phân phối kích thước đường kính AgNPs. (Thanh tỷ lệ: 200 nm, n = 50). ....	32
Hình 10. Kết quả XRD của màng PAP, PAG và PAC5-3. ....	33
Hình 11. Kết quả EDS khảo sát sự có mặt của nguyên tố C, O và Ag trên bề mặt màng PA. ....	33
Hình 12. Kết quả UV-Vis khảo sát sự có mặt của AgNPs ở thời điểm chế tạo. ....	34
Hình 13. Phổ FT-IR của PCL, POX, PVP, COS đối chiếu cùng màng PPC5 và PAC5-3. ....	35
Hình 14. Góc tiếp xúc của PCL, PA, PAP và PAC5-3. Các bức ảnh phía trên mỗi cột minh họa các giọt nước trên bề mặt màng. (dữ liệu = trung bình $\pm$ SD, n=5, *: p<0,05, ns: p>0,05). ....	36
Hình 15. Đặc tính cơ học của PCL, PA, PAP, PAC5-1, PAC5-2, PAC5-3. (data = trung bình cộng $\pm$ phương sai, số lần lặp là 3). ....	37
Hình 16. Tốc độ truyền hơi nước (A) và độ hấp thụ nước (B) của 3 nhóm màng PA, PAP và PAC5-3; với uncover-bề mặt thoáng không phủ màng (data = mean $\pm$ SD, n = 5, ns: p> 0,05, *: p< 0,05). ....	38
Hình 17. Lượng AgNPs giải phóng trong ống nghiệm từ màng PAC5-3 trong dung dịch PBS (pH=5,5). Các phân dịch được lấy sau 1, 3, 6, 12 và 24 giờ và định lượng bằng kỹ thuật ICP-MS (dữ liệu = trung bình $\pm$ SD, số lần lặp=3). ....	40
Hình 18. (A) Nồng độ phóng thích của COS trong vòng 24 giờ và (B) đường chuẩn độ hấp thụ của các nồng độ COS. ....	40
Hình 19. Hình ảnh (A) Các vùng ức chế được hình thành bởi màng (1) penicillin-streptomycin , (2) PA và (3) PCL trên chủng S. aureus,(B) Đĩa agar trải dung dịch chiết màng PCL, (C) Đĩa agar trải dung dịch chiết màng PA, (D) mẫu đối chứng trải dung dịch khuẩn nuôi t rong môi trường penicillin-streptomycin . (Thanh tỷ lệ: 10 mm, số lần lặp =4). ....	41
Hình 20. Các vùng ức chế được hình thành bởi màng (1) penicillin-streptomycin , (2)	

PAC5-3 và (3) PCL trên chủng <i>S. aureus</i> . (Thanh tỷ lệ: 10 mm, số lần lặp =4). .....	42
Hình 21. Khả năng sống (%) của nguyên bào sợi sau 24 giờ ủ ở các nồng độ khác nhau của dung dịch chiết PCL, PA, PAC5-3 và màng Betaplast Silver (dữ liệu = trung bình $\pm$ SD, n = 3, ns: p> 0,05, *: p< 0,05). .....	43
Hình 22. Kết quả H&E của da thỏ sau khi điều trị 28 ngày đối với mô hình bỏng nhiễm khuẩn SA được điều trị bằng băng gạc kháng khuẩn PAC5-3, băng gạc thương mại (Betaplast Silver) và băng gạc bình thường (cotton). (Thước đo: 10 mm) .....	44
Hình 23. Kết quả nhuộm H&E và MT của mẫu vết thương cấy khuẩn SA đắp màng PAC5-3, Betaplast silver, cotton. (Thước đo: 100 $\mu$ m). .....	46

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Mô tả thành phần và giải thích kí hiệu sử dụng trong quá trình chế tạo. ....	21
Bảng 2. Thông số chuẩn bị và liều chiếu xạ các dung dịch. ....	22
Bảng 3. Phần trăm nguyên tử, phần trăm khối lượng của C, O và Ag. ....	34
Bảng 4. Góc tiếp xúc của các nhóm màng ở thời điểm bắt đầu khảo sát và sau 60s..	36
Bảng 5. Hiệu suất kháng khuẩn của dung dịch chiết màng PA trong 24 giờ. ....	41
Bảng 6. Vùng kháng khuẩn của 3 nhóm màng penicillin-streptomycin , PAC5-3 và PCL. ....	42
Bảng 7. Thể hiện mức độ thu nhỏ vết thương ở nhóm gây nhiễm khuẩn S.A ở ngày thứ 28 ở 3 nhóm đắp màng cotton, Betaplast Silver và PAC5-3. ....	45

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

PCL:	Polycaprolactone
AgNPs:	Silver nanoparticles
COS:	Oligomer Chitosan
PVP:	Poly (N-vinyl pyrrolidone)
POX:	Poloxamer 407
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
DMEM:	Dulbecco`s Modified Eagle Media
PBS:	Phosphate-buffered saline
UV-Vis:	Ultraviolet - Visible spectroscopy
SEM:	Scanning electron microscopy
EDS:	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
XRD:	X-ray diffraction
TEM:	Transmission electron microscopy
FT-IR:	Fourier-transform infrared spectroscopy
ICP-MS:	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
MVTR:	Moisture vapor transmission rate

## TÓM TẮT

Sử dụng nguồn chitosan trong nước để tổng hợp oligomer chitosan (COS) bằng cách sử dụng quá trình oxy hóa hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) theo phương pháp chiếu xạ vi sóng. Kết quả cho thấy chitosan địa phương của Việt Nam và dẫn xuất COS của nó có hiệu suất tinh chế cao trong khi phân tử COS tạo ra trọng lượng thấp. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn dòng *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) cho thấy khả năng sử dụng như là một nguồn vật liệu kháng khuẩn tự nhiên, giảm nguy cơ hình thành chủng kháng kháng sinh. Bên cạnh kết hợp silver nanoparticles (AgNPs), giúp tăng khả năng bảo vệ vết thương khỏi tác nhân nhiễm khuẩn. Đối tượng nghiên cứu chủ yếu là màng 3 lớp kết hợp giữa tính kỵ nước ở lớp ngoài và khả năng hấp thụ nước ở mặt trong nhờ kết hợp cùng các polymer ưa nước tạo điều kiện lý tưởng trong thiết kế màng lành thương trị bỏng. Khảo sát trên mô hình *in vivo* cho thấy, khả năng lành thương tương đương với màng thương mại Betaplast Silver và nhanh hơn khi so sánh với màng Cotton. Đồng thời, cho thấy khả năng kinh tế trong sử dụng vật liệu địa phương để giảm giá thành chế tạo băng gạc nhưng vẫn có hiệu quả điều trị.





## GIỚI THIỆU

Điều trị lành thương của vết thương bỏng được xem như là vấn đề y tế toàn cầu được quan tâm, đặc biệt từ các vết thương bỏng nặng (cấp 2 và cấp 3).

Các vết bỏng nặng thường đi kèm việc nhiễm trùng do các vi khuẩn xâm nhập trong quá trình vết thương tiếp xúc với môi trường xung quanh. Từ đó, ý tưởng chế tạo băng gạc đa chức năng, kết hợp các thành phần tự nhiên kháng khuẩn cho phép việc lành thương diễn ra nhanh hơn đồng thời, cho phép ngăn cản các tác nhân gây nhiễm trùng xâm nhập, từ đó giảm thiểu tối đa việc sử dụng thuốc kháng sinh và ngăn chặn nguy cơ vi khuẩn kháng kháng sinh hình thành. Ý tưởng chính của nghiên cứu là việc sử dụng màng đa lớp ứng dụng kỹ thuật electrospinning chế tạo màng sử dụng cho băng gạc kết hợp các tác nhân kháng khuẩn nano bạc và tiềm năng kháng khuẩn của oligomer chitosan – chitosan khối lượng phân tử thấp, có khả năng hòa tan trong nước. Cả nano bạc và oligomer chitosan đều có khả năng diệt hoặc ức chế vi khuẩn. Ý tưởng kết hợp cả hai vật liệu cho phép tăng khả năng bảo vệ vết thương khỏi sự nhiễm trùng.

Dựa vào quá trình chữa lành vết thương được mô tả phía trên, băng gạc được thiết kế để hỗ trợ quá trình lành thương, đồng thời, kết hợp các tác nhân kháng khuẩn để bảo vệ vết thương khỏi quá trình nhiễm trùng. Từ đó, vấn đề làm sao để kết hợp nhiều yếu tố thiết yếu cho quá trình bảo vệ tránh nhiễm khuẩn và tăng tốc độ lành thương của băng gạc được đặt ra. Băng gạc đa lớp với lớp ngoài chứa tác nhân kháng khuẩn, đồng thời chống thấm nước tạo một lớp màng bảo vệ cho vết thương bỏng, mặt trong ứng dụng những nghiên cứu đáng chú ý gần đây cho việc ngăn chặn và chữa lành vết bỏng bởi tác nhân kháng khuẩn như oligomer chitosan phủ trên bề mặt trong băng gạc.

*Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) là dòng khuẩn gram âm có mặt trên các bề mặt da. Mặc dù vết thương viêm nhiễm cục bộ hay mãn tính được gây ra bởi nhiều lý do, thì vết thương nhiễm trùng bởi chủng *S.aureus* được xem như là một trong những trường hợp phổ biến nhất. Việc nhiễm trùng vết thương khiến vết thương chậm lành, màng sinh học (biofilm) hình thành trong quá trình viêm nhiễm khiến vết thương chậm lành và trở nên ngày một nặng hơn[1]. Việc điều trị các vết thương nhiễm khuẩn *S.aureus* dần trở nên phức tạp vì độc lực sinh ra từ vi khuẩn và dòng kháng kháng sinh. Sử dụng các nguồn tự nhiên có khả năng kháng khuẩn có thể giảm thiểu nguy cơ kháng kháng sinh của việc lạm dụng kháng sinh trong điều trị vết thương.



## CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN LÝ THUYẾT

### 1.1. Vấn đề nghiên cứu

#### 1.1.1. Một số khái niệm quan trọng

Vết thương có thể được định nghĩa là sự gián đoạn sắp xếp sinh lý của các tế bào da và rối loạn chức năng của nó trong việc kết nối và bảo vệ các mô và cơ quan bên dưới. Nó có thể là nguyên nhân chính do vô tình cắt, rách, trầy xước, áp lực, nhiệt độ quá cao, hóa chất và dòng điện, hoặc thứ phát sau can thiệp phẫu thuật hoặc bệnh (ví dụ: tiểu đường, loét hoặc ung thư biểu mô). Các tổn thương bao gồm các cấp độ như ảnh hưởng đến lớp biểu bì đến độ dày một phần (ảnh hưởng đến cả lớp biểu bì và các phần của lớp hạ bì) và độ dày toàn bộ (bao gồm cả mỡ dưới da và xương) [2].

Chữa lành vết thương là một quá trình sinh lý trong cơ thể, trong đó cơ thể sống sửa chữa các tổn thương mô, khôi phục tính toàn vẹn về mặt giải phẫu và lấy lại chức năng của các bộ phận bị thương. Một vết thương có thể được đóng lại hoặc để tự chữa lành theo cơ chế tự nhiên trong cơ thể, quá trình chữa lành xảy ra thông qua một loạt các sự kiện chồng chéo và bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố bên trong và bên ngoài [3].

#### 1.1.2. Đối tượng nghiên cứu

Chitin là polysaccharid phổ biến thứ hai trong tự nhiên sau cellulose. Quá trình deacetyl hóa một phần chitin thúc đẩy quá trình thu được chitosan và sự khác biệt giữa chúng là ở nhóm acetyl. Chitin bao gồm chủ yếu đơn vị của N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), trong khi chitosan bao gồm chủ yếu D-glucosamine (GlcN). Các đơn vị cơ bản hình thành cấu trúc chitin và chitosan liên kết với nhau bởi liên kết  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic [4]. Chitosan là một oligomer với liên kết  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-glucosamine có thể được điều chế từ quá trình deacetyl hóa và thủy phân chitin, thường được tìm thấy chủ yếu trong bộ xương ngoài của động vật giáp xác và côn trùng, ngoài vi khuẩn, giới nấm và nấm.

Nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng chitosan như là polymer sinh học có tính tương hợp sinh học cao, có khả năng phân hủy sinh học và không gây độc tế bào. Đánh giá tính chất của oligomer chitosan chủ yếu dựa vào khối lượng phân tử và độ deacetyl hóa, liên quan đến tỷ lệ giữa GlcNAc và GlcN. Hầu hết các sản phẩm chitosan trên thị trường có khối lượng phân tử từ 50-2000 kDa, với độ deacetyl từ 80-90%. Dựa vào khối lượng phân tử, chitosan có thể được nhóm thành 3 nhóm chính: khối lượng phân tử thấp (<100 kDa), khối lượng phân tử trung bình (100–1000 kDa), và khối lượng phân tử cao (>1000 kDa) [4]. Tuy nhiên, chitosan không tan trong nước giới hạn khả năng ứng dụng của nó. Từ đó, nhiều nghiên cứu tăng khả năng hòa tan trong nước của chitosan bằng cách thay đổi cấu trúc hoặc tạo ra các dẫn xuất của chitosan. Chitosan oligomer (COM) còn được gọi là chitoooligomer hoặc chitosan oligosaccharide, được định nghĩa là chitosan có mức độ trùng hợp dưới 20 và trọng lượng phân tử trung bình dưới 3900 Da (thường là 0,2–3,0 kDa).

Cơ chế kháng khuẩn của oligomer chitosan vẫn còn chưa rõ. Tuy nhiên, nhiều giả thuyết rằng bản chất kháng khuẩn tương tự chitosan, trong đó polycation dưới pH 6,5 là một yếu tố quyết định. Điện tích dương trong chuỗi tương tác với các thành phần tích điện âm trong màng tế bào vi sinh vật, làm thay đổi tính chất rào cản của chúng và do đó ngăn cản sự xâm nhập của các chất dinh dưỡng hoặc gây rò rỉ các chất bên trong tế bào. Do các điện tích dương của nó, chitosan cũng có thể tương tác với phần âm của màng tế bào, điều này có thể dẫn đến sự tái tổ chức và mở các protein liên kết chặt chẽ, giải thích đặc tính tăng cường thẩm thấu của nó [5]. Hai cơ chế chính đã được báo cáo trong tài liệu để giải thích các hoạt động kháng khuẩn và kháng nấm của chitosan. Trong

cơ chế đầu tiên được đề xuất, chitosan tích điện dương có thể tương tác với các nhóm tích điện âm trên bề mặt tế bào và do đó làm thay đổi tính thấm của nó. Điều này sẽ ngăn cản các vật liệu thiết yếu xâm nhập vào tế bào và dẫn đến rò rỉ các chất hòa tan cơ bản ra khỏi tế bào. Cơ chế thứ hai liên quan đến sự liên kết của chitosan với DNA của tế bào (vẫn thông qua các nhóm amin được proton hóa), điều này sẽ dẫn đến sự ức chế quá trình tổng hợp RNA của vi sinh vật. Trên thực tế, đặc tính kháng khuẩn của chitosan có thể là kết quả của sự kết hợp của cả hai cơ chế. Thách thức chính của nghiên cứu này là đánh giá được độ an toàn và khả năng hỗ trợ lành thương của COS. Do thành phần chính chủ yếu được làm từ PCL, một loại polyester thiếu các nhóm chức năng hoạt động, màng PCL-Ag có bề mặt kỵ nước, không thể tương tác với các thành phần phủ ưa nước về mặt vật lý hoặc hóa học. Để khắc phục vấn đề này, poloxamer 407 (POX) được chọn làm ‘chất keo’ để kết hợp màng PCL tích hợp AgNPs với lớp phủ COS-PVP. Là polyme triblock có khối kỵ nước trung tâm của polypropylen glycol và hai khối ưa nước khối polyethylene glycol, POX có thể kết nối với cả PCL và COS-PVP cùng lúc và giữ chúng như một khối thống nhất. Sau đó, dung dịch COS-PVP được phủ lên lớp trung gian để thu được sản phẩm màng đa lớp. Với lớp kỵ nước có thành phần AgNPs giúp bảo vệ vết thương khỏi bị nhiễm khuẩn và các tác nhân nhiễm khuẩn từ bên ngoài, đồng thời lớp trong cùng cho phép thấm hút tốt và sử dụng COS như một hợp chất tự nhiên lành tính có khả năng hỗ trợ lành thương nhưng đồng thời cũng là tác nhân kháng khuẩn giúp bảo vệ vết thương khỏi sự nhiễm trùng trong quá trình lành thương. Từ đó, giả thiết giúp vết thương lành nhanh và giảm nguy cơ viêm nhiễm được đặt ra trong luận văn này.

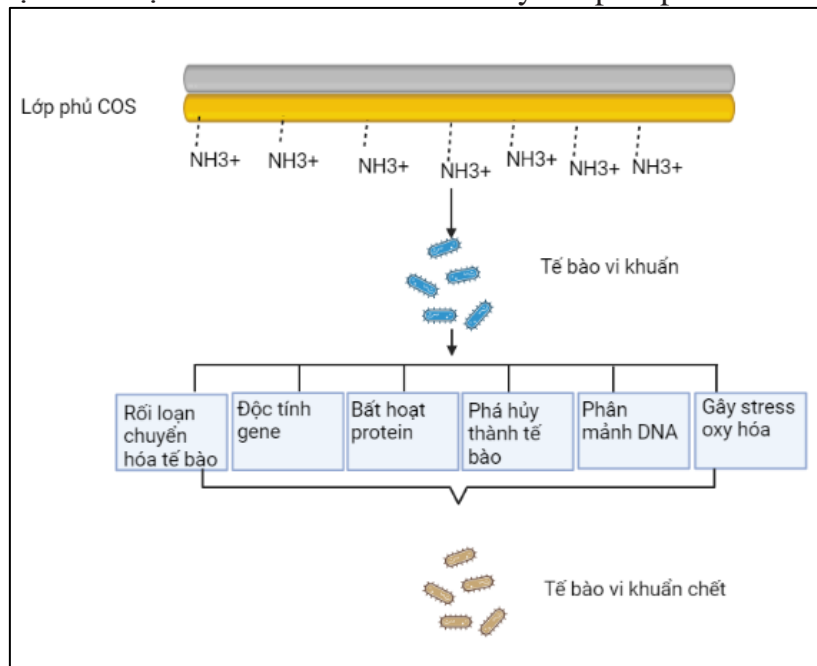
## 1.2. Tình hình nghiên cứu

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy tính khả thi sử dụng màng chitosan để chữa lành các vết thương bỏng. Các vết thương có khả năng lành tự nhiên, nhưng có những người bị rối loạn dẫn đến giảm khả năng tự chữa lành vết thương, chẳng hạn như bệnh nhân tiểu đường có thể phát triển thành mãn tính, vết thương không lành khiến bệnh nhân đau đớn và chịu đựng trong thời gian dài [5]. Trong những trường hợp như vậy, cần có thời gian điều trị dài, điều này cũng sẽ làm tăng chi phí liên quan đến chăm sóc y tế tiên tiến. Do đó, trọng tâm là các chất trị liệu tự nhiên có thể đẩy nhanh quá trình chữa lành vết thương và đồng thời có thể dễ dàng tiếp cận với người dân giúp giảm chi phí điều trị, và chitosan dường như đáp ứng tất cả các điều kiện này. Chitosan đẩy nhanh quá trình chữa lành vết thương bằng cách kích thích các tế bào viêm, đại thực bào và nguyên bào sợi, do đó thúc đẩy giai đoạn viêm. Bằng cách này, giai đoạn viêm diễn ra nhanh hơn và giảm nhanh, giai đoạn tăng sinh bắt đầu sớm hơn trong quá trình chữa lành vết thương<sup>5</sup>. Màng chitosan với oleic acid và glycerol 1% đã được chuẩn bị trước đó. Các màng chitosan này có hình thái phù hợp và được sử dụng nghiên cứu *in vivo* với chuột Wistar® cho thấy màng chitosan được cấy ghép tương thích sinh học và có khả năng hấp thụ sinh học giúp mô khỏe mạnh. Từ kết quả khảo sát này, màng chitosan có thể cho phép sử dụng chúng để chữa lành vết thương [6].

Trong một nghiên cứu khác cho thấy, kết hợp giữa màng polysulfone(PSF) và chitosan cho thấy tăng khả năng kháng khuẩn, trong đó màng PSF- chứng minh khả năng kháng khuẩn khoảng  $10^5$  cells/ml trong vòng 18 giờ, các cơ chế có thể bao gồm phá vỡ thành tế bào vi khuẩn và màng tế bào, thải ra một lượng nhỏ cation kim loại sắt, tương tác với các mục tiêu nội bào và lắng đọng trên vi khuẩn[7].

Cơ chế có thể giải thích cho khả năng kháng khuẩn bao gồm việc phá vỡ thành tế bào vi khuẩn và màng sinh chất, các tương tác với các mục tiêu gắn ngoài bề mặt màng và phá hủy tế bào vi khuẩn.

Vi khuẩn thường được chia làm 2 nhóm chính: vi khuẩn gram âm và vi khuẩn gram dương dựa theo kết quả nhuộm gram. Thành tế bào của vi khuẩn gram âm gồm lớp ngoài là màng tế bào và thành peptidoglycan. Lớp ngoài bào gồm 2 đơn lớp không cân xứng. Lớp bên trong chỉ bao gồm phospholipid, trong khi lớp ngoài bao gồm phospholipid và lipopolysaccharide. Bề mặt của vi khuẩn gram âm được tích điện âm do các nhóm phosphate và pyrophosphates của lipopolysaccharides ở lớp ngoài. Thành tế bào của vi khuẩn gram dương bao gồm peptidoglycan và teichoic acids (Hình 1). Bề mặt của vi khuẩn gram dương được tích điện âm do các nhóm carboxyl và phosphate của teichoic acids.



Hình 1. Cơ chế kháng khuẩn của COS dựa vào cơ chế kháng khuẩn của chitosan.

Khi COS được hòa tan trong dung dịch nước có tính acid, các nhóm  $\text{NH}_2$ - được proton hóa thành cation  $-\text{NH}_3^+$ [8]. Giả thiết phù hợp nhất cho khả năng kháng khuẩn là các nhóm polycationic ( $-\text{NH}_3^+$ ) tự nhiên vì có sự có mặt của gốc amine từ nhóm glutamine. Tính chất quan trọng này giả thích cho khả năng bám vào những thành phần mang điện tích âm trên bề mặt của vi khuẩn. Việc bám dính này cho phép kích hoạt nhưng thay đổi trên bề mặt tế bào dẫn đến sự rò rỉ tế bào chất dẫn đến sự chết tế bào[9], teichoic acid và lipopolysaccharide trong vi khuẩn gram âm cho phép chitosan bám vào và phá hủy bề mặt tế bào vi khuẩn, tạo ra cơ chế diệt khuẩn.

Perinelli và đồng nghiệp đặt giả thiết rằng chitosan bám vào DNA của vi khuẩn dẫn đến ức chế quá trình phiên mã của mRNA cũng như là tương tác với bề mặt tế bào. Je và Kim (2006) đề xuất một giả thiết rằng cơ chế kháng khuẩn của chitosan là bám lên màng tế bào và phá hủy từ đó thay đổi chức năng màng tế bào dẫn đến sự vỡ màng tế bào[10]. Trong một nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của khối lượng trung bình của chitosan (90-300 kDa) đối với khả năng diệt khuẩn của nhóm khuẩn gram âm trên cá nước ngọt cho thấy: ở nồng độ 0.8% (w/v) của chitosan là điều kiện cần và đủ của cho ức chế sự phát triển của *areomonas hydrophila*, khảo sát tương tự, cho thấy 0.4% chitosan là điều kiện cần để ức chế sự phát triển của *flavobacterium columnare* và *edwardsiella ictaluri*. Giả thuyết đặt ra rằng sự có mặt của các nhóm mang điện tích âm và bề mặt kỵ nước của vi khuẩn là nguyên nhân dẫn đến sự tương tác ức chế vi khuẩn của chitosan [11]. Một nghiên cứu khác của Chung và cộng sự (2014) chỉ ra rằng nhóm khuẩn thể hiện các nhóm mang

điện tích âm trên bề mặt sẽ liên kết tốt hơn với các polycationic của chitosan [12].

Trong số các mô hình màng lành thương khác nhau, màng chitosan đã được phát triển thành băng gạc cho chấn thương và/hoặc vết thương mãn tính do đặc tính cầm máu, hoạt động kháng khuẩn và phản ứng chống viêm [13][14]. Khi vết thương xảy ra, tiểu cầu sẽ được kích hoạt và tập hợp lại tại vị trí vết thương để cầm máu như là cơ chế để chữa lành vết thương, được gọi là giai đoạn cầm máu. Ở điều kiện vết thương điển hình ( $\text{pH} < 7$ ), màng dựa trên chitosan có khả năng hấp thụ một lượng lớn dịch tiết vết thương và từ màng sên sệt và/hoặc hydrogel có đặc tính bám dính mạnh vào mô bị tổn thương để cầm máu [15]. Trong một nghiên cứu lâm sàng, gạc chitosan đã được sử dụng làm chất cầm máu trên 75 bệnh nhân bị chấn thương [16]. Kết quả cho thấy thời gian lành vết thương trung bình tương đương với thời gian băng vết thương thương mại, hỗ trợ dữ liệu mô học *in vivo* về khả năng của chitosan trong việc tạo ra huyết khối ở bề mặt vết thương và thúc đẩy quá trình đông máu thông qua kích hoạt tiểu cầu.

Một nhược điểm lớn làm hạn chế việc ứng dụng rộng rãi chitosan là nó không hòa tan trong dung dịch nước. Điều này là do các liên kết hydro ngoài phân tử tạo thành cấu trúc tinh thể. Tuy nhiên, nó hòa tan trong dung dịch axit ở độ pH không lớn hơn 6. Axit acetic là axit được sử dụng phổ biến nhất cho mục đích này. Các biến đổi hóa học của chitosan là lựa chọn thay thế để cải thiện các đặc tính được ứng dụng trong lĩnh vực rộng hơn. Các nhóm chức năng quan trọng nhất có khả năng biến đổi chitosan là nhóm amine ( $-\text{NH}_2$ ). Chitosan oligosaccharide được xem như là một giải pháp để giữ nhóm amine nhưng đồng thời có khả năng hòa tan trong nước.

Bên cạnh chitosan, các hạt nano bạc (AgNPs) đã cho thấy hiệu quả trong hoạt động kháng khuẩn và việc cung cấp các hạt nano này ở dạng bào chế rắn sử dụng sợi PEO/chitosan hòa tan trong nước giúp cải thiện hơn nữa khả năng kháng khuẩn. Việc kết hợp các hạt nano bạc vào sợi quay điện thường là một quá trình gồm hai bước với việc sử dụng các hóa chất độc hại làm chất khử và để cải thiện sự phân tán trong dung dịch polymer. Các nghiên cứu đã chứng minh quy trình một bước để sản xuất sợi Ag-PEO/chitosan từ chiếu xạ tia cực tím của dung dịch quay điện bạc nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) [17]. Các hạt nano Ag có kích thước trung bình  $3.5 \pm 0.6$  nm được phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua được phân tán đồng nhất trong sợi PEO/chitosan (đường kính  $\sim 250$  nm đến 350 nm) cũng như trên bề mặt sợi. Độ bền kéo trung bình của sợi Ag-PEO/chitosan dao động từ  $5.50 \pm 0.19$  MPa đến  $7.54 \pm 0.74$  MPa, tùy thuộc vào nồng độ  $\text{AgNO}_3$  trong dung dịch [18]. Ngoài ra, sự giải phóng ion Ag trong ống nghiệm cho thấy tốc độ giải phóng nhanh về nồng độ ion Ag lúc 10 giờ, sau đó giải phóng chậm và cuối cùng đạt đến trạng thái ổn định ở 72 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được thực hiện trên *S. aureus* gram dương và *E. coli* gram âm bằng phương pháp trải đĩa thạch. Kết quả cho thấy vùng ức chế tăng gấp 1.9 lần và 3.4 lần từ sợi Ag-PEO/chitosan trên *S. aureus* và *E. coli* so với sợi PEO/chitosan. Những sợi này được đánh giá bằng các thử nghiệm về độc tính tế bào bằng cách sử dụng tế bào nội mô chậu của lợn và kết quả cho thấy khả năng sống sót của tế bào là trên 90% sau 24 giờ nuôi cấy. Nghiên cứu này không chỉ cung cấp quy trình một bước trong việc kết hợp các hạt nano Ag vào sợi chitosan mà còn đề xuất nhiều loại tác nhân hóa học và sinh học tương thích với sợi PEO/chitosan. Từ các nghiên cứu đã khảo sát, cho thấy việc kết hợp giữa 2 tác nhân kháng khuẩn COS và AgNPs cho phép đặt giả thuyết về việc sự kết hợp này làm tăng khả năng kháng khuẩn, đặt biệt các kết quả từ liệu tham khảo cho thấy tiềm năng trong việc hỗ trợ lành thương.

Do khả năng chế tạo màng của chitosan kém, do không tan trong nước nên dung

dịch polymer pha trộn của chitosan và các copolymer khác thường được điều chế để sản xuất sợi chitosan gây mất thời gian và quá trình phức tạp. Việc lựa chọn loại chitosan đóng vai trò chính trong việc xác định các đặc tính của sợi do tỷ lệ pha trộn thể tích của polymer và do đó, có thể làm giảm khả năng tương thích sinh học (độc hại) và độ ổn định (phân hủy sinh học) của sợi. Để khắc phục vấn đề này, một dẫn xuất ưa nước của chitosan, oligomer chitosan (COS) đã được sử dụng để cải thiện khả năng trộn lẫn với copolymer (tức là PVP), là một polymer hòa tan trong nước có đặc tính tạo màng. Trong luận văn này, nghiên cứu giải phóng *in vitro* từ sợi phủ COS-PVP. Các thử nghiệm về khả năng sống sót *in vitro* sử dụng tế bào L929 và đánh giá trên mô hình chuột *in vivo* về tỷ lệ đóng vết thương cho thấy diện tích vết thương. Công trình này đề xuất sự kết hợp của nano bạc (AgNPs) và đối tượng khảo sát dựa trên dòng vi khuẩn *S.aureus*.

Sử dụng phương pháp phun kéo sợi điện trường là một phương pháp đơn giản, linh hoạt để sản xuất sợi có đường kính từ vài micromet đến nanomet [19]. Nguyên lý của phương pháp phun kéo sợi điện trường là sử dụng điện trường mạnh (ví dụ: 1 ~ 4 kV/cm) để hút các sợi rỗng từ dung dịch polymer. Trước khi chế tạo, dung dịch polymer được chuẩn bị với các đặc tính dung dịch thích hợp (ví dụ: độ nhớt, độ dẫn điện, sức căng bề mặt và độ bay hơi của dung môi). Trong quá trình chế tạo, điện trường ứng dụng cần phải vượt qua sức căng bề mặt của dung dịch polymer (hình nón Taylor), nơi tạo ra các chuỗi sợi mịn và theo sau là sự bay hơi dung môi trước khi hạ xuống bộ thu sợi. Sản phẩm thu được là một tấm thảm sợi mịn và dày đặc, ở dạng cấu trúc sợi không dệt hoặc được căn chỉnh tương ứng bằng cách sử dụng bộ thu sợi cố định. Nhiều người đã xem xét ảnh hưởng của các thông số quay điện lên cấu trúc sợi thu được với mục đích tối ưu hóa các điều kiện quay điện [20]-[21].

## CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. HÓA CHẤT

Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL, Mn 80,000), poloxamer 407, và dimethyl sulfoxide (DMSO), poly (N-vinyl pyrrolidone) (PVP) được mua từ Sigma-Aldrich Co. Ltd., Dorset Gillingham, UK. Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\geq 99\%$ ), acetone (AC,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , 99.5%), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (v/v), và ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) được mua bởi Xilong Chemical Co., Ltd. (China). Low viscosity chitosan với khối lượng phân tử khoảng 270 kDa được mua từ Vietnam Food JSC, Vietnam. Mueller Hinton Broth (M391-500G) được mua từ Hi-Media (India). The pathogen, such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25913) được cung cấp bởi the Marine Laboratory, International University-HCM Vietnam National University (Vietnam). Mouse fibroblast L929 cell line được rã đông và nuôi cấy trong dulbecco's modified eagle media (DMEM, Gibco, USA) bổ sung 10% fetal bovine serum (Gibco, USA) và 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA). Tất cả các hóa chất đều đạt tiêu chuẩn phân tích và được sử dụng trực tiếp mà không cần tinh chế thêm.

### 2.2. CHẾ TẠO VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT OLIGOMER CHITOSAN

#### 2.2.1. Chế tạo Oligomer Chitosan

Phương pháp chuẩn bị được mô phỏng và thay đổi dựa theo phương pháp của Vinh và cộng sự [22], [23]. Bột chitosan được pha ở ba nồng độ (1%, 3%, 5% và 7%) với 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ở 30°C trong 10 phút. Hỗn hợp (HH) sau đó được đặt vào lò vi sóng ở mức 400W trong vòng 3 phút, sau đó để hạ nhiệt ở nhiệt độ phòng. Ethanol 99% sau đó được thêm vào HH với tỷ lệ 3:1 (ethanol: HH). Máy cô quay chân không Buchi Rotavapor R-300 loại bỏ dung môi thừa thu được cặn tủa. Phần cặn tủa thu được, được loại bỏ nước bằng

máy đông khô (LABCONCO) thu được oligomer chitosan dạng bột.

### 2.2.2. Độ deacetyl của oligomer chitosan

Phổ 1H-NMR của được đo bằng cách sử dụng 1H-NMR ở trạng thái lỏng (400 MHz,  $\delta$  tính bằng ppm, Bruker Avance-400 MHz FT-NMR (Bruker Corp, Billerica, MA, USA). Các mẫu chitosan đã được hòa tan trong DMSO/DCl<sub>2</sub> và được lọc trước khi đo NMR. Sau đó, độ deacetyl hóa của được tính toán dựa trên phương trình sau:

$$DD(\%) = \left( 1 - \frac{\frac{1}{3}A_2}{\frac{1}{6}A_1} \right) \times 100$$

trong đó A<sub>1</sub> là giá trị tích phân proton của các vị trí C2–C6 trên vòng đường, là diện tích trung bình đo được trong khoảng  $\delta$  3–6 ppm, và A<sub>2</sub> là giá trị tích phân proton của ba proton N-acetyl của N-acetyl glutamide ở khoảng  $\delta$  2 ppm.

#### 2.1.1. Khối lượng phân tử (GPC)

Khối lượng phân tử của oligomer chitosan và chitosan được đo bằng Gel Permeation Chromatography (GPC) (Shimadzu/LC-10ADvp, Kyoto, Japan) với refractive index detector RID-10A. Hệ thống sử dụng nước làm pha động. Tất cả các mẫu đều hòa tan ở 1,5 mg/mL trong 0,3 M acetic acid và 0,2 M sodium acetate, mẫu sau đó được lọc trước khi đo GPC với tốc độ dòng 0,8 mL/ phút ở 40°C với thể tích mẫu là 20  $\mu$ L. Chuẩn EasiVial PEO/PEG với khối lượng phân tử từ 1,42 đến 1220 kDa đã được sử dụng để hiệu chuẩn OHPak SB-804 HQ columns (dimension 8 mm  $\times$  300 mm).

#### 2.1.2. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của Oligomer Chitosan

Trong thí nghiệm khảo sát tính kháng khuẩn, phương pháp khuếch tán thạch được áp dụng để xác định khả năng kháng khuẩn lên dòng vi khuẩn có khả năng gây nhiễm trùng trên da *S. aureus*. Các bước thực nghiệm như sau:

Bước 1: Chuẩn bị:

- Chuẩn bị mẫu: Mẫu đối chứng (kháng sinh penicillin-streptomycin) và mẫu cần kiểm tra (1%, 3% và 5%, 7%).

- Chuẩn bị vi khuẩn :

Dòng vi khuẩn thử đông gồm *S. aureus* được đưa vào tủ ủ 37 °C khoảng 2 phút, sau đó lập tức cho vào 20 ml dung dịch Mueller Hinton và ủ ở 37 °C trong vòng 24 giờ. Sau đó, dung dịch này được cấy lên đĩa thạch Mueller Hinton và ủ 37 °C trong vòng 24 giờ để cho vi khuẩn mọc thành từng cụm khuẩn lạc và được trữ trong tủ mát 4 °C tối đa 1 tháng. Tiếp theo, lấy 1 cụm khuẩn lạc trên đĩa thạch cho vào ống nghiệm có chứa 20 ml môi trường Miller Hinton ủ 37 °C. Sau 24 giờ, dung dịch có vi khuẩn phát triển sẽ được pha loãng xuống nồng độ tương đương 10<sup>8</sup> CFU/ml (Theo tiêu chuẩn Mc Farland, độ đục của dung dịch vi khuẩn ở bước sóng 625 nm trong khoảng 0,08-0,1 ứng với nồng độ 10<sup>8</sup> CFU/ml).

Bước 2: Thực nghiệm:

- Trải dung dịch vi khuẩn lên bề mặt đĩa thạch: 150  $\mu$ l dung dịch vi khuẩn (10<sup>8</sup> CFU/ml) trải lên đĩa thạch Mueller Hinton. Để khô các mặt của đĩa thạch trước khi đặt mẫu giấy lọc thấm ở các nồng độ (1%, 3%, 5%, và 7%).

- Đặt các mẫu được chuẩn bị sẵn lên đĩa thạch (3 mẫu được đặt lên 1 đĩa thạch) và ủ 37 °C trong vòng 24 giờ.

Bước 3: Thu và phân tích dữ liệu:

- Sau 24 giờ, các đĩa thạch được lấy ra khỏi tủ ủ và tiến hành đo kích thước vòng kháng khuẩn (dùng thước đo từ mặt sau của đĩa và không được mở nắp) của các chủng



vi khuẩn.

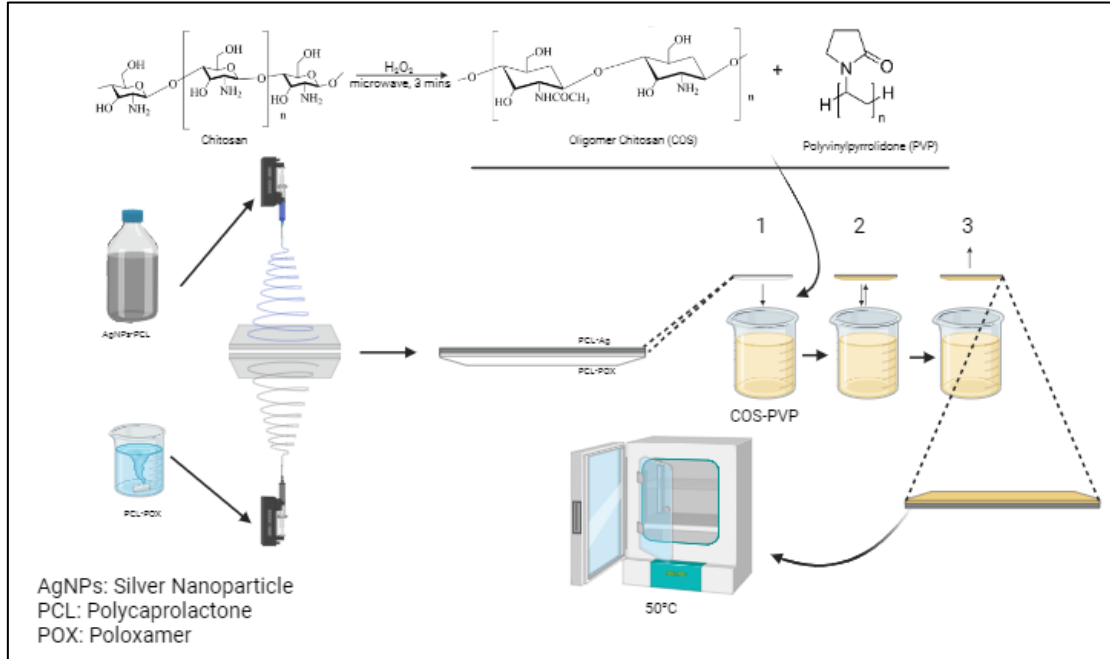
- Chụp lại các hình bằng máy Canon EOS75.

- Ảnh vòng kháng khuẩn sẽ được xử lý bằng phần mềm ImageJ để phân tích và tính toán kích thước vòng kháng khuẩn.

Bước 4: Lặp lại thí nghiệm và thống kê dữ liệu, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

## 2.2. CHẾ TẠO MÀNG PCL-Ag-COS (PAC)

### 2.2.1. Quy trình chế tạo màng



Hình 2. Mô tả quy trình chế tạo màng ba lớp PAC.

Bảng 1. Mô tả thành phần và giải thích kí hiệu sử dụng trong quá trình chế tạo.

Mô tả	Kí hiệu	Thành phần			
		PCL	Ag	POX	PVP-COS
Màng PCL chứa PCL-Ag- $\gamma$ 0,02% (w/w)	PA	X	X	-	-
Lớp màng chỉ có PCL-POX	PP	X	-	X	-
Màng 2 lớp với lớp trên là PA, lớp dưới là PCL-POX	PAP	X	X	X	-
Màng 3 lớp với 2 lớp màng PA-PAP, sau đó được phủ lớp PVP-COS bề mặt	PAC	X	X	X	X

Màng 3 lớp PAC phủ COS khảo sát sau 12 tiếng	PAC5-1	X	X	X	
Màng 3 lớp PAC phủ COS khảo sát sau 18 tiếng	PAC5-2	X	X	X	X
Màng 3 lớp PAC phủ COS khảo sát sau 24 tiếng	PAC5-3	X	X	X	X

Màng PA và PP được chế tạo bằng phương pháp phun kéo sợi điện trường, các bước chuẩn bị như sau được mô tả ở Hình 3: 45 mL dung dịch AgNPs-PCL được phun đồng thời bằng ba ống tiêm nằm ngang ở điện áp 15 kV và tốc độ dòng 2,5 mL/h vào xi lanh quay ở khoảng cách 10 cm. Các thông số quay điện tối ưu đã được xác định trước để đáp ứng tiêu chí sợi đồng nhất, không hạt và hiệu suất thu gom cao nhất. Sau đó, 45 mL dung dịch PCL-POX tiếp tục được sử dụng cho lớp màng thứ 2 ở cùng điều kiện chế tạo.

### 2.2.2. Chuẩn bị màng PCL-Ag (PA)

Chuẩn bị dung dịch Ag 10% (w/v): được pha từ muối bạc nitrate trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO) theo các bước như sau:

+ Bước 1: Hòa tan 1g muối AgNO<sub>3</sub> hoàn toàn trong 10 ml dung dịch DMSO.

+ Bước 2: Khuấy từ hỗn hợp ở nhiệt độ 40 °C trong 2 tiếng để thu được dung dịch đồng nhất trong suốt.

+ Bước 3: Dung dịch được đậy chặt và bọc kín bằng giấy thiếc để tránh sự bay hơi của dung môi cũng như tác động của ánh sáng.

Chuẩn bị dung dịch PCL-Ag-gamma ( $\gamma$ ) 0,02% (w/v):

Bước 1: 2 L dung dịch 12% PCL được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoàn toàn 240 g PCL trong 2 L dung môi acetone (AC) và khuấy từ ở nhiệt độ 50 °C đến khi tan hoàn toàn. Dung dịch 12% PCL-AC sẽ được chia ra 2 phần bằng nhau về thể tích (1000 ml).

Bước 2: Các thể tích dung dịch Ag 10% (w/w) sẽ được thêm vào từng phần dung dịch 12% PCL-AC để thu được nồng độ tương ứng (Bảng 2).

*Bảng 2. Thông số chuẩn bị và liều chiếu xạ các dung dịch.*

	Thể tích dung dịch Ag 10% (ml)	Thể tích dung dịch 12% PCL-AC (ml)	Liều chiếu xạ (kGy)
PCL-Ag- $\gamma$ 0,02% (w/w)	5,00	995,00	25,00

+ Bước 3: Dung dịch PCL-Ag- $\gamma$  0,02% (w/w) (PA) được bảo quản trong các lọ thủy tinh đậy chặt và bọc trong màng nhôm để tránh sự bay hơi của dung môi cũng như tránh bị ánh sáng khử các ion bạc.

### 2.2.3. Chuẩn bị màng PCL-Ag-POX(PAP)

Dung dịch PCL-POX (PP) thu được bằng cách hòa tan bột polixamer 407 (POX)

trong dung dịch PCL 12% (w/v) (ở tỷ lệ POX: PCL là 1:12 (w/w)). Tiếp theo, 15 mL PCL-POX được quay điện tạo lớp 2 trên màng PCL-Ag 0,02% (w/w) với các thông số tương tự.

#### **2.2.4. Pha chế dung dịch COS-PVP**

Dung dịch được chuẩn bị theo phương pháp đã được mô tả. Đầu tiên, bột COS 5% được ngâm hoàn toàn nước cất. Dung dịch chứa 6% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) thu được bằng cách hòa tan 36 g PVP trong 600 ml trong dung dịch COS ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. PVP được thêm vào dung dịch được để tăng tính thấm của trên bề mặt màng.

#### **2.2.5. Lớp phủ COS/ PVP trên màng PAP**

Đầu tiên, màng PAP được chuẩn bị ở dạng miếng vuông có kích thước 10 x 10 cm<sup>2</sup>. Sau đó, dung dịch COS-PVP được trải đều trên khay đựng dung dịch kích thước 1,2 x 1,2 m<sup>2</sup>. Cùng lúc 12 màng PAP được nhúng vào và khảo sát ở các khoảng thời gian khác nhau (6 tiếng, 12 tiếng, 18 tiếng và 24 tiếng). Sau đó, màng được đặt vào tủ sấy ở 50 °C cho đến khi màng khô hoàn toàn trước khi thêm một lớp dung dịch phủ khác. Quá trình nhúng màng vào được lặp lại liên tục cho đến khi dung dịch phủ đều bề mặt. Số lượng nhúng sẽ được khảo sát bằng phương pháp chụp kính hiển vi điện tử quét (SEM). Cuối cùng, màng được khử trùng bằng ethylene oxide (EO) và được bảo quản trong túi kín tối màu ở nhiệt độ phòng cho các thí nghiệm sau này.

### **2.3. ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT MÀNG PAC**

#### **2.3.1. Khảo sát và đánh giá hình thái bề mặt sản phẩm màng bằng thiết bị SEM**

Các màng PA, PAP và PAG (1 x 1 cm<sup>2</sup>) được phủ vàng (JEOL Smart Coater, Nhật Bản) trong 60 giây trước khi quan sát hình thái bề mặt. Sau đó, máy SEM (JSM-IT100, JEOL, Japan) với điện áp gia tốc 10 kV được sử dụng để đánh giá bề mặt của màng. Đường kính sợi và kích thước lỗ của màng được phân tích bằng phần mềm ImageJ (NIH, Hoa Kỳ). TEM được áp dụng để chụp ảnh AgNPs được tích hợp với sợi PCL và đường kính của AgNPs được tính bằng ImageJ.

#### **2.3.2. Đánh giá tính chất hóa học của màng PAC**

Cấu trúc hóa học của màng được thể hiện qua phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR, Spectrum GX, PerkinElmer Inc., Hoa Kỳ) số sóng 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>. Các màng được kiểm tra sự hiện diện của pha tinh thể Ag trên màng bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD, D8 Advance, Bruker) ở bức xạ Cu K<sub>α</sub>, bước nhảy 0,02 độ, thời gian 0,5 giây tại Trung tâm Nghiên cứu Vật liệu Cấu trúc Nano và Phân tử. Biểu đồ phân bố kích thước được vẽ từ dữ liệu lấy được để đánh giá tính đồng nhất của AgNPs tổng hợp. EDS được sử dụng để đo tỷ lệ nguyên tố Ag trên bề mặt màng. Phương pháp đo phổ hấp thụ phân tử UV-Vis được áp dụng để đánh giá sơ bộ sự tạo thành của nano Ag cũng như sự đồng đều về phương diện kích thước của chúng.

#### **2.3.3. Khảo sát và đánh giá tính kỵ và ưa nước của màng PAC**

Khoảng 10 μL nước cất được nhỏ lên bề mặt màng PA, PAP và PAC5-3 bằng micropipette. Sự thay đổi hình dạng giọt nước trong thời gian thử nghiệm được ghi lại bởi bộ góc tiếp xúc bao gồm máy ảnh DSLR (Canon) và hệ thống bộ đỡ. Góc tiếp xúc của hình ảnh được ghi lại được phân tích bằng phần mềm ImageJ (NIH, Hoa Kỳ).

#### **2.3.4. Khảo sát và đánh giá tính chất cơ lý của màng PAC**

Mẫu màng PA và PAP và PAC5-3 được cắt thành các hình chữ nhật với kích thước 3 cm x 1 cm. Sử dụng SEM đo độ dày của các màng. Các mẫu sau đó được mang đi đo độ bền kéo đứt, độ biến dạng đứt và lập giản đồ ứng suất kéo giãn (TA.XTplus, Stable Micro System, UK). Thí nghiệm được lặp lại 5 lần cho mỗi mẫu.

### 2.3.5. *Khảo sát và đánh giá khả năng hấp thụ nước và thoát hơi nước (MVTR) của màng PAC*

Thử nghiệm được thực hiện thủ công dựa trên tiêu chuẩn thử nghiệm BS EN 13726– 1:2002[24].

Khả năng hấp thụ nước của màng được tiến hành theo chuẩn BS EN 13726-1:2002.

+ Bước 1: Chuẩn bị dung dịch thử: Dung dịch thử chứa 142 mmol ion Na và 2,5 mmol ion Ca dưới dạng muối clorua. Dung dịch này có thành phần ion giống với dịch cơ thể người hoặc dịch từ vết thương. Cụ thể, hòa tan 8,298 g muối NaCl và 0,368 g muối  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  vào 1 lít nước.

+ Bước 2: Đặt các màng PA, PAP và PAC5-3 kích thước 5 cm x 5 cm trong đĩa Petri.

+ Bước 3: Cho một lượng nước ấm 37°C tương ứng 40 lần khối lượng mẫu vào đĩa Petri.

+ Bước 4: Đặt đĩa petri vào tủ ủ ẩm ở 37 °C và giữ trong 30 phút.

+ Bước 5: Dùng nhíp kẹp chặt 1 góc màng và lắc mạnh ngập trong dung dịch trong 30 giây rồi cân khối lượng của màng.

+ Bước 6: Kết quả tính toán dựa vào khối lượng nước hấp thụ trên 100 cm<sup>2</sup> hoặc khối lượng của màng. Lặp lại thí nghiệm với số lượng màng tổng cộng là 10 lần cho 1 mẫu.

Khả năng hấp thụ nước của các mẫu được tính theo phương trình sau:

$$\text{Khả năng hấp thụ (\%)} = \frac{W_f - W_i}{W_i} \times 100 \text{ (g/100 cm}^2\text{)}$$

Trong đó  $W_i$  là khối lượng ban đầu của màng and  $W_f$  là khối lượng mẫu sau khi hấp thụ dung dịch tiết nhân tạo. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Tốc độ thoát hơi nước (MVTR) qua màng được tiến hành kiểm tra theo chuẩn BS EN 13726-2:2002 [24], tiến hành như sau:

+ Bước 1: Cho nước cất (40 ml) ở nhiệt độ phòng vào một bình chứa và phủ màng kích thước 10 cm<sup>2</sup> kín miệng bình sao cho màng cách mặt nước 5 mm, đảm bảo không bị hở khí ở mép tiếp xúc giữa màng và miệng bình chứa và màng không bị căng hoặc chùng.

+ Bước 2: Cân khối lượng hệ đo gồm bình chứa, màng và nước ( $W_1$ , g)

+ Bước 3: Đặt hệ đo vào tủ ẩm 37 °C

+ Bước 4: Sau 18 đến 24 giờ (T), cân lại khối lượng của hệ đo ( $W_2$ , g)

+ Bước 5: Tốc độ thoát hơi nước qua màng được tính theo công thức sau:

$$\text{MVTR} = (W_1 - W_2) \times 1000 \times 24/T \text{ (g/m}^2\text{/24 giờ)}$$

+ Bước 6: Lặp lại thí nghiệm với số lượng màng tổng cộng là 5 lần cho 1 mẫu.

### 2.1.1. Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích nano Ag của màng theo thời gian

Các mẫu hình vuông 1x1 cm<sup>2</sup> của màng PA, PAP và PAC5-3 được chuẩn bị và đặt lên bề mặt dung dịch PBS (20 mL, pH = 5,5), với lớp nền PA hướng lên trên. Sau đó, các lọ chứa mẫu được ủ ở 37 °C. Các phần dịch chiết được lấy sau 1, 3, 6, 12 và 24 giờ trong khi một lượng dung dịch đệm mới tương đương được thêm vào hệ thống để duy trì thể tích không đổi. Nồng độ bạc trong các mẫu chất lỏng được phân tích bằng ICP-MS, NexION 2000, Perkin Elmer, USA.

### 2.1.2. Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích của COS

Thí nghiệm nồng độ phóng thích được tiến hành bằng cách ngâm màng PAC5-3 (6 × 6 cm<sup>2</sup>) trong 20 mL dung dịch muối đệm photphat (PBS) 0,1 M pH = 5,5 ủ ở 37 °C. Tại các thời điểm nhất định, môi trường được rút ra và đo độ hấp thụ huỳnh quang ở bước sóng kích thích 420 nm và bước sóng phát xạ 460 nm bằng cách sử dụng đầu đọc vi bản (Varioskan™, ThermoScientific, USA) với PBS làm mẫu đối chiếu. Nồng độ phóng thích của COS đã được tính toán và thể hiện bằng đồ thị.

### 2.1.3. Khảo sát và đánh giá khả năng kháng khuẩn của màng PAC

Phương pháp AATCC 100 (Antimicrobial Fabric Test) [25]: là phương pháp xét nghiệm kháng khuẩn định lượng được sử dụng để phát hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn trên vật liệu màng.

Các bước thực nghiệm như sau:

- Bước 1: Chuẩn bị

Chuẩn bị mẫu: Mẫu đối chứng (màng PCL) và mẫu cần kiểm tra (màng PA) được cắt thành các hình tròn có đường kính 4,8 cm.

Chuẩn bị vi khuẩn:

Đòng vi khuẩn thử đông gồm *S. aureus* được đưa vào tủ ủ 37 °C khoảng 2 phút, sau đó cho vào 20 mL dung dịch Mueller Hinton, ủ ở 37 °C trong vòng 24 giờ, sau đó 150 µL huyền phù vi khuẩn cấy lên đĩa thạch và ủ 37 °C trong vòng 24 giờ để cho vi khuẩn mọc thành từng cụm khuẩn lạc, que cấy lấy 1 khuẩn lạc trên đĩa thạch cho vào 20 mL môi trường lỏng, ủ 37 °C. Sau 24 giờ, dung dịch có vi khuẩn phát triển sẽ được pha loãng xuống nồng độ tương đương 10<sup>8</sup> CFU/ml.

- Bước 2: Thực nghiệm

Vi khuẩn được pha loãng xuống mật độ 10<sup>5</sup> CFU/ml và đem ủ trong tủ 37 °C trong 2 giờ trước khi thí nghiệm, 1 mL dung dịch vi khuẩn được thêm vào 2 bình tam giác có chứa mẫu PA và 1 bình tam giác có chứa mẫu đối chứng PCL. Sau đó được chuyển sang môi trường nuôi cấy vi khuẩn vô trùng, ủ trong máy lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Sau khi ủ, lấy 100 µL dung dịch mẫu trải trên agar, ủ 37 °C trong vòng 24 giờ, đếm số lượng khuẩn lạc trong đĩa nuôi cấy từ dịch chiết chứa mẫu đối chứng PCL (A) và mẫu PA (B).

- Bước 3: Thu và phân tích dữ liệu

$$R\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Trong đó:

R%: Hiệu suất kháng khuẩn của màng

A: Số khuẩn lạc trong đĩa nuôi cấy từ dịch chiết từ mẫu control (PCL)

B: Số khuẩn lạc trong đĩa nuôi cấy từ dịch chiết từ mẫu PA

Các thí nghiệm lập lại 3 lần, dữ liệu được trình bày dạng hình ảnh và hiệu suất kháng khuẩn.

Khả năng kháng khuẩn của PAC5 được chế tạo đã được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế vùng vôi kháng khuẩn (AATCC 147) kiểm tra trên chủng *S. aureus* [26].

Trước các thí nghiệm, cụm khuẩn của từng chủng được lấy từ đĩa thạch gốc, đặt vào ống 5 mL MHB và nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ. Sau đó, huyền phù vi khuẩn của từng chủng được chuẩn bị bằng kỹ thuật pha loãng đạt mật độ quang ở bước sóng 620 nm  $OD_{620} = 0,08-0,1$  (bằng 0,5 chuẩn McFarland, xấp xỉ  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL).

Độ nhạy của vi sinh vật của từng mẫu đối với chủng vi khuẩn cụ thể đã được nghiên cứu tách biệt trên đĩa petri Mueller-Hinton agar (MHA). Tóm lại, 150  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn đã pha loãng được đưa vào và trải đều trên bề mặt MHA. Sau đó, các màng hình vuông  $1 \times 1$  cm<sup>2</sup> của mỗi mẫu được đặt trên đĩa MHA và ủ trong 24 giờ. Vùng ức chế vi khuẩn xung quanh các mẫu được đo.

#### 2.1.4. Khảo sát và đánh giá độc tính tế bào của màng

Độc tính gây độc tế bào của dịch chiết từ màng PA, PAP và PAC được đánh giá trên các tế bào L929 bằng xét nghiệm Resazurin tuân thủ các hướng dẫn của ISO 10993[27]. Đầu tiên, các tế bào được nuôi với mật độ  $1 \times 10^5$  tế bào/mL và nuôi cấy trong 24 giờ. Tiếp theo, các dịch chiết được chuẩn bị bằng cách ngâm các mẫu có kích thước 6 cm<sup>2</sup> trên 1 mL môi trường và ủ trong 24 giờ ở 37 °C. Chiết xuất 100% và độ pha loãng 50% của nó được thêm vào các giếng nhân tế bào và nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, các dung dịch chiết được loại bỏ và môi trường nuôi cấy có Resazurin (0,02 mg/mL) được thêm vào từng giếng và ủ thêm 4 giờ. Sự phát huỳnh quang của các dung dịch được kích thích ở bước sóng 530 nm và tín hiệu phát ra được đo ở bước sóng 590 nm bằng đầu đọc vi bản (VarioskanTM, Thermo Scientific, USA). Tín hiệu của các tế bào chưa được xử lý được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy 100% được coi là khả năng sống 100%.

## 2.2. KHẢO SÁT ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG HỖ TRỢ LÀNH THƯỜNG

### 2.2.1. Theo dõi và đánh giá tác dụng điều trị của màng PAC quy mô phòng thí nghiệm

Mô hình bỏng trên thỏ được thực hiện dựa theo các tài liệu tham khảo sau [28].

- Dung dịch vi khuẩn được chuẩn bị bằng cách cấy vi khuẩn vào dung dịch Mueller Hinton và nuôi trong tủ ủ ở 37 °C. Mật độ vi khuẩn trong dung dịch được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang học (OD) ở bước sóng 620 nm. Sau đó dung dịch sẽ được pha loãng nhiều lần, mật độ vi khuẩn trong dung dịch đạt khoảng  $10^8$  CFU/mL. Dòng vi khuẩn được sử dụng để đánh giá là *Staphylococcus aureus* (khuẩn tụ cầu vàng).

- Quy trình tạo bỏng được tiến hành như đã mô tả. Sau khi hoàn thành công việc tạo bỏng, 100  $\mu$ L dung dịch vi khuẩn sẽ được cho vào vết thương. Sau đó các vết thương sẽ được băng lại bằng gạc thường. Thỏ sẽ được quan sát các dấu hiệu bên ngoài:

Diễn biến toàn thân: Tình trạng ăn uống, phân và nước tiểu, trọng lượng và tình trạng nhiễm độc, nhiễm khuẩn, sốt.

Diễn biến tại chỗ: Hình ảnh, kích thước và những thay đổi của vết thương được chụp bằng máy ảnh mỗi 0, 7, 15, 21, 30 ngày cho đến khi lấy mẫu.

Tình trạng dịch xuất tiết, dịch mủ vết thương.

- Theo dõi thỏ trong 28 ngày

### 2.2.2. Đánh giá khả năng hỗ trợ lành thương màng PAC

- Sau 28 ngày, mẫu da tại vùng vết thương được thu hoạch để tiến hành đánh giá khả năng bảo vệ chống nhiễm khuẩn và chữa lành vết thương.
- Mô sau khi thu hoạch được bảo quản trong dung dịch formaldehyde 10%. Sau đó mô được đúc khối parafin và được cắt thành từng lát mỏng để nhuộm bằng H&E (Hematoxylin và Eosin), và MT (Masson Trichrome). Phương pháp nhuộm giúp đánh giá mức độ tái tạo mô mới, quá trình hình thành collagen, sự nhiễm trùng (nếu có).

### 2.3. PHÂN TÍCH THỐNG KÊ

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD). Phân tích thống kê dữ liệu thu được được thực hiện bằng phân tích ANOVA. Khi  $p < 0,05$ , kết quả được coi là có ý nghĩa thống kê. Tất cả các thử nghiệm được lặp lại ba lần.

## CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

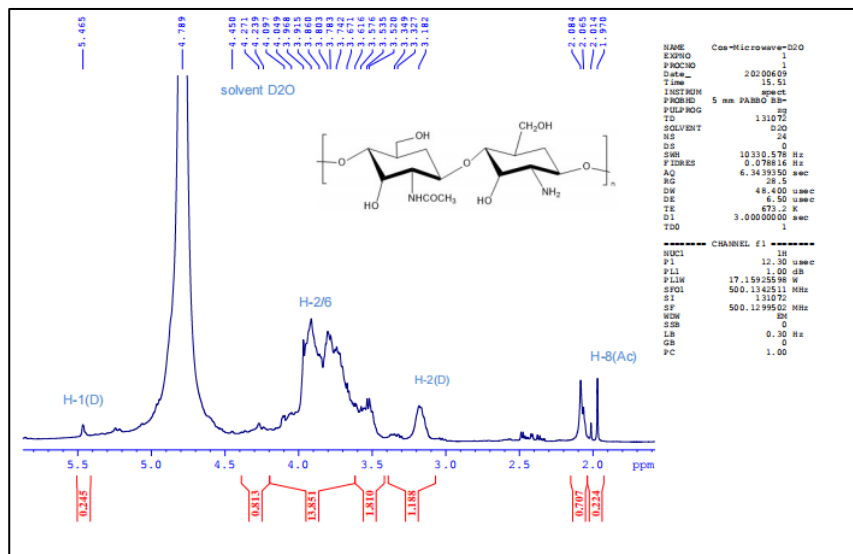
### 3.1. ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT CỦA OLIGOMER CHITOSAN

#### 3.1.1. Độ đề acetyl (DA) của oligomer chitosan

Để đánh giá chính xác tính chất của oligomer chitosan, độ đề acetyl là một trong những tính chất đầu tiên cần đánh giá. Mức độ đề acetyl ảnh hưởng đến các tính chất vật lý, sinh học và hóa học của COS tổng hợp được. Mức độ đề acetyl xác định các nhóm amino tự do tiếp xúc do loại bỏ các nhóm acetyl khỏi chuỗi phân tử chitin [29].

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của các mẫu được thể hiện trong Hình 3 và các giá trị DA tính toán được liệt kê trong công thức bên dưới. Tín hiệu của proton H-1 $\alpha$  của các đơn vị GlcNAc không rõ ràng do các đơn vị này có DA thấp, Sự xuất hiện tín hiệu của proton H-1 $\alpha$  của các đơn vị GlcNAc (Ac) ở khoảng 5,13 ppm.. Tuy nhiên, một số khác biệt đã được quan sát thấy. Tín hiệu của proton H-1 $\alpha$  của đơn vị GlcN(D), proton H-1 của các góc bên trong và proton H-2 của đơn vị GlcN (D) đã được chuyển sang trường cao.

Do đó, kết luận rằng sự dịch chuyển trường cao của các tín hiệu này trong phổ có liên quan đến sự gia tăng DA có thể do sự tách H khỏi các nhóm amino của đơn vị GlcN, dẫn đến sự khử amine.



Hình 3. Kết quả  $^1\text{H-NMR}$  của COS.

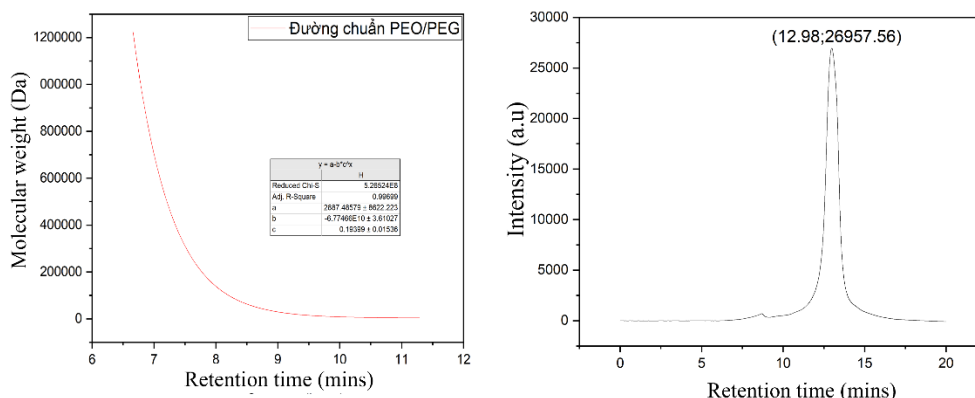
Công thức tính độ deacetyl hóa của COS:

$$DD(\%) = \left( 1 - \frac{\frac{1}{3}A_2}{\frac{1}{6}A_1} \right) \times 100 = 89\%$$

trong đó  $A_1$  là giá trị tích phân proton của các vị trí C2–C6 trên vòng đường, là diện tích trung bình đo được trong khoảng  $\delta$  3–6 ppm, và  $A_2$  là giá trị tích phân proton của ba proton N-acetyl của N-acetyl gluamine ở khoảng  $\delta$  2 ppm.

Mức độ đề acetyl 70–85% là mức độ đề acetyl trung bình của chitosan, có thể hòa tan một phần trong nước. Cuối cùng, 85–95% là mức độ đề acetyl cao của chitosan, có khả năng hòa tan tốt trong nước, và 95–100% được gọi là mức độ đề acetyl cực cao của chitosan, rất khó đạt được [30]. Dựa trên kết quả thu được, nghiên cứu chế tạo thành công COS với độ đề acetyl (DA) đạt 89%, COS có khả năng hòa tan tốt trong nước.

### 3.1.2. Khối lượng phân tử



Hình 4. Đường chuẩn PEO/PEG và kết quả GPC từ mẫu COS.

Khối lượng phân tử COS được xác định dựa vào đường chuẩn PEO/PEG (Hình 4); đường chuẩn PEO/PEG được dựng dựa trên 3 mẫu chuẩn (xanh, vàng, đỏ), đường chuẩn được dựng dựa trên 12 điểm xây dựng dựa trên 3 mẫu chuẩn có dạng:

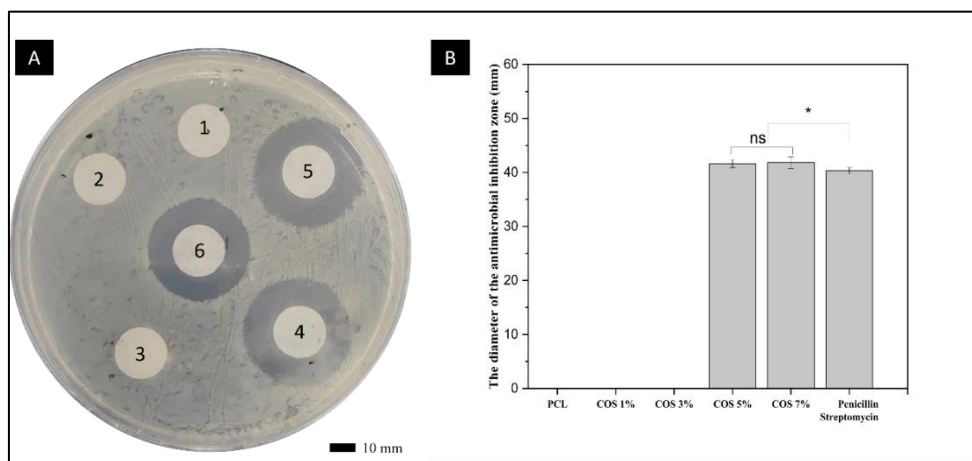
$$y = 2887,48 + 6,77 \times 0,19^x$$

Trong đó:  $y$  là khối lượng phân tử (Da) được tính toán dựa và thời gian lưu  $x$  (phút).

Từ công thức ta tính được khối lượng phân tử của COS. Fernandes và đồng nghiệp báo cáo rằng với khối lượng phân tử <5 kDa cho thấy kết quả kháng khuẩn tốt hơn so với có khối lượng phân tử lớn [18]. Kết quả của Fernandes cho kết quả tương đồng với Kulikov và đồng nghiệp, kết quả này cho thấy với khối lượng phân tử 2,89 kDa, nằm trong khoảng khối lượng phân tử cho kết quả kháng khuẩn tốt.

### 3.1.3. Khảo sát nồng độ kháng khuẩn của COS





Hình 5. Kết quả khảo sát nồng độ kháng khuẩn của COS bằng phương pháp đĩa thạch (A) và đường kính trung bình của vòng kháng khuẩn (B) với 1-PCL, 2-COS 1%, 3-COS 3%, 4-COS 5%, 5-COS 7%, 6-Penicillin Streptomycin.

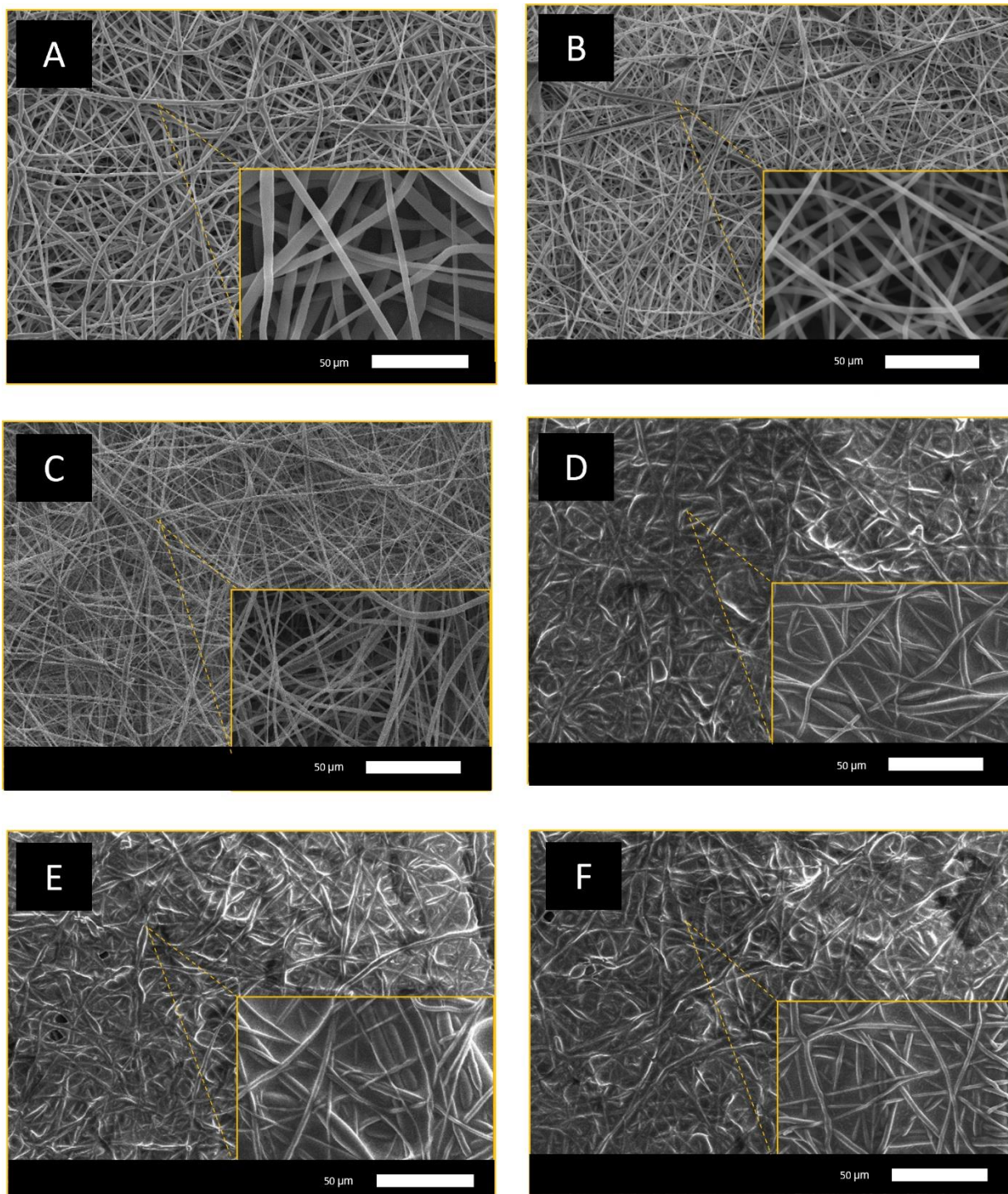
Từ kết quả khảo sát ở Hình 5, phương pháp khuếch tán đĩa thạch, có thể thấy nồng độ COS ở nồng độ 1% và 3% không đủ khả năng tạo vòng kháng. Đồng thời, ở nồng độ 7%, khả năng kháng của COS không cho thấy sự khác biệt giữa khi so sánh đường kính kháng khuẩn với mẫu COS ở nồng độ 5%. Từ kết quả khảo sát này, nồng độ COS 5% được chọn làm dung dịch nhúng cho quá trình phủ màng tiếp theo.

### 3.2. ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT MÀNG PAC

#### 3.2.1. Hình thái của màng

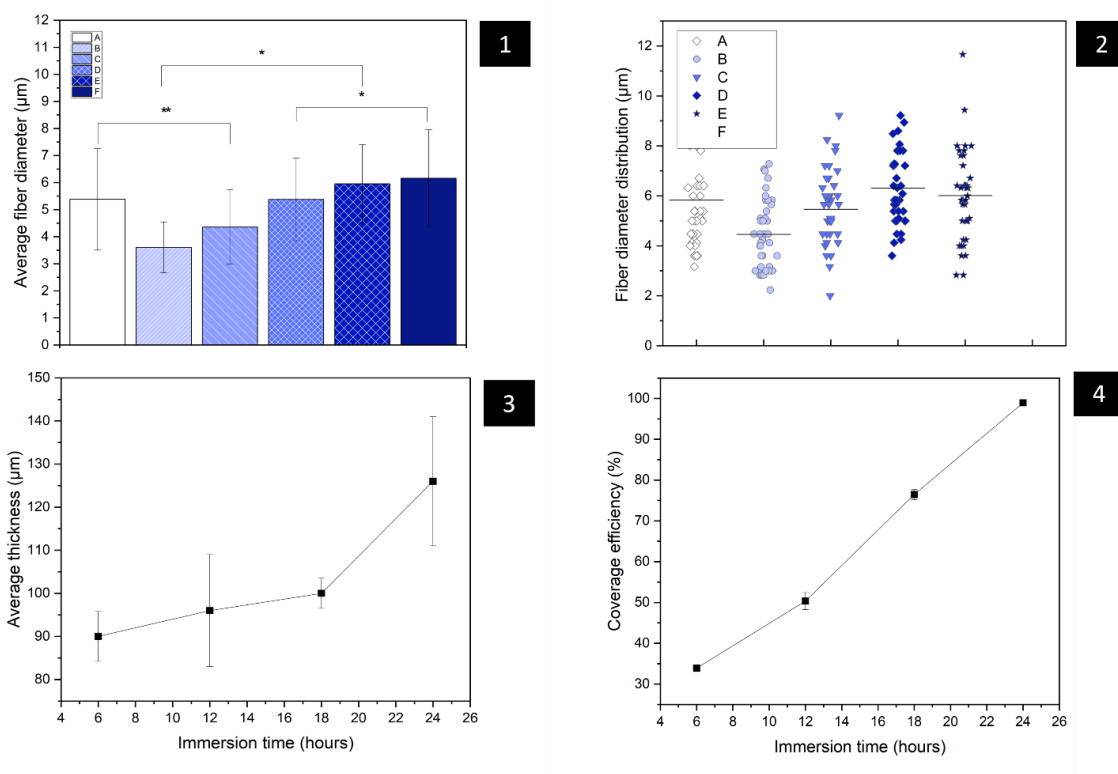
Màng PCL được sử dụng như màng đối chứng để khảo sát bề mặt và đường kính sợi so với màng PCL-Ag 0,02% (PA), màng PCL-Ag-POX (POX) và 3 màng được phủ COS ở 3 mốc thời gian 12 giờ, 18 giờ và 24 giờ ứng với PCL-Ag-COS 5-1 (PAC5-1), PCL-Ag-COS 5-2 (PAC5-2) và PCL-Ag-COS 5-3 (PAC5-3); Hình SEM (Hình 6) cho thấy hình thái bề mặt của PCL(A), PA (B), PAP (C), PAC5-1 (D), PAC5-2 (E), PAC5-3 (F). Tất cả các mẫu đều cho thấy các sợi không có hạt, mịn và không thẳng hàng với độ đồng nhất tương đối cao về đường kính sợi. Hình B cho thấy bởi vì nano bạc đã được tích hợp vào sợi PCL, nên đường kính sợi nhỏ hơn do độ dẫn điện từ các hạt nano bạc nhưng không có thay đổi rõ ràng nào về cấu trúc bề mặt màng so sánh với màng PCL.

Đường kính sợi của PCL (Hình 6-A) có kích thước từ 3-10  $\mu\text{m}$ , với đường kính trung bình là  $5,38 \pm 1,87 \mu\text{m}$ ; Nhìn chung, kích thước đường kính sợi trung bình giảm dần khi nano bạc (AgNPs) được tích hợp; việc tích hợp nano bạc trong sợi PCL giúp tăng mật độ điện tích của dung dịch. Thêm vào đó, sự có mặt của AgNPs trong dung dịch PCL làm xáo trộn sự sắp xếp của chuỗi polymer và do đó làm giảm độ nhớt của dung dịch. Từ đó, dung dịch PCL/AgNPs có độ nhớt thấp hơn và độ dẫn điện tốt hơn khi so sánh với dung dịch PCL[31] kết quả là đường kính sợi nhỏ hơn do sự giãn nở của tia polyme điện tăng lên trong quá trình quay điện. Hiện tượng này được xem như là hiện tượng phổ biến của dung dịch polymer, khi mà dung dịch có độ nhớt thấp và độ dẫn điện cao sẽ dẫn đến đường kính sợi nhỏ hơn [32]. Ở lớp thứ 2, bề mặt màng PCL-POX (PP) tạo thành màng 2 lớp PCL-Ag-POX (PAP) cho thấy trung bình đường kính sợi lớn hơn so với màng PA, tuy nhiên việc kết hợp POX tăng độ nhớt của dung dịch [33].



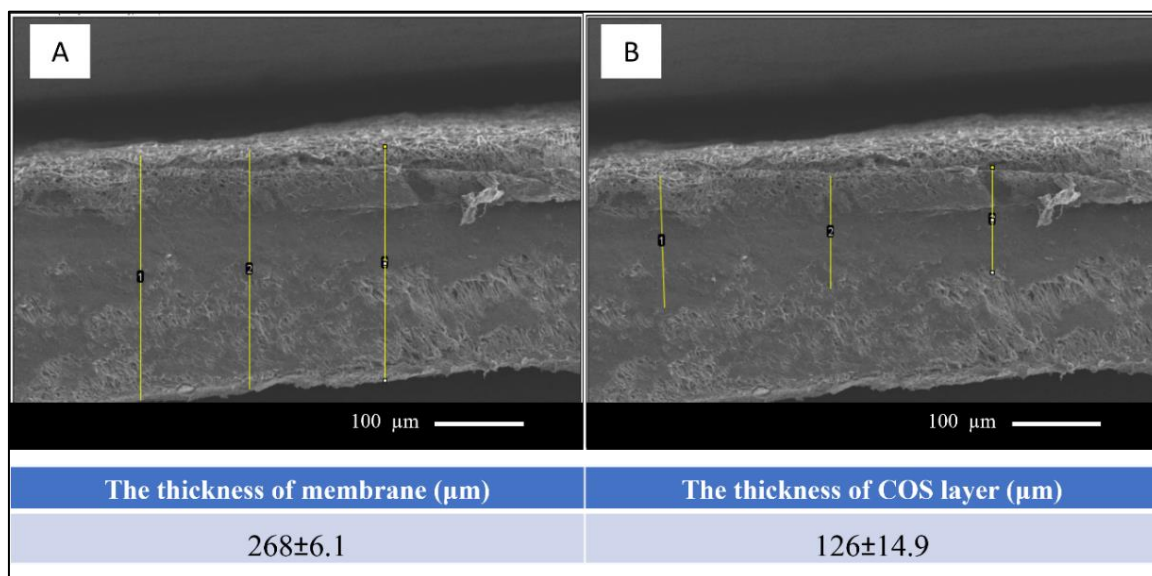
Hình 6. Ảnh vi mô SEM Bề mặt của các nhóm màng (A) PCL; (B) PA; (C) PAP; (D) PAC5-1; (E) PAC5-2 và (F) PAC5-3.

Sợi PCL/poloxamer cho thấy bề mặt sợi mịn và cấu trúc thảm sợi đồng nhất không có khuyết tật, tương tự như các sợi từ nhóm kiểm soát PCL, việc kết hợp poloxamer vào sợi PCL đã dẫn đến việc giảm đường kính sợi trung bình, quá trình kéo giãn và làm mỏng sợi tốt hơn [34].



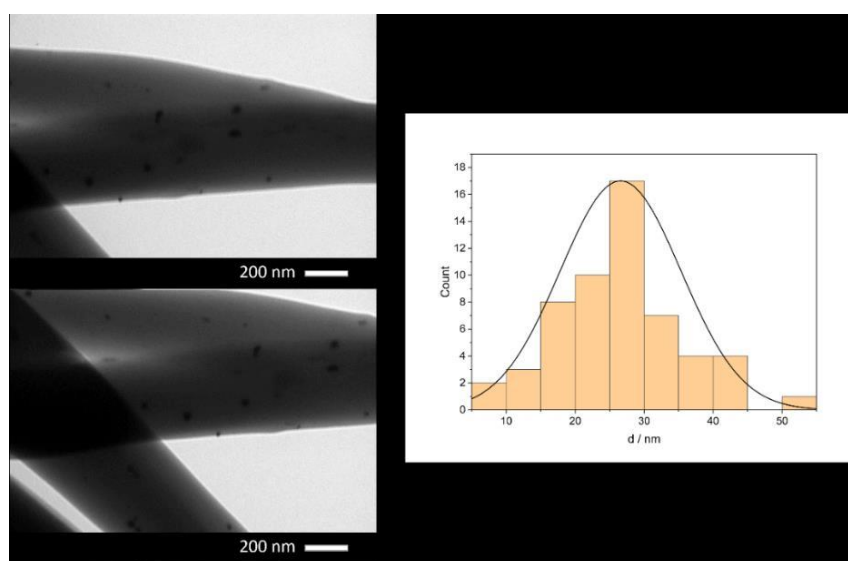
Hình 7. Kết quả (1) so sánh đường kính sợi trung bình và (2) độ phân bố đường kính sợi giữa các mẫu A-PCL, B-PA, C-PAP, D-PAC5-1, E-PAC5-2, F-PAC5-3; (3) Độ dày lớp phủ COS và (4) độ phủ bề mặt của COS ở 4 khoảng thời gian 6 tiếng, 12 tiếng, 18 tiếng và 24 tiếng.

Tại thời điểm khảo sát 24 giờ, cho thấy độ phủ trên bề mặt trên 90% ở vị trí khảo sát. Khảo sát mối tương quan giữa độ phủ bề mặt và độ dày của lớp phủ cho thấy thời gian tối ưu cho quá trình phủ là 24 giờ. Đồng thời, việc phủ COS làm tăng kích thước đường kính sợi trung bình. Sau quá trình khảo sát, PAC5-3 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 8. Kết quả (A) độ dày màng PAC5-3 và (B) độ dày lớp phủ COS tại ba vị trí ngẫu nhiên. Bảng kết quả cho thấy độ dày trung bình của màng PAC5-3 và lớp phủ COS.

Kết quả khảo sát và đo độ dày màng phần mềm Image J cho thấy Hình 8, sau 12 giờ ngâm màng thì bề mặt phủ trên diện tích  $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  tại 10 vị trí khảo sát thấy rằng độ phủ đạt trên 50%. Nhờ sự kết hợp các polymer ưa nước là POX và PVP, giúp cho COS không chỉ phủ trên bề mặt màng mà còn thấm vào lớp thứ 2 PP, do đó lượng COS đủ lớn để khi giải phóng ra khỏi màng đủ thực hiện khả năng kháng khuẩn. Hình cho thấy lượng COS thấm vào màng đạt gần 40% bề dày. POX được sử dụng ở lớp thứ 2 của màng. Khối polypropylene glycol thu hút bề mặt kỵ nước của màng PA (w/w) trong khi hai khối ưa nước của polyetylen glycol liên kết với nhóm -OH hoặc -NH. Kết quả là hai lớp PA và COS được giữ với nhau bằng lớp PP trung gian. Ta thấy rằng các sợi PP bao phủ bề mặt PA. Sau quá trình phủ, có 2 lớp tách biệt trong 1 tấm màng. Khi quan sát hình cắt ngang, không có dấu hiệu tách lớp giữa từng lớp. Đồng thời cũng cho thấy một phần của dung dịch COS đã được hấp thụ sâu vào lớp PP.

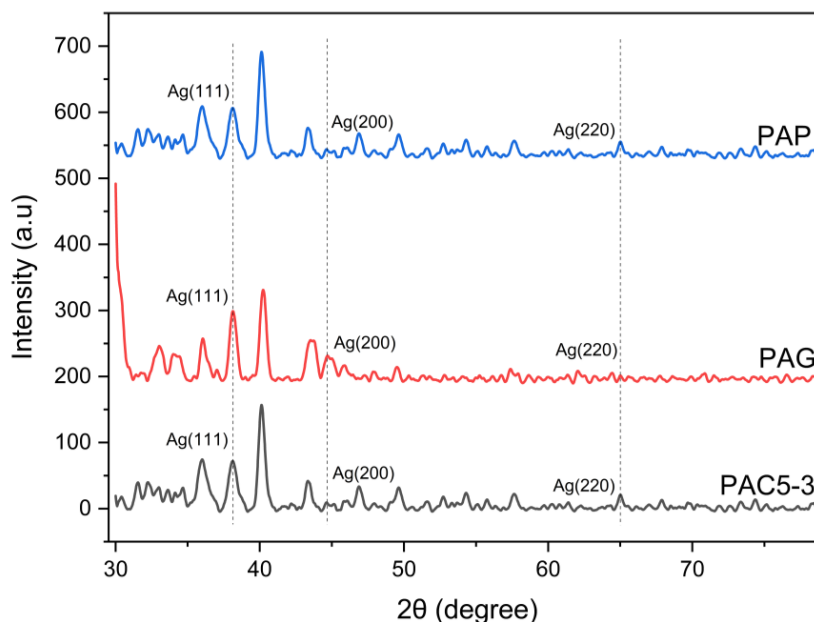


Hình 9. Ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của màng PA và biểu đồ phân phối kích

thước đường kính AgNPs. (Thành tỷ lệ: 200 nm,  $n = 50$ ).

Ảnh vi mô (Kính hiển vi điện tử truyền qua) TEM cho thấy xu hướng về kích thước hạt Ag. Kích thước trung bình của các AgNPs là  $26.8 \pm 8.7$  nm, từ biểu đồ phân phối kích thước đường kính AgNPs từ 5 nm đến 55 nm. Từ tài liệu tham khảo, Yaohua Dong và cộng sự đã chứng minh AgNPs đường kính  $10 \pm 5$  nm có thể ức chế hoàn toàn vi khuẩn ở nồng độ ức chế tối thiểu thấp hơn ( $1.0 \mu\text{g/ml}$ ), trong khi kích thước hạt khoảng  $90 \pm 5$  nm có thể ức chế vi khuẩn ở nồng độ cao hơn ( $11.5 \mu\text{g/ml}$ ) [35].

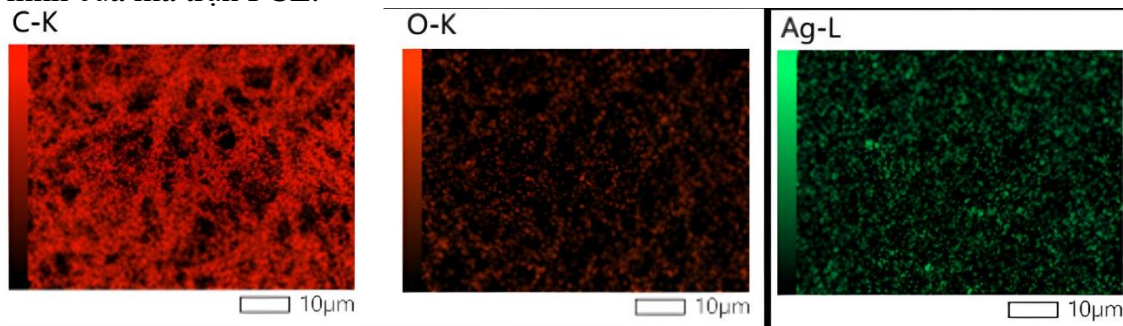
### 3.2.2. Đánh giá tính chất hóa học của màng



Hình 10. Kết quả XRD của màng PAP, PAG và PAC5-3.

Phân tích XRD đã được thực hiện để xác minh cấu trúc tinh thể nano của các hạt nano bạc. Hình 10 cho thấy giản đồ XRD của các mẫu PA cho thấy ba đỉnh ở các góc  $2\theta$  là  $38,13^\circ$ ,  $44,26^\circ$ ,  $64,5^\circ$ . Các giá trị này cho thấy cho các mặt phẳng tương ứng (111), (200), (220) tương ứng với các pha kết tinh của nano bạc [36].

Kết quả này một lần nữa khẳng định sự có mặt các hạt nano bạc trong màng PCL bằng kỹ thuật chiếu xạ gamma. Các nhiễu nền trong các mẫu XRD phản ánh hành vi vô định hình của ma trận PCL.



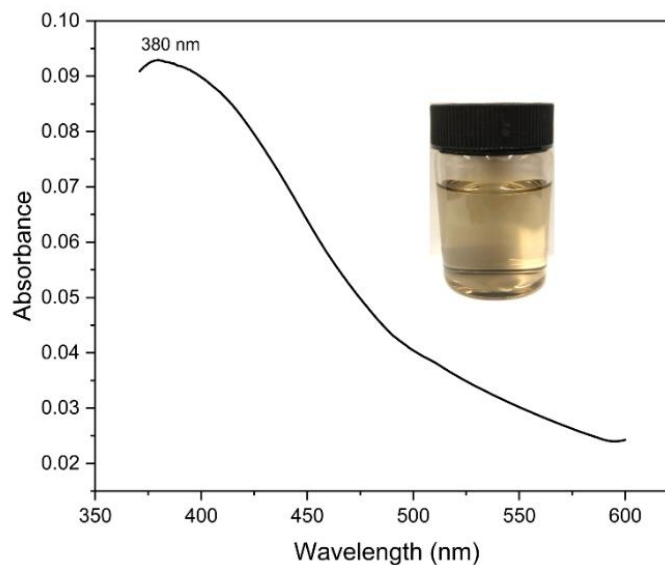
Hình 11. Kết quả EDS khảo sát sự có mặt của nguyên tố C, O và Ag trên bề mặt màng PA.

Nguyên tử, phần trăm khối lượng và nồng độ Ag của PA được xác định bằng EDS và được trình bày trong Bảng 3.

*Bảng 3. Phần trăm nguyên tử, phần trăm khối lượng của C, O và Ag.*

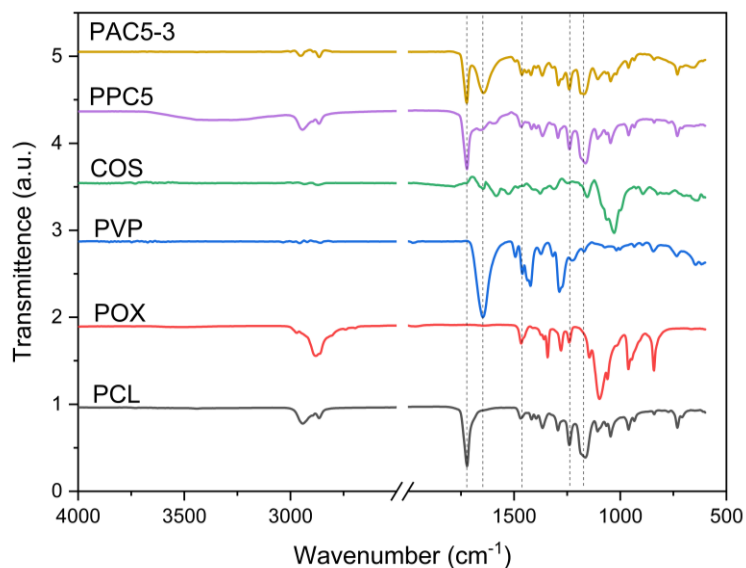
		Mass % - Phần trăm khối lượng (%)	Atom % - Phần trăm nguyên tử (%)
C	K	65,86 ± 0,09	72,98 ± 0,01
O	K	32,19 ± 0,16	26,78 ± 0,13
Ag	L	1,95 ± 0,09	0,24 ± 0,01
Tổng		100,0	100,0

Khảo sát sự phân bố của AgNPs trên bề mặt màng, thấy rằng lượng AgNPs tích hợp trong sợi với một lượng rất ít, tuy nhiên chưa thể đánh giá chính xác lượng AgNPs bằng phương pháp EDS. Kết luận rằng, dùng phương pháp này chỉ có thể chứng minh AgNPs có mặt và sự phân bố của nó trên bề mặt màng. Cùng với khảo sát phổ UV-vis (Hình 12) chỉ có thể kết luận được đã thành công trong việc tích hợp AgNPs vào sợi PCL.



*Hình 12. Kết quả UV-Vis khảo sát sự có mặt của AgNPs ở thời điểm chế tạo.*

Phân tích FTIR được tiến hành để xác định các nhóm chức năng hiện diện trên màng. Đỉnh trội ở  $1718\text{ cm}^{-1}$  thuộc về nhóm carbonyl của PCL. Hai tín hiệu ở  $2943$  và  $2871\text{ cm}^{-1}$  tương ứng với sự kéo dài không đối xứng và đối xứng của nhóm  $-\text{CH}$  [37]. PAP được kỳ vọng sẽ có đỉnh tương tự phổ POX cũng có nhóm  $-\text{OH}$ , tuy nhiên, phổ của PAP không cho thấy tín hiệu nào về nó. Điều này có thể là do lượng POX tích hợp trong màng quá nhỏ để có thể phát hiện được. Hai đỉnh đặc trưng của nhóm  $\text{C}=\text{O}$  và  $\text{C}-\text{N}$  của PVP ở  $1639$  và  $1288\text{ cm}^{-1}$  đều được quan sát thấy trong mẫu PAC5-3. Kết quả XRD đã kiểm chứng sự tồn tại của pha tinh thể nano bạc trên màng PAC5-3.



Hình 13. Phổ FT-IR của PCL, POX, PVP, COS đối chiếu cùng màng PPC5 và PAC5-3.

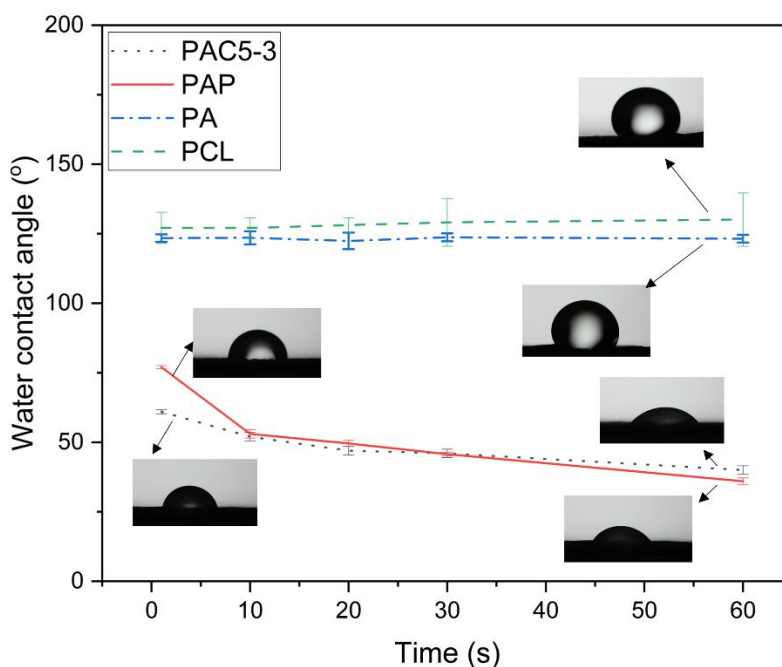
Sự pha trộn COS với polymer tổng hợp hoặc tự nhiên là cách đơn giản để tạo ra vật liệu mới. Các màng được tạo ra bằng cách trộn hai polymer thường dẫn đến các tính chất cơ lý bị biến đổi liên quan đến các màng được điều chế từ các thành phần chính. Poly vinyl pyrrolidone (PVP) là một loại polymer ưa nước được sản xuất từ monome phản ứng trùng hợp N-vinyl pyrrolidone [38]. PVP có lợi thế trong nhiều lĩnh vực khác nhau như ứng dụng phân phối thuốc nhờ khả năng phân hủy sinh học tốt và khả năng tương thích sinh học, kỹ thuật mô, vật liệu kháng khuẩn và xúc tác [39]. Nhiều nghiên cứu nhận thấy rằng sự tích hợp của PVP với các polyme khác đang tăng cường tính chất trương nở và ổn định nhiệt [40]. Do đó, COS và PVP hoàn toàn phù hợp cho việc chế tạo hỗn hợp polymer. Lực hút liên kết hydro giữa các nhóm carbonyl liên quan đến PVP và nhóm hydroxyl và amino của COS làm cho các polymer có thể đồng nhất thành một hỗn hợp [41], dẫn đến sự hình thành hỗn hợp tương thích sinh học đồng nhất cải tiến, có thể được sử dụng cho các ứng dụng khác nhau. Bằng cách trộn COS với PVP dẫn đến sự tương tác mạnh mẽ giữa các nhóm (N–H và O–H) của COS và nhóm (O–H) của PVP, do đó, độ dài của liên kết hydro giữa và nội phân tử giảm trong khi PVP và COS trở nên đồng nhất dung dịch, giúp độ cứng của màng tăng lên.

Đối với COS, dao động kéo giãn của nhóm O–H và N–H được quan sát thấy ở  $3360\text{ cm}^{-1}$  và  $3286\text{ cm}^{-1}$ . Dao động kéo dài đối xứng và không đối xứng C–H lần lượt được nhìn thấy ở  $2921\text{ cm}^{-1}$  và  $2870\text{ cm}^{-1}$ . Dao động của liên kết amit I và amit II lần lượt được xác định ở mức  $1641\text{ cm}^{-1}$  và  $1564\text{ cm}^{-1}$ . Nhóm OH chính được quan sát thấy ở  $1382\text{ cm}^{-1}$ . Ở  $1155\text{ cm}^{-1}$ , người ta quan sát thấy dao động kéo dài của oxy cầu trong các liên kết glycosid. Dao động kéo giãn C–O được quan sát thấy ở  $1063\text{ cm}^{-1}$  và  $1027\text{ cm}^{-1}$ . Dao động uốn C–H được ấn định ở  $896\text{ cm}^{-1}$  [42].

Trong phổ PVP. Các dải ở  $1427\text{ cm}^{-1}$  và  $1373\text{ cm}^{-1}$  được gán cho các dao động uốn của nhóm CH. Các dải nằm ở  $1278\text{ cm}^{-1}$  được gán cho dao động uốn C–N. Dao động xoắn và lắc của CH<sub>2</sub> được xác định lần lượt là  $1223\text{ cm}^{-1}$  và  $1012\text{ cm}^{-1}$ . Dao động uốn N–C=O nằm ở  $567\text{ cm}^{-1}$ .

Đối với phổ COS-PVP, người ta quan sát thấy rằng sự tạo phức giữa COS và PVP được xác nhận thông qua sự thay đổi vị trí và độ mở rộng dải của các dải OH và NH của từng polymer trong hỗn hợp. Ngoài ra, còn có sự thay đổi trong dải amide II và dải C–O của COS. Ngoài ra, vị trí dải C–N của PVP được dịch chuyển sang tần số cao hơn. Ngoài ra còn có sự thay đổi về cường độ dải. Kết quả này khẳng định tính đồng nhất và tương tác giữa COS và PVP.

### 3.2.3. Khảo sát và đánh giá tính kỵ và ưa nước của màng



Hình 14. Góc tiếp xúc của PCL, PA, PAP và PAC5-3. Các bức ảnh phía trên mỗi cột minh họa các giọt nước trên bề mặt màng. (dữ liệu = trung bình ± SD, n=5, \*:  $p < 0,05$ , ns:  $p > 0,05$ ).

Bảng 4. Góc tiếp xúc của các nhóm màng ở thời điểm bắt đầu khảo sát và sau 60s.

Sample	0s	60s
PAC5-3	52 ± 1,52 (°C)	50 ± 2,08 (°C)
PAP	53 ± 1,52 (°C)	36 ± 1,15 (°C)
PA	123 ± 1,34 (°C)	123 ± 1,36 (°C)
PCL	127 ± 5,6 (°C)	130 ± 9,6 (°C)

Hình 14 cho thấy, đo góc tiếp xúc được tiến hành để đánh giá khả năng ưa nước

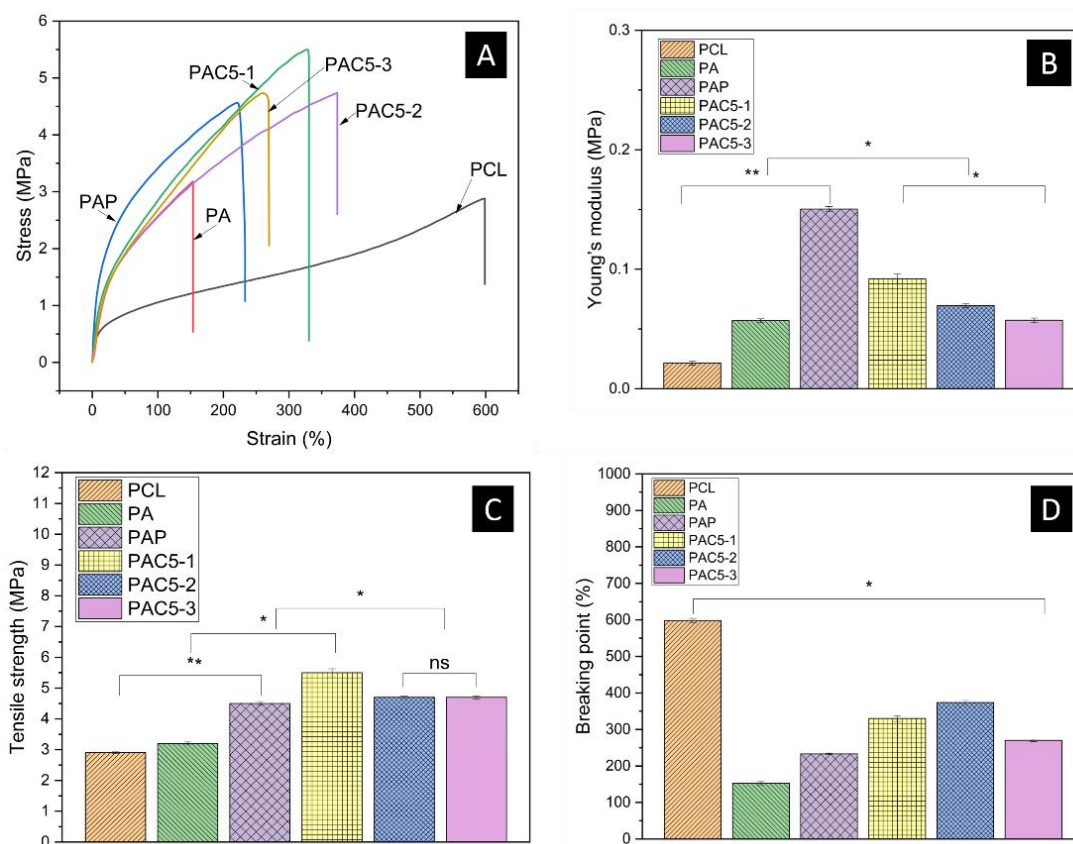


và kỹ nước của màng. Hình minh họa sự tương tác giữa các màng với nước và góc tiếp xúc tương ứng của chúng. Với việc kết hợp AgNPs vào màng PCL, tính kỵ nước của màng không thấy sự thay đổi đáng kể ( $p < 0,05$ ) như được thể hiện qua các giá trị góc tiếp xúc với nước.

Trong khi đó, có sự khác biệt đáng kể về mức độ góc tiếp xúc giữa các màng PA được thử nghiệm, với các giá trị cho PAP và PAC5-3 lần lượt là  $36 \pm 1,15$  và  $50 \pm 2,08$  °C.

Việc kết hợp POX vào lớp thứ hai làm tăng tính thấm của màng, từ đó cho thấy kết quả là góc tiếp xúc giảm ở 60s đầu và sau đó các giọt nước được thấm hút hoàn toàn. Lớp phủ COS-PVP tạo một lớp phủ bề mặt làm tăng sức căng và che phủ các lỗ giữa các sợi nano trong ma trận màng electrospinning. Kết quả là góc tiếp xúc tăng lên 14 °C khi so sánh với màng PAP ( $36 \pm 1,15$  °C).

### 3.2.4. Khảo sát và đánh giá tính chất cơ lý của màng



Hình 15. Đặc tính cơ học của PCL, PA, PAP, PAC5-1, PAC5-2, PAC5-3.  
(data = trung bình cộng  $\pm$  phương sai, số lần lặp là 3).

Đặc tính cơ học của màng được khảo sát thông qua đường cong độ bền kéo – giãn dài, được thể hiện trên (Hình 15) với các giá trị trung bình của độ bền kéo và độ giãn dài khi đứt được thể hiện trong giản đồ 15-C và 15-D. PA có độ bền kéo MPa và độ giãn dài %.

Độ bền kéo tối đa giảm sau khi tạo thêm một lớp PP và tiếp tục giảm xuống do phủ COS-PVP. Tương tự như vậy, màng trải qua xu hướng giảm và chỉ đạt mức  $210,8 \pm 8,5\%$  trong sản phẩm cuối cùng của PAC5-3.

Cần phải nghiên cứu các tính chất cơ học của màng xem chúng có thể chịu được áp

lực do chuyển động gây ra mà không bị vỡ hoặc gây ra áp lực hoặc lực cắt có thể gây hại cho da hay không. Lý do chọn PCL, vì lớp màng nền trong nghiên cứu có các đặc tính cơ học tốt.

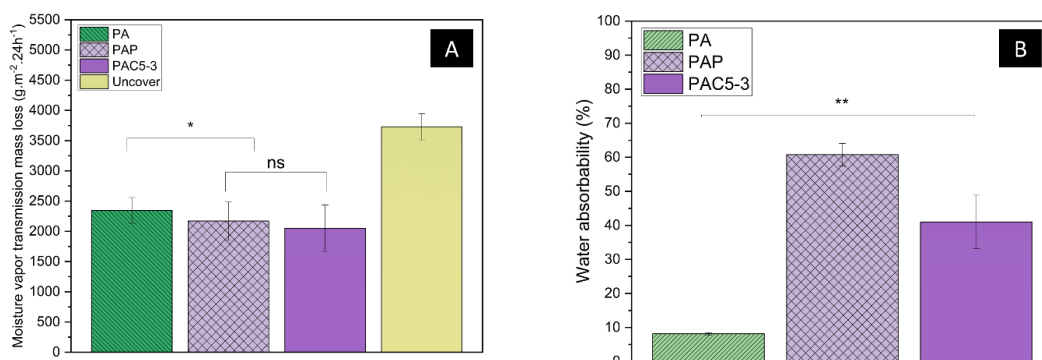
Đường cong độ bền kéo-giãn dài cho thấy rằng việc bổ sung một lớp khác bao gồm PP và COS-PVP lên lớp nền PA đã làm giảm độ bền cơ học của nó.

Bất chấp sự giảm này, độ bền kéo cuối cùng của PAC5 (ở mức 4,3 MPa) vẫn vượt trội so với yêu cầu tối thiểu được báo cáo là 1,8 MPa [43]. Bên cạnh độ bền kéo, Young's modulus cũng là một chỉ số cần đánh giá. Young's modulus là một thuộc tính rất có giá trị của vật chất và được sử dụng để mô tả độ bền kéo của vật liệu

Dựa vào lý thuyết ta thấy rằng, màng có đường kính sợi nano nhỏ nhất có chỉ số Young's modulus của màng cao nhất nhờ khả năng sắp xếp sợi tốt hơn và độ kết tinh cao hơn trong các sợi được chế tạo. Từ kết quả (Hình 15-B), ta thấy rằng màng 2 lớp PAP có chỉ số Young modulus cao nhất. Từ kết quả SEM (Hình 15-B) có thể thấy rằng, màng PA cho kết quả đường kính sợi tạo ra nhỏ nhất, kết hợp cùng lớp thứ hai PP kết quả tạo ra màng có Young's Modulus lớn, cho phép vật liệu càng cứng; nói cách khác, biến dạng đàn hồi sẽ nhỏ hơn[44]. Việc phủ lớp COS-PVP cho thấy làm giảm chỉ số Young 's Modulus, có thể thấy màng dễ biến dạng, giảm khả năng chịu được sự thay đổi về chiều dài khi chịu lực kéo hoặc nén theo chiều dọc.

### 3.2.5. Khảo sát và đánh giá khả năng hấp thụ nước và tốc độ thoát hơi nước của màng

Mức độ trao đổi hơi nước qua màng được xác định bằng tốc độ truyền hơi nước (MVTR) từ trong ra ngoài của bình chứa nước được phủ màng, thể hiện ở. Nói chung, màng càng nhiều lớp thì giá trị MVTR quan sát được càng giảm. Tốc độ truyền hơi qua màng PA và bình chứa nước không được che phủ lần lượt là 2345,5 và 3729,4 g/m<sup>2</sup>/24h, trong lớp màng PAP và PAC đã hạ tốc độ truyền cuối cùng xuống lần lượt là 2171 và 2052 g/m<sup>2</sup>/24h.



Hình 16. Tốc độ truyền hơi nước (A) và độ hấp thụ nước (B) của 3 nhóm màng PA, PAP và PAC5-3; với uncover-bề mặt thoáng không phủ màng (data = mean  $\pm$  SD, n = 5, ns: p > 0,05, \*: p < 0,05).

Theo quy định của phép đo MVTR, tốc độ trao đổi hơi qua màng giảm khi số lớp tăng lên. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Oh và cộng sự, trong đó tuyên bố rằng trong cùng điều kiện nhiệt độ và độ ẩm, đặc tính truyền hơi ẩm bị ảnh hưởng tích cực bởi kích thước lỗ và độ dày khi chế tạo màng [45]. PAC5-3 có MVTR thấp nhất ( $2052 \pm 385 \text{ g/m}^2/24\text{h}$ ), so sánh với với một trong những màng có độ thấm trung bình trong nghiên cứu của Xu et al. ( $2028 \pm 238 \text{ g/m}^2/24 \text{ h}$ ), được chứng minh là loại băng tốt để giữ điều kiện độ ẩm tối ưu cho quá trình lành vết thương so với các tốc độ truyền hơi nước khác nhau [46].

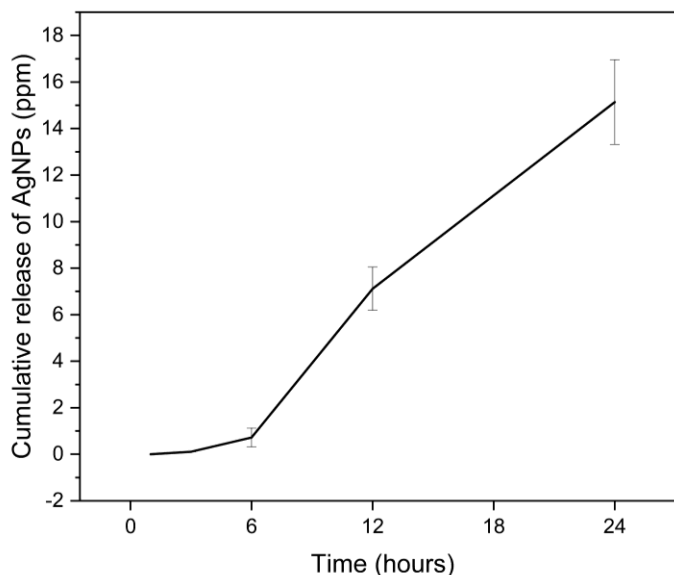
Ngoài khả năng thấm ẩm, khả năng hút ẩm cũng là một trong những đặc tính cần thiết của COS để cân bằng độ ẩm cho nền vết thương. Khả năng hấp thụ chất lỏng của màng được đánh giá bằng cách so sánh trọng lượng của chúng sau 30 phút ngâm trong chất lỏng với trọng lượng ban đầu của chúng. Theo kết quả trình bày trên Hình -B, màng PA cho khả năng hấp thụ thấp nhất (khoảng 10%). Ngược lại, màng PAP đạt tỷ lệ hấp thụ cao nhất (khoảng 60%), trong khi đó màng PAC5-3 chỉ đạt 40% cho khả năng hấp thụ.

Trong khi PA không thể giữ lại dung dịch thì PAP và PAC5-3 có khả năng hấp thụ lượng nước tốt. Khả năng hấp thụ nước của PAC5-3 thấp hơn so với PAP. Điều này được giải thích là do lớp COS-PVP làm giảm khả năng hấp thụ của màng.

Với tác dụng kép của khả năng thấm ẩm và hút ẩm, PAC5-3 có thể đảm bảo một môi trường phù hợp để thúc đẩy quá trình lành vết thương.

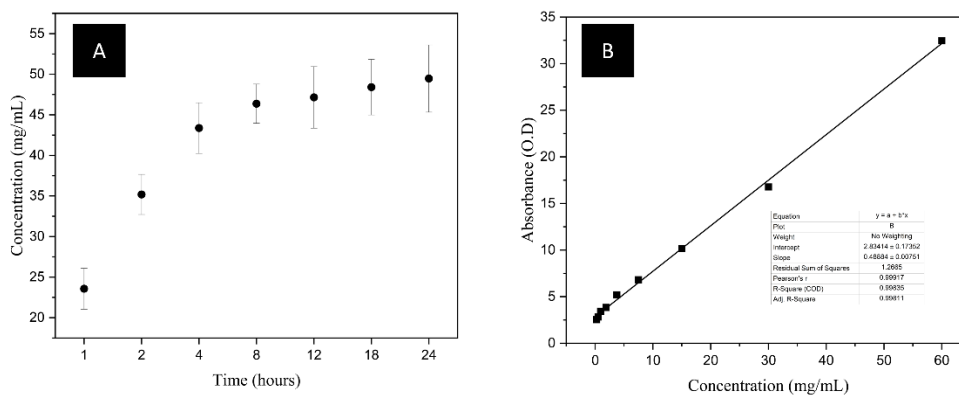
### **3.2.6. Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích nano Ag của màng theo thời gian**

Mô hình giải phóng AgNPs trong ống nghiệm (Hình 17) của màng PAC5-3 được nghiên cứu bằng cách định lượng sự phóng thích hàm lượng AgNPs tại các thời điểm khác nhau. Nghiên cứu nhằm tránh khả năng giải phóng AgNPs đột ngột, từ đó gây độc cho các mô và làm trì trệ quá trình chữa lành vết thương. Hình 17 minh họa hoạt động giải phóng các thành phần bạc từ màng: PAC5-3. Trong 6 giờ đầu, nồng độ Ag là 0,7 ppm. Sau mốc sáu giờ, tốc độ giải phóng lượng bạc tích lũy tăng lên và biểu đồ nồng độ-thời gian gần như tuyến tính. Nồng độ Ag đạt lần lượt là 7,1 và 15,1 ppm sau 12 giờ và 24 giờ.



Hình 17. Lượng AgNPs giải phóng trong ống nghiệm từ màng PAC5-3 trong dung dịch PBS (pH=5,5). Các phần dịch được lấy sau 1, 3, 6, 12 và 24 giờ và định lượng bằng kỹ thuật ICP-MS (dữ liệu = trung bình  $\pm$  SD, số lần lặp=3).

### 3.2.7. Khảo sát và đánh giá tốc độ phóng thích của COS

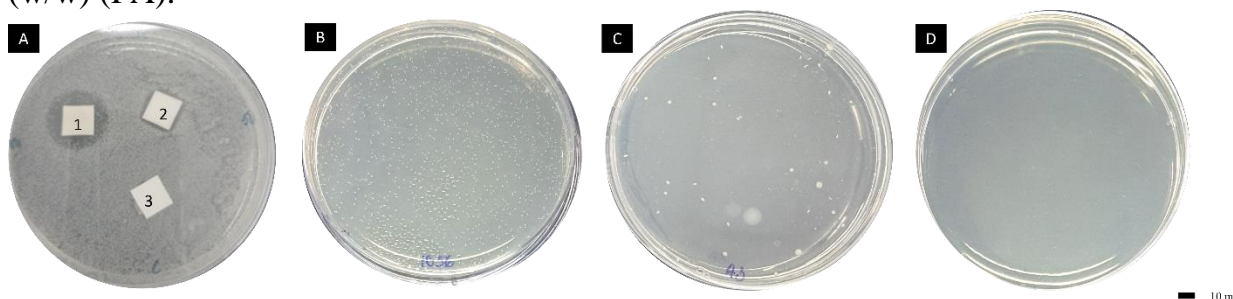


Hình 18. (A) Nồng độ phóng thích của COS trong vòng 24 giờ và (B) đường chuẩn độ hấp thụ của các nồng độ COS.

Kết quả (Hình 18) cho thấy sau 4 giờ, nồng độ phóng thích của COS  $43,37 \pm 3,13$  mg/mL, sau 24 giờ thì nồng độ phóng thích là  $49,47 \pm 4,14$  mg/mL. Nhìn chung, nồng độ tăng nhanh trong 4 giờ đầu sau đó tăng chậm trong 16 tiếng tiếp theo. Kết quả tại mốc thời gian 24 tiếng có thể xem xét như một giá trị tham khảo cho kết quả đánh giá độc tính tế bào sau này. Nồng độ thực tế có thể dùng để so sánh với nồng độ gây độc tế bào từ đó đánh giá chính xác lượng COS cần để sử dụng cho băng gạc có thể hỗ trợ kháng khuẩn lành thương nhưng không gây độc cho tế bào trong cơ thể.

### 3.2.8. Khảo sát và đánh giá tính kháng khuẩn của màng

Khảo sát khả năng kháng khuẩn của màng PA so với màng đối chứng PCL, phương pháp khuếch tán qua đĩa thạch không cho kết quả đối với màng PCL chứa AgNPs 0,02 % (w/w) (PA).



Hình 19. Hình ảnh (A) Các vùng ức chế được hình thành bởi màng (1) penicillin-streptomycin , (2) PA và (3) PCL trên chủng *S. aureus*, (B) Đĩa agar trải dung dịch chiết màng PCL, (C) Đĩa agar trải dung dịch chiết màng PA, (D) mẫu đối chứng trải dung dịch khuẩn nuôi t trong môi trường penicillin-streptomycin . (Thanh tỷ lệ: 10 mm, số lần lặp =4).

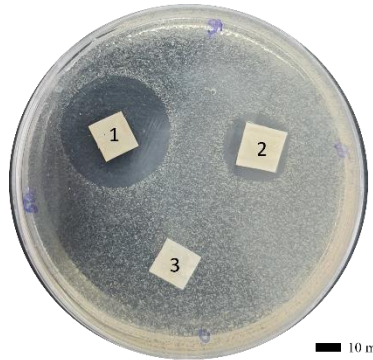
Bảng 5. Hiệu suất kháng khuẩn của dung dịch chiết màng PA trong 24 giờ.

Sample	Antibacterial efficiency (%)
PA	79,4%

Giải thích cho hiện tượng không tạo vòng kháng ở màng PA (Hình 19), ta thấy lượng AgNPs được chế tạo bắt gọn trong các sợi nano PCL, từ đó khả năng giải phóng AgNPs bị giới hạn. Đồng thời, trên bề mặt thạch không dung môi, lượng AgNPs không thể giải phóng dẫn đến giới hạn khả năng khảo sát tiềm năng kháng khuẩn của AgNPs. Từ lý do này, phương pháp AATCC 100 (Antimicrobial Fabric Test): là phương pháp xét nghiệm kháng khuẩn định lượng được sử dụng để phát hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn trên vật liệu màng được sử dụng. Kết quả cho thấy ở hình Hình 19-B, màng PCL cho thấy, ở nồng độ thấp  $10^5$  CFU/mL, hình thành các cụm colony khuẩn *S. aureus*, trong khi đó hình Hình 19-C cho thấy khả năng ức chế sự kháng khuẩn của màng PA ở cùng nồng độ khuẩn so sánh với hiệu suất là 79,4%.

Khả năng kháng khuẩn của màng PAC5-3 được khảo sát trên dòng khuẩn *S. aureus* bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa thạch, kết quả thể hiện ở Hình 19. Xuất hiện vùng kháng khuẩn ở dòng *S. aureus*. Vùng kháng khuẩn được hình thành khi màng tiếp xúc với *S. aureus* sau 24 giờ, kích thước tương ứng là  $238,73 \pm 11,8$  mm so với màng đối chứng penicillin-streptomycin có đường kính vòng kháng trung bình là  $386,4 \pm 14,9$  mm (Bảng 6).

Bảng 6. Vùng kháng khuẩn của 3 nhóm màng penicillin-streptomycin , PAC5-3 và PCL.



Sample	Zone of inhibition (mm)
Penicillin-streptomycin	$386,40 \pm 14,9$
PAC5-3	$238,73 \pm 11,8$
PCL	0

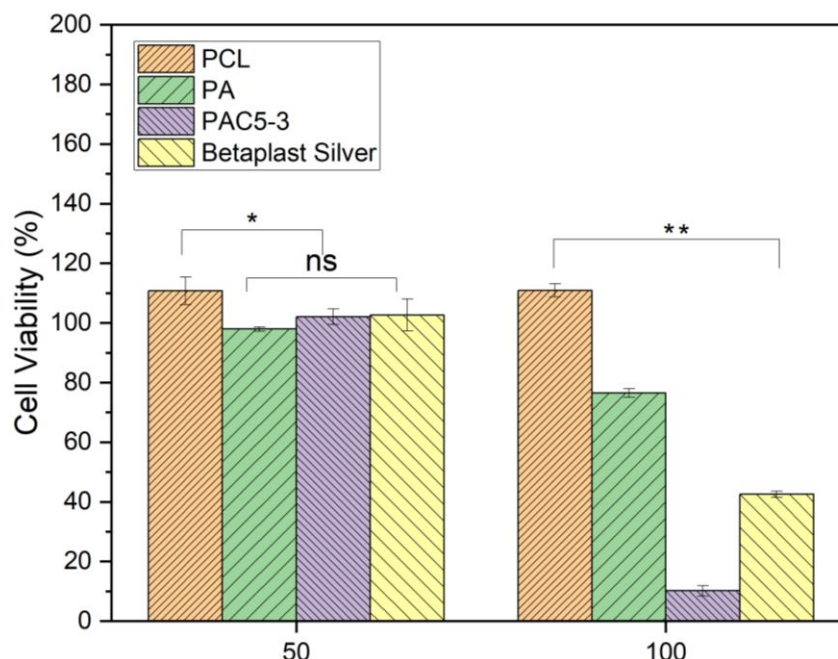
Hình 20. Các vùng ức chế được hình thành bởi màng (1) penicillin-streptomycin , (2) PAC5-3 và (3) PCL trên chủng *S. aureus*. (Thanh tỷ lệ: 10 mm, số lần lặp =4).

Khoảng thời gian cho quá trình chữa lành vết thương bị ảnh hưởng bởi kích thước vết thương và bất kỳ sự gián đoạn nào bao gồm cả nhiễm trùng. Nhiễm trùng vết thương là tình trạng vi khuẩn phát triển quá mức, tăng cường và kéo dài giai đoạn viêm.

Điều này có thể làm tình trạng vết thương trở nên trầm trọng hơn, thậm chí tệ hơn là dẫn đến vết thương mãn tính không lành hoặc nhiễm trùng lan rộng [47]. Do những hậu quả nghiêm trọng này, việc ngăn ngừa nhiễm trùng là một trong những mục tiêu quan trọng khi thiết kế sản phẩm chăm sóc vết thương. Thí nghiệm cho thấy một kết quả ấn tượng là PAC5-3 ức chế hiệu quả chủng *S. aureus* . Vùng ức chế được hình thành bởi penicillin-streptomycin lớn hơn so với PAC5-3. Tuy nhiên dựa vào biểu đồ tiêu chuẩn diễn giải đường kính vùng để xác định tiềm năng kháng sinh [48]. Kết quả được xem như khả năng kháng khuẩn của màng được đánh giá có độ nhạy trung bình.

### 3.2.9. Khảo sát và đánh giá độc tính tế bào của màng

Thử nghiệm khử resazurin được thực hiện để đo khả năng sống sót của tế bào sau khi nuôi cấy trong dung dịch chiết trong 24 giờ, từ đó đánh giá độc tính tế bào của vật liệu. Theo kết quả trên hình , khả năng sống sót của tế bào là 102% sau khi nuôi cấy trong dung dịch chiết 50% từ mẫu PAC5-3. Tuy nhiên, việc tiếp xúc với nồng độ 100% làm giảm tỷ lệ sống sót của quần thể tế bào xuống 10%, thấp hơn đáng kể so với PA(76%).



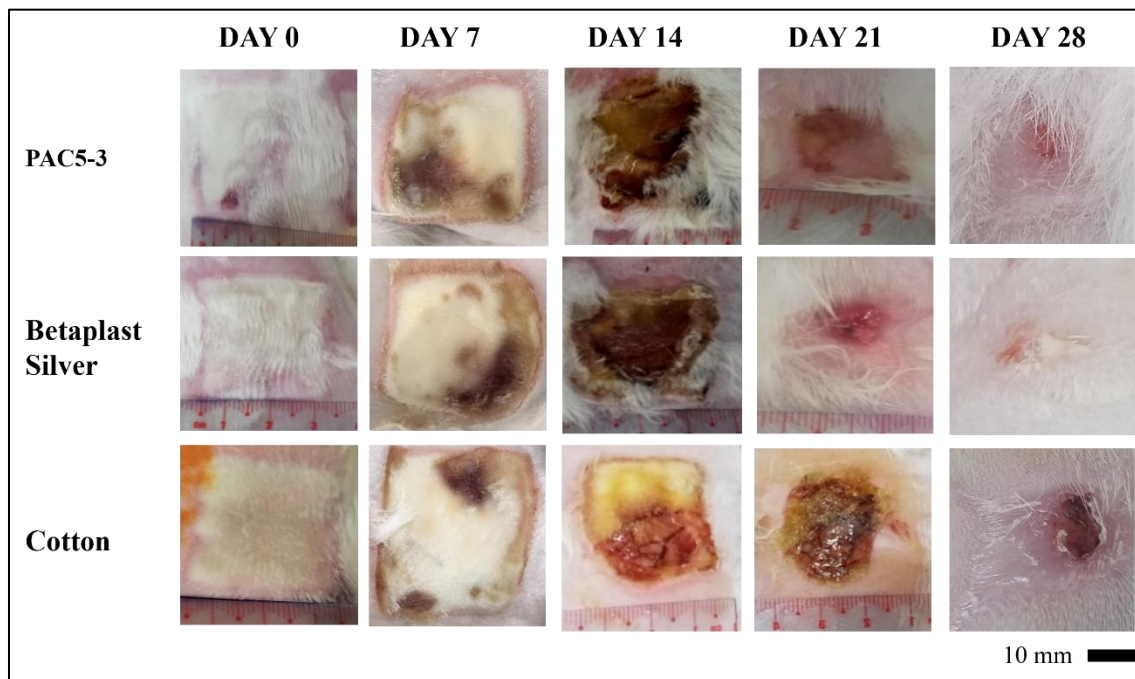
Hình 21. Khả năng sống (%) của nguyên bào sợi sau 24 giờ ủ ở các nồng độ khác nhau của dung dịch chiết PCL, PA, PAC5-3 và màng Betaplast Silver (dữ liệu = trung bình  $\pm$  SD,  $n = 3$ , ns:  $p > 0,05$ , \*:  $p < 0,05$ ).

Băng vết thương không được gây độc tế bào hoặc tổn thương mô tiếp xúc. Tuy nhiên, màng Pac5-3 khiến gần 90% tế bào bị tiêu diệt. Cụ thể, polymer có trọng lượng phân tử cao với cấu trúc mở rộng và các nhóm tích điện dương có thể dễ dàng liên kết với màng tế bào và cản trở quá trình trao đổi chất và hô hấp của chúng. Mặc dù chiết xuất từ màng PAC5-3 tiêu diệt hầu hết các tế bào, nghiên cứu không thể khẳng định rằng màng không phù hợp để sử dụng băng vết thương vì nồng độ khảo sát khác xa so với nồng độ phóng thích COS thực tế. Đồng thời, có sự khác biệt lớn giữa các thí nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Giải thích rằng khi dịch chiết trong *in vitro*, sự tương tác là trực tiếp giữa tế bào sống và các chất được phóng thích, tuy nhiên, khi sử dụng trên mô hình *in vivo* thì các lớp tế bào da cùng cơ chế bảo vệ từ cơ thể nên chưa thể đưa ra kết luận loại bỏ. Bên cạnh đó, trong xét nghiệm resazurin, các tế bào được phơi nhiễm hoàn toàn trong dung dịch chiết được giải phóng trong 24 giờ. Tuy nhiên, trong các thử nghiệm *in vitro*, quá trình khuếch tán từ từ vào vết thương trong thời gian ngắn hơn, do đó gây ra ít căng thẳng hơn cho các mô bị tổn thương. Do đó, cần phải có một thử nghiệm *in vivo* để đánh giá chính xác tiềm năng của PAC5-3 trong điều trị vết thương.

### 3.1. KHẢO SÁT ĐỘ AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG HỖ TRỢ LÀNH THƯƠNG

#### 3.1.1. Tác dụng điều trị bằng màng PAC5-3

Vết thương bỏng nhiễm khuẩn phải được thay mới các băng gạc hàng ngày đi kèm với việc rửa vết thương. Điều này là hoàn toàn phù hợp trong thực tiễn điều trị bỏng.



Hình 22. Kết quả H&E của da thỏ sau khi điều trị 28 ngày đối với mô hình bỏng nhiễm khuẩn SA được điều trị bằng băng gạc kháng khuẩn PAC5-3, băng gạc thương mại (Betaplast Silver) và băng gạc bình thường (cotton). (Thước đo: 10 mm)

Hình 22 cho thấy vết thương nhiễm mủ và được điều trị tiếp tục cho đến ngày thứ 12, vết thương khô và có biểu hiện lành. Thỏ được tiếp tục theo dõi cho đến ngày 28 thì gây chết nhân tạo và lấy mẫu nhuộm để quan sát khả năng lành thương.

Trong giai đoạn 1 (ngày 0- ngày 7): Sau khi gây bỏng, các vết thương của 3 nhóm điều trị với 3 loại băng gạc (màng PAC5-3, băng gạc thương mại Betaplast silver và băng gạc cotton) tương ứng, quan sát quá trình có thể thấy vết thương ở những ngày đầu (ngày 1-ngày 3) vùng da tạo bong có màu trắng hoặc trắng ngà, viền xung quanh vết thương có màu đỏ. Ở ngày thứ 3, một vài vết thương hơi phồng rộp, cả ba nhóm vết thương bắt đầu chuyển màu sang màu nâu tối và đen. Nhóm vết thương điều trị bằng băng gạc cotton có dấu hiệu lan rộng ra khỏi vùng tạo bong.

Giai đoạn 2: Vết thương sau 10 ngày bắt đầu bong tróc lớp da bong, tuy nhiên việc thay băng gạc 2 ngày/lần và rửa vết thương cùng với sử dụng vòng chống liếm cho thấy hiệu quả trong bảo vệ vết thương bị nhiễm trùng và viêm. Vết thương khô và đóng mảy nhanh. Các vết thương tạo lớp vảy hoàn toàn vào ngày thứ 21.



*Bảng 7. Thể hiện mức độ thu nhỏ vết thương ở nhóm gây nhiễm khuẩn S.A ở ngày thứ 28 ở 3 nhóm đắp màng cotton, Betaplast Silver và PAC5-3.*

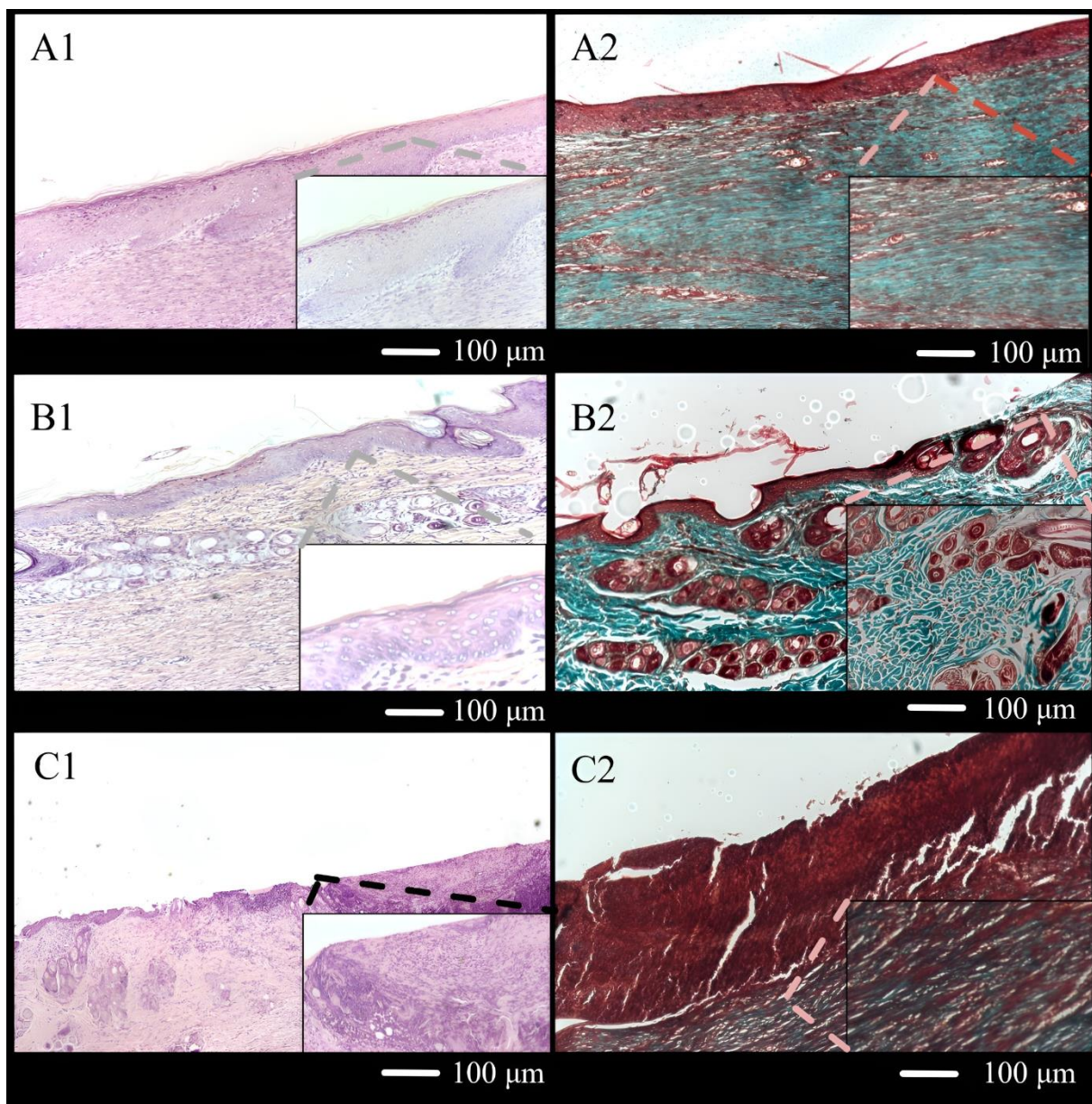
Màng/Băng gạc	Phần trăm lành thương (%)
Cotton (Mẫu đối chứng)	64,0 ± 2,3
Betaplast Silver	82,0 ± 0,6
PAC5-3	85,8 ± 5,8

So sánh độ lành thương ở 3 nhóm đắp màng ở vết thương cấy khuẩn SA khảo sát từ ngày 7 đến ngày 28 cho thấy cả Betaplast Silver và PAC5-3 đều có khả năng lành thương tốt hơn so với màng đối chứng cotton. Ngày thứ 21 cho thấy vết thương đắp màng PAC5-3 và Betaplast Silver đều phục hồi hơn 50% và độ lành thương đạt hơn 80% ở ngày thứ 28.

### **3.1.2. Đánh giá khả năng hỗ trợ lành thương của màng PAC5-3**

Tái tạo biểu mô và hình thành mô hạt được cho là cần thiết để đóng vết thương hiệu quả sau chấn thương da. So sánh kết quả giữa vết thương đắp màng PAC5-3, Betaplast Silver và cotton. Có thể thấy quá trình tái tạo biểu mô và hình thành mô hạt đã được hình thành ở vết thương đắp màng PAC5-3 và Betaplast Silver (mũi tên xanh), trong khi đó vết thương đắp màng cotton vẫn còn vùng viêm và mô chết (mũi tên cam). Vùng tế bào mới tái tạo được tạo ra ở vùng hạ bì, lớp biểu bì gồm các tế bào chất không nhân đang dần dần bị đẩy lên vùng bề mặt da và bị loại bỏ thông qua lớp sừng. Quá trình này tạo nên lớp da tồn tại song song hai lớp: lớp dưới là vùng tế bào mới hình thành dần dần lấp đầy vết thương, trong khi đó, mặt trên là lớp tế bào chết gồm các tế bào không nhân [49]. Giai đoạn tái tạo hình thành trong suốt quá trình tổ chức các ngoại gian bào mới do cơ nguyên bào sợi thực hiện. Các tế bào này liên kết với các bó vi sợi dẫn đến sự liên kết chặt chẽ mới. Lúc này phản ứng sinh học cũng tiết ra hàng loạt hoạt chất mới giúp tăng mật độ và ổn định chất nền. Song song với đó, quá trình sửa đổi phần trăm collagen cũng được thực hiện tạo thành collagen I và collagen III. Sau đó, nguyên bào sợi sẽ được phân hủy, tổng hợp các ngoại gian bào khỏe mạnh góp phần cho vết thương được liền nhanh chóng[50]. Nhuộm Masson's Trichrome (MT) được sử dụng để hình dung các

mô liên kết, đặc biệt là collagen, trong các phần mô.



Hình 23. Kết quả nhuộm H&E và MT của mẫu vết thương cấy khuẩn SA đắp màng PAC5-3, Betaplast silver, cotton. (Thước đo: 100µm).

Trong quy trình tiêu chuẩn, collagen được nhuộm màu xanh (mũi tên vàng), nhân được nhuộm màu nâu sẫm, mô cơ được nhuộm màu đỏ và tế bào chất được nhuộm màu hồng. Hình 23 cho thấy lượng collagen trong da được điều trị bằng cotton không nhiều bằng hai sản phẩm băng gạc chứa bạc. Điều này cho thấy việc kháng khuẩn đã hỗ trợ nhiều trong quá trình tái tạo da và lành thương.

Kết quả giải thích quá trình lành vết thương liên quan đến sự di chuyển và tăng sinh của các tế bào, bao gồm tế bào nội mô mạch máu và nguyên bào sợi. Nghiên cứu chứng minh rằng chitosan làm tăng quá trình tái tạo mạch trong mô hạt, cho thấy tác dụng có lợi của chitosan đối với sự tăng sinh tế bào nội mô mạch máu [51]. Hơn

nữa, nghiên cứu hiện tại cho thấy COS cũng làm tăng nguyên bào sợi trong mô hạt. Sự gia tăng số lượng nguyên bào sợi chủ yếu phát sinh do sự tăng sinh của các nguyên bào sợi thường trú để đáp ứng với các yếu tố tăng trưởng, bao gồm cả nguyên bào sợi di chuyển từ mô liên kết xung quanh vào vị trí vết thương.

#### CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Bước đầu thành công trong việc chế tạo COS từ Chitosan- hợp chất tự nhiên có được từ nguồn Chitin có sẵn trong tự nhiên. Trải qua quá trình khảo sát, kết quả khả quan ứng dụng trong vật liệu kháng khuẩn, đặc biệt là băng gạc kháng khuẩn lành thương. Kết quả khảo sát trên dòng *Staphylococcus aureus* hay Tụ cầu vàng là một loài tụ cầu khuẩn Gram-dương hiếu khí, và là nguyên nhân thông thường nhất gây ra nhiễm khuẩn trong các loài tụ cầu. Khoảng 20% dân số loài người là vật mang lâu dài của *S. aureus*. và tỉ lệ có thể lên tới 80% đối với những người làm việc ở các cơ sở y tế, những người sử dụng kim tiêm thường xuyên (như bệnh nhân tiểu đường), bệnh nhân nằm viện và những người có hệ miễn dịch suy yếu [52]. Bước đầu cho thấy kết quả khả quan khi sử dụng COS kết hợp cùng AgNPs tăng tính kháng khuẩn cho màng, ứng dụng cho băng gạc lành thương. Quá trình chế tạo cũng cho thấy tiềm năng đạt các tiêu chuẩn cơ bản cho một băng gạc bao gồm tính chất cơ lý, tính chất hóa học và độ tương thích sinh học ở mức chấp nhận. Bên cạnh đó, quá trình khảo sát phương pháp nhúng phủ lớp COS-PVP cho thấy tiềm năng ứng dụng sử dụng ở quy mô lớn. kết quả cho thấy lớp phủ hết bề mặt, đều.

Cuối cùng là sử dụng màng PAC5-3 cho thí nghiệm trên mô hình bỏng ở thỏ cho thấy kết quả khả quan khi so sánh với màng thương mại Betaplast silver đều đạt trên 80% sau 28 ngày điều trị. Vì màng PAC5-3 được chế tạo giống như một chiếc băng gạc y tế bình thường nên rất dễ sử dụng. Diện tích của nó có thể thay đổi rộng, hẹp khác nhau nên được dùng đối với mọi tổn thương da từ nhỏ đến lớn: các tổn thương da do bỏng nhỏ đến vùng da bỏng lớn. Băng gạc chứa nano Ag với cơ chế phóng thích từ từ và liên tục sẽ có tác dụng kháng khuẩn tốt trong quá trình điều trị vết thương bỏng. Việc kết hợp khả năng kháng khuẩn của cả nano Ag và COS đem hiệu quả cao trong điều trị vết thương bỏng, bảo vệ vết thương không nhiễm trùng, đồng thời giảm đau cho bệnh nhân trong khi tháo băng. Hiệu quả điều trị vết thương điều trị bằng màng PAC5-3 cho phép giảm thời gian điều trị đồng thời giảm chi phí điều trị đối với vết thương bỏng. Hơn nữa có thể mở ra một hướng mới ứng dụng công nghệ nano trong điều trị vết thương bỏng với chi phí phù hợp điều kiện kinh tế của nước ta. Tuy nhiên, nghiên cứu cần thực hiện sâu vào các quá trình chế tạo, đặc biệt ở quy mô Pilot và khả năng chế tạo ở mô hình công nghiệp. Bên cạnh đó, quá trình đánh giá khả năng điều trị cũng như các tác dụng phụ như khả năng gây kích ứng do thành phần COS đối với các bệnh nhân dị ứng với các thành phần của tôm, cua. Hơn nữa, mô hình thử nghiệm trên động vật lần lặp đi lặp lại nhiều lần để đảm bảo tính an toàn và độ lặp lại tin tưởng trước khi có thể đi vào giải đoạn ứng dụng cho người. Cuối cùng là quá trình nghiên cứu trong luận văn vẫn cần thêm thời gian để đánh giá nhiều tính chất của màng PAC5-3.

## **DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

# The effect of silver nanoparticle concentration on the antibacterial properties of tri-layer PCL-Ag/PT/PVP wound dressing

Thi Thanh Ngoc Nguyen, Thi Thanh Tam Phan, Thi Hiep Nguyen\*

School of Biomedical Engineering, International University, Vietnam National University-Ho Chi Minh City, 6 Quarter, Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 6 January 2023; accepted 20 February 2023

## Abstract:

To comprehensively manage wound infection, tri-layer fibre membranes have been designed with two antibacterial agents, including silver nanoparticles (AgNPs) and chitosan oligosaccharide (COS), and their antibacterial properties were evaluated using qualitative and quantitative tests. While the first polycaprolactone (PCL) silver layer and the second plasma-treated PCL layer were fabricated by electrospinning, the third COS layer was constructed via coating and heat-vacuum drying. The formation of the membranes and their fibrous and porous structures were examined using scanning electron microscopy (SEM). The antibacterial activities of the membranes against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* were examined by disk diffusion and percentage reduction assays, which were performed simultaneously as per the certificates from the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city. The tri-layer membranes, named PCLAg50/PT (plasma treatment)/COS and PCLAg500/PT/COS, achieved desirable antibacterial results with extensive inhibition zones and bacterial reduction rates ranging from 99-100%. In addition, while the PCLAg500 membrane exhibited broad inhibition zones and reduction rates ranging from 94.6-97%, the PCLAg50 membrane achieved reduction rates ranging from 67.5-82.1% despite the absence of inhibition zones. As a result, the fabricated tri-layer membranes could reduce local and opportunistic infections. Depending on infectious risks, the concentration of silver utilised as an infection-prevention agent must be adjusted from 50 to 500 ppm to ensure safety.

**Keywords:** antibacterial, chitosan oligosaccharide, electrospinning, plasma treatment, polycaprolactone, polyvinylpyrrolidone, silver nanoparticles.

**Classification number:** 3.6

## 1. Introduction

Traditional dressings have often favoured cotton gauze to dress all types of wounds [1]. Over centuries, advanced dressings have evolved into numerous forms including adherent dressing, semipermeable films, hydrocolloids, hydrogels, alginates, foam dressings, and antimicrobial dressings, effectively supporting treatment for different types of wounds [2, 3]. Among these, antimicrobial dressings play a crucial role in wound infection management or at least in preventing potential risks from external pathogens [4]. In clinical practice, the use of commercial dressings containing antiseptic substances leads to a significant alleviation in wound severity and treatment-related burdens [5]. Besides antibacterial properties, ideal dressings should enable gaseous exchange, exudate absorption, waterproofing, and painless removal [6]. To meet these requirements,

ideal dressings should be designed with three layers: an inner-contact layer, a middle absorbent layer, and an outer waterproof layer with suitable characteristics [7]. The inner layer, in direct contact with the wound site, plays a critical role in treating infection and promoting tissue regeneration, necessitating essential features such as antibacterial capability, absorption, and biocompatibility [8]. Meanwhile, the middle layer primarily absorbs the exudate and maintains moisture in the wound bed, while the outer layer, which covers the wound surface and prevents the invasion of pathogens, needs to be waterproof, mechanically robust, and antibacterial [9]. Consequently, dressing characteristics that promote the healing process have attracted significant interest from scientists for further investigation.

Focusing on antibacterial properties, various antiseptic substances used in wound dressings, such as silver,

\*Corresponding author: Email: nthiep@hcmiu.edu.vn

chitosan, chlorhexidine, iodine, etc., have proven effective to treat infectious wounds [10]. Among these, silver in the forms of silver ions or silver nanoparticles is known for its outstanding antibacterial efficiency against a wide range of bacteria, including antibiotic-resistant strains [11, 12]. Historically, silver's mechanism of action involves its positive charges entrapping and penetrating the negatively charged bacterial membrane, triggering the disruption of the respiratory process and resulting in bacterial death [13]. Simultaneously, silver nanoparticles convert into silver ions to prolong the antibacterial effect [14, 15]. However, drawbacks related to overdosing or silver's metal ion form have also been documented [16]. Hoping to achieve low toxicity, COS have been proposed as an additional antibacterial indicator.

Although COS dissolves in water or organic solvents, facilitating its use in wound dressings without causing toxicity, it may be rapidly released and degraded in the exuding wounds, shortening the antibacterial treatment duration due to its low molecular weight. To address these limitations, researchers have studied the combination of polyvinylpyrrolidone (PVP) with COS to increase molecular weight. PVP, a non-ionic and water-soluble polymer, is widely used in pharmaceutical applications and approved by Food and Drug Administration. In wound dressings, its advanced properties include hygroscopicity, attributed to the presence of vinylpyrrolidone, which helps to absorb exudate and maintain moisture in the wound bed, significantly promoting wound healing.

Regarding the foundation of wound dressings, numerous polymers have been combined to synthesise multi-functional membranes with advanced characteristics such as high tensile strength, waterproofness, wettability, and biocompatibility. Notably, the electrospinning technique has been widely applied to produce fibre membranes with advanced features for wound dressing, thanks to polymers. Many researchers have taken an interest in a synthetic material known as PCL, which is utilised to fabricate electrospun membranes with exceptional mechanical, physical, elasticity, and hydrophobic properties. Consequently, it can cover and protect the wound from the external forces while preventing unexpected leakage or absorption. Another advantage of PCL-based membranes is their scaffolding, which can entrap and stabilise silver nanoparticles.

One study reported that silver nanoparticles loaded in PCL electrospun membranes, with a silver content of 500 ppm, exhibited excellent growth inhibition against both

gram-negative and gram-positive bacterial strains [17]. In contrast to PCL's features, PT is known as a method to improve polymer wettability. In several studies, a time-stable wetting effect on plasma-treated polymers helped manage weak hydrophobic properties. In fact, PCL surface are hydrophobic, which limits their compatibility with human tissue essential for such applications as dressings. In the dressing application of plasma-treated polycaprolactone, its functional group anchors to the PCL backbone, and these groups tend to etch the polymer surface and attract other hydrophilic components [18]. As a result, the plasma-treated membrane is not only wettable but also a scaffold for hydrophilic solution coatings. In addition, this membrane possesses good mechanical strength and biocompatibility, both of which have been widely utilised in biomedical applications. In another investigation, membranes coated with COS/PVP also demonstrated growth inhibition of both gram-negative and gram-positive bacterial strains [19]. However, this research focuses on the antibacterial properties of silver and COS in polymeric electrospun membranes, encompassing not only growth inhibition but also bactericidal performance.

This work aims to evaluate the antibacterial properties of tri-layer membranes containing two antibacterial agents, COS and AgNPs, against *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* using qualitative and quantitative testing. The tri-layer membranes consist of: (1) an outer layer with a PCL membrane loaded with silver nanoparticle (50 ppm and 500 ppm), serving as the waterproof cover to maintain an aseptic environment; (2) a middle PCL/PT layer primarily for absorption; and (3) an inner layer featuring COS/PVP coatings, intended to treat wound infections, maintain moisture, ensure non-adherence. Additionally, these membranes were re-examined objectively to confirm their high reliability at the Institute of Hygiene and Public Health.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

PCL (80,000 Da) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO (USA). PVP K30 (40,000 Da), silver nitrate ( $\text{AgNO}_3 \geq 99\%$ ), acetone ( $\text{AC}$ ,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , 99.5%), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (v/v) reagent, EtOH ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) (100%), and Tween 20 were produced by Xilong Chemical Co., Ltd. (China). Low-viscosity chitosan (CS) (270 kDa) was purchased from Dao Nguyen, Vietnam. Mueller-Hinton broth (MHB)

was supplied by Hi-Media (India). Muller-Hinton agar (MHA) was purchased from Oxoid, UK. CN Agar for *P.* was purchased from Biokar Diagnostics, France. Bacteria *P. aeruginosa* ATCC 9028, *E. coli* ATCC25922, and *S. aureus* ATCC 25913 were supplied from the Marine Laboratory, International University - Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Viet Nam. All chemicals were analytical grade and were used directly without further purification.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Preparation of PCLAg solutions with silver concentrations of 50 and 500 ppm and PCL solution

AgNO<sub>3</sub> solution (100,000 ppm) was prepared by dissolving 1.573 g of AgNO<sub>3</sub> in 10 ml DMSO solvent in a dark container, stirring at 200 rpm for 1 hour at room temperature. A PCL solution (12% w/v) was then prepared by dissolving PCL pellets in fresh acetone, stirring at 400 rpm at 70°C for 4 hours. After that, 2.5 ml of freshly prepared liquid AgNO<sub>3</sub> was added to 497.5 ml of PCL solution while stirring at 400 rpm for 30 min at room temperature. The solutions of silver nanoparticles stabilised in PCL were successfully prepared by  $\gamma$ -ray (Co-60) irradiation at a dose of 15 kGy and dose rate of 6.5 kGy/h by Gamma GC-5000 (Brit, India), following a previously described procedure [17]. Additionally, the PCLAg50 solution was also obtained by diluting the irradiated PCLAg500 solution ten times with PCL solution (12% w/v).

### 2.2.2. Preparation of membranes: PCLAg50 and PCLAg500

The electrospun membranes were fabricated with an electrospinning machine designed by the School of Biomedical Engineering, International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh City. The following parameters were used: feed rate of 2.5 ml/h, voltage of 15 kV, the rotation speed of 150 rpm, collecting membrane area of 600 m<sup>2</sup>, 10 ml syringe, and 18G needle. The bilayer membranes were electrospun with three syringes set up in parallel, and the volumes of PCLAg solution and PCL solution were 45 ml and 15 ml, respectively. PCLAg50/PCL and PCLAg500/PCL (10x10 cm) were placed at the center of the plasma chamber (GaLa Instrumente, Germany) for 2 min of air plasma treatment under the following conditions: 30 W RF power and a frequency of 13.56 MHz.

### 2.2.3. Preparation of solution: COS-PVP

The coating solution containing COS and PVP was formulated in accordance with previous work [19]. Firstly, chitosan (3%w/v) was immersed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (6% v/v)

and stirred at 90°C for 4 hours. The COS-formed solution was filtered before the PVP powder (6% w/v) was added to and stirred for 30 min at room temperature.

### 2.2.4. Preparation of the tri-layer membranes: PCLAg50/PT/COS and PCLAg500/PT/COS

The bilayer membranes were cut into 6x6 cm pieces and placed in a 5x5 cm exposure area mold. Then, 6 ml of COS-PVP solution was coated onto the surface of the PCL-PT layers in three equal portions. After each coating, they were dried in a vacuum oven at 40°C for one day. Finally, the total collection area of the coated membrane was 5x5 cm. All samples were fabricated with the following parameters shown in Table 1 below.

**Table 1. The content of components in the PCLAg/PT/COS membrane.**

LAYER	PCL	SILVER		COS
PCLAg	12% w/v	50 ppm	500 ppm	-
PCLAg/PT				-
COS	-	-	-	0.18% w/v

### 2.2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphologies of all the membranes were determined by SEM (JSM-IT100 and Smart Coater, JEOL, Japan). After that, the fibre diameter and the porosity of the membrane were measured by ImageJ software (NIH, Maryland, USA).

### 2.2.6. Antibacterial experiments

**Quality antibacterial experiment:** The agar diffusion standard method was employed as a quick qualitative evaluation of the antibacterial susceptibility of specimens [20]. The prepared bacterial culture of 10<sup>6</sup> CFU/ml was transferred to sterile agar disks of 90 mm diameter containing 15 ml Miller-Hinton agar. Then, 10x10 mm square samples were gently placed on the surface of the inoculated disks. The disks were incubated for 18-24 hours, and the results were demonstrated by measuring the diameter of inhibition zones around the specimens. The experiments were triplicated.

**Quantitative antibacterial experiment:** The AATCC100 method was employed as a quantitative evaluation of the antibacterial performance of specimens over 24 hours [21]. An antibacterial membrane and two blank membranes (controls) with diameters of 4.8 cm were placed into separate 250 ml flasks and then 1 ml of diluted suspension with 10<sup>5</sup> CFU/ml was added dropwise. Immediately after, 100 ml of sodium chloride 0.9% was added to the control flasks, and

the bacteria was shaken out from the membrane. Then, 100 µl of this solution was spread on the surface of Miller Hinton agar disks (except for the *P. aeruginosa* sample, which used the CN agar disk) and inoculated at 37°C for 18-24 hours. Finally, the number of bacterial colonies was counted as A. The two remaining flasks were simultaneously inoculated at 37°C for 18-24 hours. As in the preceding procedure, the number of bacterial colonies shaken out of the antibacterial membrane and the blank membrane were denoted as B and C, respectively. The experiments were triplicated. The results are expressed by the formula:

$$R (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

where R (%) is the percentage reduction; A is the number of bacteria recovered from the blank membrane immediately after being treated; B is the number of bacteria recovered from the inoculated antibacterial specimen after 24 hours.

### 2.2.7. Statistical analysis

Statistical analysis and graphs were done using Origin Pro 8.5.1. Differences between samples were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student's T-test. Data were expressed as mean ±SD.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Evaluation of surface morphology

The successful fabrication of the tri-layer membranes (including the outer PCLAg layer with two silver concentrations of 50 and 500 ppm, the middle PCLAg/PT layer, and the inner COS-coated layer) and the PCL membrane is demonstrated in Fig. 1. Fig. 1A provides the SEM micrographs, Fig. 1B shows the distributions of the fibre diameters, and Fig. 1C shows the distributions of the pore diameters. All membranes were produced with non-beaded fibres stacked on top of each other to create a bulging and porous structure. There is no significant difference in fibre diameters between groups containing silver concentrations of 50 and 500 ppm. The outer layers of PCLAg50 and PCLAg500 have mean fibre diameters of 1.07 and 1.05 µm, respectively. Compared to those in the outer layers, the fibres in the middle layers, including PCLAg50/PT and PCLAg500/PT, increased slightly to approximately 1.18 and 1.17 µm, respectively. Changes in the surface of all layers were also observed in the mean diameter of porosity. The outer PCLAg layers had mean porosity sizes around 11.51 and 12.89 µm. However, the coated COS layers had significantly reduced mean porosity diameters of 7.76 and 9.45 µm, with only 10% of porosity visible on the surface. The coating method allowed for covering over 90% of the membrane surface. Both diameter and porosity contributed to creating an ideal membrane for wound dressing applications.

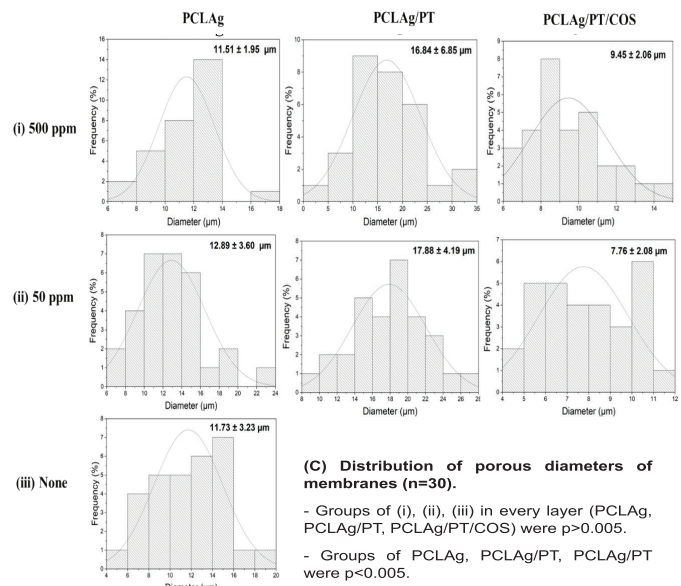
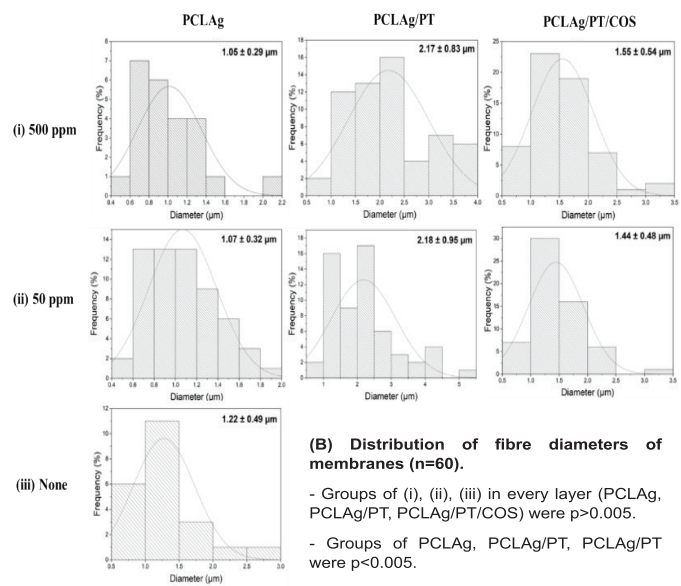
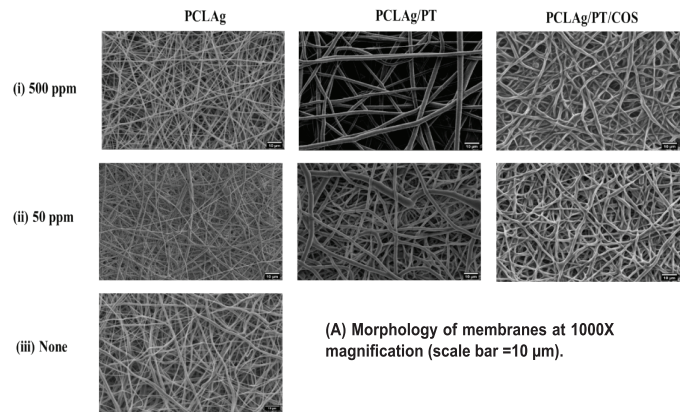


Fig. 1. SEM results of tri-layer membranes including the PCLAg layers, the PCLAg/PT layers, and the COS layers at two concentrations of silver (i) 500 ppm and (ii) 50 ppm.



### 3.2. Evaluation of antibacterial activities

The antibacterial activities of the PCLAg membranes and the tri-layer PCLAg/PT/COS membranes were examined by qualitative and quantitative tests against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* to comprehensively understand their characteristics over a wide range of applications.

In terms of the antibacterial activity, Fig. 2 and Table 2 demonstrate the results of the PCLAg membranes consisting of silver nanoparticles at 50 and 500 ppm, which show that the inhibition zones of the PCLAg500 membrane against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* were 15.3, 11.4, and 13.6 mm, respectively, whereas those of PCL served as the control. For the quantitative results, the reduction percentages of the membrane with a silver content of 500 ppm against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* achieved expected numbers (over 90%). Regardless of the absence of inhibition zones, the PCLAg50 membrane obtained valuable reduction percentage of over 60%. With this reduction in concentration, there is great potential for using low concentrations of silver nanoparticles in dressings to reduce the accumulation of silver in the skin and blood while still possessing a bactericidal potential of more than 50%.

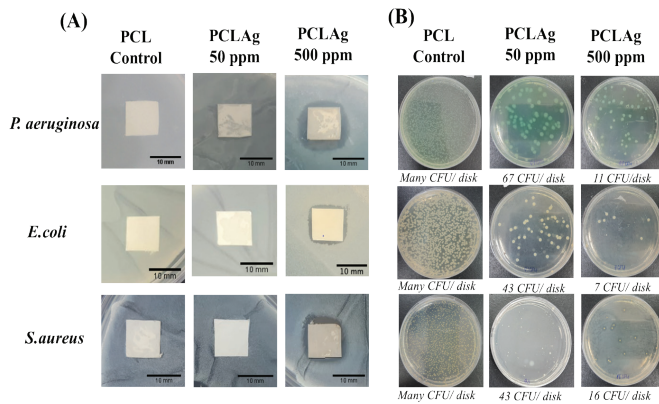


Fig. 2. Images of the antibacterial results of PCLAg50, PCLAg500, and PCL (control) membranes against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*. (A) Inhibition zone with a 10-mm scale bar; (B) bacterial colonies 24 hours after injection (n=3).

Table 2. The inhibition diameter and reduction percentage of PCLAg50, PCLAg500, and PCL (control) membranes against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*.

Sample	Inhibition zone diameter (mm)			Reduction percentage (%)		
	<i>P. aeruginosa</i> (-)	<i>E. coli</i> (-)	<i>S. aureus</i> (+)	<i>P. aeruginosa</i> (-)	<i>E. coli</i> (-)	<i>S. aureus</i> (+)
PCLAg500	15.5±0.05	11.4±0.06	13.6±0.06	94.6	96.8	97
PCLAg50	-	-	-	67.5	86.5	82.1
PCL (Control)	-	-	-	-	-	-

Table 3. The inhibition zone diameter and reduction percentage of PCLAg500/PT/COS, PCLAg500/PT/COS, and PCL (control) membranes against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*.

Sample	Inhibition zone diameter (mm)			Reduction percentage (%)		
	<i>P. aeruginosa</i> (-)	<i>E. coli</i> (-)	<i>S. aureus</i> (+)	<i>P. aeruginosa</i> (-)	<i>E. coli</i> (-)	<i>S. aureus</i> (+)
PCLAg500/PT/COS	13.7±0.03	13.2±0.01	22.4±0.06	100	99	99.4
PCLAg50/PT/COS	11.9±0.03	12.3±0.02	15.2±0.05	100	99	99.3
PCL (Control)	-	-	-	-	-	-

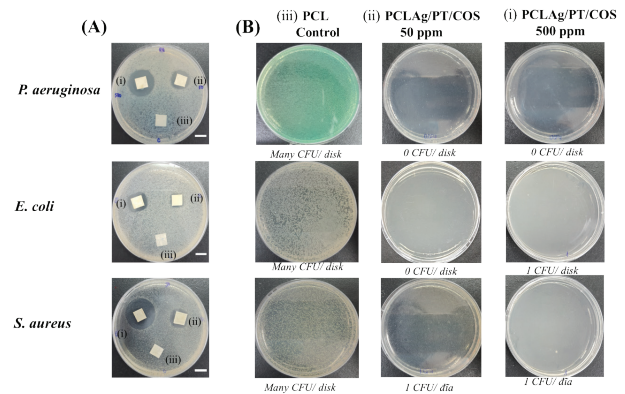


Fig. 3. Images of the antibacterial results of PCLAg50/PT/COS, PCLAg500, and PCL (control) membranes against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*. (A) Inhibition zone with a 10 mm scale bar and (B) Bacterial colonies 24 hours after injection (n=3).

All results from the tests on the tri-layer PCLAg/PT/COS membranes containing silver and COS are shown in Fig. 3 and Table 3. From the qualitative results, Fig. 3A and Table 3 show the inhibition zones of the PCLAg500/PT/COS membranes against three strains of bacteria were considerably higher than those of the PCLAg50/PT/COS membrane and the COS-containing surface in direct contact with bacteria. In detail, while the inhibition diameters of the PCLAg500/PT/COS membranes against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* were 13.7, 13.2, and 22.4 mm, those of the PCLAg50/PT/COS membranes were slightly lower at 11.9, 12.3 mm, and 15.2 mm, respectively. In the quantitative results, Fig. 3B and Table 3 show that the aforementioned membranes have comparable reduction percentages against *P. aeruginosa* (100%) and *E. coli* (99%) with the exception of *S. aureus*, which was about 99.4% for PCLAg500/PT/COS and 99.3% for PCLAg50/PT/COS (the difference was not statistically significant). Therefore, the antibacterial efficiency of the tri-layer membrane at the wound site increased when combined with COS, and the silver nanoparticles seem to be a subsequent antibacterial factor to maintain an aseptic environment around to wound, supporting the healing process. In conclusion, the synergistic effect of COS and silver nanoparticles in the PCLAg/PT/COS membranes not only reduces the wound

infection but also disinfects the surrounding environment to promote healing.

### 3.3. Certification of the antibacterial activities of the tri-layer membranes

PCLAg50/PT/COS and PCLAg500/PT/COS at the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city. To objectively guarantee high accuracy of the antibacterial properties of the tri-layer PCLAg/PT/COS membranes, all membranes were examined through a qualitative test (the AATCC147 Standard) and a quantitative test (the AATCC100 Standard) by the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city. According to the AATCC145 results, both PCLAg500/PT/COS and PCLAg50/PT/COS samples had relatively similar inhibition zones against *P. aeruginosa* (7.6 and 6.7 mm), *E. coli* (3.0 and 3.1 mm), and *S. aureus* (11.1 and 11.6 mm), respectively (Fig. 4 and Table 4). According to the AATCC100 results, both membranes attained reduction percentages of 100% (Table 4). In conclusion, the investigations conducted by the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city demonstrated that PCLAg50/PT/COS and PCLAg500/PT/COS had excellent antibacterial efficacy, agreeing with the aforementioned results.

### 3.4. Discussion

The aim of this study is to gain a comprehensive understanding of the antibacterial properties of tri-layer membranes to apply the concept of antibacterial dressings for the prevention and treatment of infections. The monolayer PCLAg membranes and the tri-layer PCLAg/PT/COS membranes, consisting of two antibacterial agents of AgNPs in the outer layers and COS in the inner layer, were evaluated for their antibacterial effects using two qualitative and quantitative tests. Simultaneously, the completed tri-layer membranes were objectively reassessed for reliability and transparency at a second prestigious institute prior to conducting pilot-scale production process experiments.

With this aim, all fabrication parameters of the PCLAg/PT/COS membranes incorporating the two antibacterial agents - AgNPs and COS - were determined by consulting and selecting appropriate recent research results [19]. Regarding AgNPs, a silver concentration of 500 ppm in PCL (12% w/v) solution was gamma-irradiated at 15 kGy and analysed by UV-vis spectrometry, displaying an absorption peak of 416 nm indicating the formation of AgNPs [17]. Subsequently, the PCL electrospun membrane was produced to encapsulate AgNPs while preserving their structure from rapid silver ion release. PCL, known for possessing advanced qualities such as biocompatibility, high mechanical and physical strength, and hydrophobicity, was used to fabricate the electrospun membrane as the waterproof covering layer. The shape and size ranged from 15-20 nm, with a distribution of around 0.06%, and notably exhibited a high biological effect (*in vitro*), including bacterial inhibition and biocompatibility. Their antibacterial mechanisms have been reported in numerous studies. However, concerns regarding toxicity due to overdosing and metal ions remain. For this reason, a thorough understanding of their antibacterial characteristics in relation to silver concentration is necessary to minimise potential hazards. In this research, silver nanoparticle concentration in the PCL electro-spun membranes were examined at 500 and 50 ppm to broaden applications. Three bacterial strains - *P. aeruginosa* (gram-negative), *E. coli* (gram-negative), and *S. aureus* (gram-positive) - were selected due to their potential to exacerbate wound infections and the persistent treatment burden posed by their antibiotic resistance. In Fig. 1, SEM results showed the formation of electrospun PCL 12 %w/v,

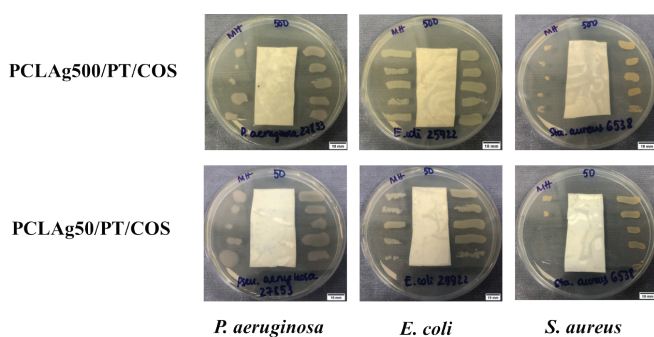


Fig. 4. The inhibition zone images of PCLAg500/PT/COS and PCLAg50/PT/COS membranes against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* implemented by the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city.

Table 4. The inhibition diameters and reduction percentages of the PCLAg50/PT/COS and PCLAg500/PT/COS membranes examined at the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*.

Sample	Inhibition zone diameter (mm)			Percentage reduction (%)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
PCLAg500/PT/COS	7.6	3.0	11.1	100	100	100
PCLAg50/PT/COS	6.7	3.1	11.6	100	100	100

PCLAg500, and PCLAg50 membranes, which had fibre and porous diameters ranging from 1.05-1.22  $\mu\text{m}$  and 11.51-12.89  $\mu\text{m}$ , respectively. These fibre and porous structures allowed these membranes to effectively distribute and capture AgNPs, enhancing their antibacterial capabilities. In Fig. 2 and Table 2, the PCLAg500 effectively demonstrated its antibacterial properties against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*, with inhibition diameters of 15.5, 11.4, and 13.6 mm, respectively, and reduction percentages of 94.6, 96.8, and 97%, respectively. In contrast, the PCLAg50 membrane, with a silver concentration ten times lower at 50 ppm compared to PCLAg500, showed reduction rates of 67.5, 86.5, and 82.1% against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*, respectively, despite the absence of inhibition zones. Owing to their superior characteristics, the PCLAg layer should be utilised as a covering layer to prevent pathogen spread and offensive odours.

For the construction of the absorption layer as the middle, the PCLAg membrane was treated with air plasma to transform it into a hydrophilic agent [19, 21]. The effectiveness of this air plasma treatment and its mechanism have been investigated in numerous previous studies [22]. In this research, Figs. 1B and 1C demonstrate that the fibre (approximately 2.17 and 2.18  $\mu\text{m}$ ) and porous (around 16.84 and 17.68  $\mu\text{m}$ ) structures of the PCLAg/PT membrane treated with air plasma were slightly higher than those of PCLAg. In fact, air plasma interacts with the surface of the polymer membrane, changing its surface structures [18]. Simultaneously, it has also been reported that air plasma triggers the formation of new polar groups such as hydroxyl (-OH) and carbonyl (-C=O), attracting water molecules [23]. Therefore, the air plasma treatment of the PCLAg layers produced the middle layers, which underwent structural changes accompanied by the modification of hydrophilic properties. These characteristics facilitate coating of hydrophilic solutions to form the inner layer.

For the fabrication of the third layer, bioactive substances are often incorporated and directly applied to the wound site to promote healing. In the case of an infected wound, several inevitable issues, such as pathogens, excessive exudate, and physical soft tissue injury, impede the healing process. Hence, a membrane coated with COS-PVP solution has proven biological advantages to promote wound healing owing to its excellent antibacterial activity, hemostatic

action, and biocompatibility. In detail, COS, a naturally derived bioproduct from shrimp, is known for its antibacterial properties and, especially, its outstanding biocompatibility in tissue engineering applications [24]. Although the exact mechanisms remain unclear, several theories suggest that protonated amine groups in COS interact with the bacterial membrane, leading to leakage of intracellular constituents or disrupted nutrient transportation. However, COS exhibits weak stability due to the low molecular weight, making it difficult to achieve maximum antibacterial performance.

To enhance the benefits of COS, PVP is combined with COS in the coated layer as a delivery agent [19], which supports exudate absorption, moisture retention, and COS delivery to the wound bed. This means that the dressing could absorb exudates and release the maximum amount of COS with the assistance of PVP, increasing its antibacterial performance and healing progress. Additionally, the coating the COS/PVP layer onto the other two layers during use facilitates painless removal. In previous studies, the electrospun membrane coated with 6 ml COS (3% w/v) and PVP (6% w/v) solution was demonstrated to inhibit bacterial growth (*in vitro*) and promote wound healing (*in vivo*). In this work, the formation of a coated layer was evidenced by a significant decrease in porous diameters to 9.45 (PCLAg500/PT/COS) and 7.76  $\mu\text{m}$  (PCLAg50/PT/COS) (Fig. 1). In Fig. 3 and Table 3, although the inhibition zones of PCLAg500/PT/COS membrane against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* were 13.7, 13.2, and 22.4, wider than those of the PCLAg50/PT/COS at 11.9, 12.3, and 15.2 mm, the bacterial reduction results of both membranes were comparable around 100, 99, and 99.4%, respectively.

Finally, the antibacterial tests reassessed at the Ministry of Health Institute of Public Health in Ho Chi Minh city showed that the PCLAg500/PT/COS and PCLAg50/PT/COS membranes achieved broad inhibition zones of approximately 7.6, 6.7, 3.0 and 3.1 11.1, and 11.6 mm, respectively, against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*, respectively, will all exhibit reduction percentages of 100% (Fig. 4 and Table 4). In fact, both tri-layer membranes obtained optimal antibacterial performance despite the silver concentration being 50 ppm or 500 ppm, comparable to the results above. While a silver concentration of 500 ppm captures attention for its high antibacterial performance in sterilising dressing, a silver concentration of 50 ppm still

achieves an acceptable value for infection prevention. In this experiment, silver played a key role in preventing infection by maintaining a sterile environment around the wound by preventing pathogens from entering the wound and helping disinfect the wound fluid. Therefore, a silver concentration of 50 or 500 ppm should be selected by considering the degree of safety and infection.

#### 4. Conclusions

This study reported the antibacterial capabilities of tri-layer membranes containing two antibacterial agents, AgNPs and COS, designated as PCLAg50/PT/COS and PCLAg500/PT/COS, to exploit their synergistic impact for the development of ideal antibacterial wound dressings. The main difference between these two membranes is the concentration of silver nanoparticles in the PCLAg layers of which 50 and 500 ppm were compared to investigate its toxicity due to overdose. The fibre and porous structures of all three layers of the membranes were examined by SEM. The antibacterial performance of both tri-layer membranes reached almost 100%. Meanwhile, the reduction percentages of PCLAg500 were high, approximately 94.6% (*P. aeruginosa*), 96.8% (*E. coli*), and 97% (*S. aureus*). The PCLAg50 membrane values were slightly lower at 67.5, 80.6, and 82.1%, respectively. Although the silver concentration of the outside layer was reduced 10 times to 50 ppm, its reduction percentage was only reduced by 15%. Therefore, applying silver concentrations of 50 or 500 ppm to the outer layer to maintain a sterile wound environment should consider safety and the degree of infection. Finally, applying two antibacterial agents to wound dressings could provide comprehensive antibacterial efficacy to facilitate wound healing.

#### CRedit author statement

Thi Thanh Ngoc Nguyen: Investigation, Sample analysis, Data processing, Methodology, Writing the manuscript; Thi Thanh Tam Phan: Writing the editing, Methodology. Thi Hiep Nguyen: Supervise and comment on editing the manuscript for completeness.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Department of Science and Technology of Ho Chi Minh city under the grant number 01/2020/HD-QPTKHCN.

#### COMPETING INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

#### REFERENCES

- [1] M. Shahriari Khalaji, I. Lugoloobi (2020), "Biomedical application of cotton and its derivatives," in *Cotton Science and Processing Technology: Gene, Ginning, Garment and Green Recycling*, Springer, pp. 393-416.
- [2] S. Dhivya, V.V. Padma, E. Santhini (2015), "Wound dressings - A review", *Biomedicine (Taipei)*, **5(4)**, pp.1-5.
- [3] J. Boateng, O. Catanzano (2015), "Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - A review", *J. Pharm. Sci.*, **104(11)**, pp.3653-3680.
- [4] L. Rutter (2018), "Identifying and managing wound infection in the community", *Br. J. Community Nurs.*, **23** Sup. 3, pp.S6-S14.
- [5] N. Mayet, Y.E. Choonara, P. Kumar, et al. (2014), "A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems", *J. Pharm. Sci.*, **103(8)**, pp.2211-2230.
- [6] Z. Obagi, G. Damiani, A. Grada, V. Falanga (2019), "Principles of wound dressings: a review", *Surg. Technol. Int.*, **35**, pp.50-57.
- [7] L. Qi, K. Ou, Y. Hou, et al. (2021), "Unidirectional water-transport antibacterial trilayered nanofiber-based wound dressings induced by hydrophilic-hydrophobic gradient and self-pumping effects", *Mater. Des.*, **201(5)**, DOI: 10.1016/j.matdes.2021.109461.
- [8] W. Ji, F. Yang, H. Seyednejad, et al. (2012), "Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA-based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation", *Biomaterials*, **33(28)**, pp.6604-6614.
- [9] J.A. Fulton, K.N. Blasiole, T. Cottingham, et al. (2012), "Wound dressing absorption: a comparative study", *Adv. Skin Wound Care*, **25(7)**, pp.315-320.
- [10] A.B. Öztürk, B. Özkahraman, Z. Özbaş, et al. (2021), "Advancements and future directions in the antibacterial wound dressings - A review", *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **109(5)**, pp.703-716.
- [11] M. Rai, A. Yadav, A. Gade (2009), "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials", *Biotechnol. Adv.*, **27(1)**, pp.76-83.
- [12] J. Boateng, O. Catanzano (2020), "Silver and silver nanoparticle-based antimicrobial dressings", *Ther. dressings wound Heal. Appl.*, pp.157-184.
- [13] W.K. Jung, H.C. Koo, K.W. Kim, et al. (2008), "Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli", *Appl. Environ. Microbiol.*, **74(7)**, pp.2171-2178.
- [14] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, et al. (2005), "The bactericidal effect of silver nanoparticles", *Nanotechnology*, **16(10)**, pp.2346-2353.

- [15] M. Raffi, F. Hussain, T.M. Bhatti, et al. (2008), “Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224”, *J. Mater. Sci. Technol.*, **24**(2), pp.192-196.
- [16] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, et al. (2012), “Toxicity of silver nanoparticles-nanoparticle or silver ion?”, *Toxicol. Lett.*, **208**(3), pp.286-292.
- [17] C.M. Tran, N.T.T. Nguyen, M.H. Ho, et al. (2023), “One-pot preparation of antibacterial electrospun polycaprolactone membrane embedded with gamma irradiation-induced silver nanoparticles”, *Fibers Polym.*, **24**, pp.29-43.
- [18] R. Suntornnond, J. An, C.K. Chua (2016), “Effect of gas plasma on polycaprolactone (PCL) membrane wettability and collagen type I immobilised for enhancing cell proliferation”, *Materials Letters*, **171**, pp.293-296.
- [19] V.K. Doan, C.M. Tran, T.T.P. Ho, et al. (2022), “Optimization of oligomer chitosan/polyvinylpyrrolidone coating for enhancing antibacterial, hemostatic effects and biocompatibility of nanofibrous wound dressing”, *Polymers*, **14**(17), DOI: 10.3390/polym14173541.
- [20] E. Pinho, L. Magalhães, M. Henriques, R. Oliveira (2011), “Antimicrobial activity assessment of textiles: Standard methods comparison”, *Ann. Microbiol.*, **61**(3), pp.493-498.
- [21] D. Porrelli, M. Mardirossian, L. Musciacchio, et al. (2021), “Antibacterial electrospun polycaprolactone membranes coated with polysaccharides and silver nanoparticles for guided bone and tissue regeneration”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13**(15), pp.17255-17267.
- [22] I. Levchenko, S. Xu, O. Baranov, et al. (2021), “Plasma and polymers: Recent progress and trends,” *Molecules*, **26**(13), DOI: 10.3390/molecules26134091.
- [23] N.S. Kasalkova, P. Slepicka, Z. Kolska, V. Svorcik (2015), *Wettability and Other Surface Properties of Modified Polymers*, IntechOpen, 384pp.
- [24] T.T.P. Ho, V.K. Doan, N.M.P. Tran, et al. (2021), “Fabrication of chitosan oligomer-coated electrospun polycaprolactone membrane for wound dressing application”, *Mater. Sci. Eng. C*, **120**, DOI: 10.1016/j.msec.2020.111724.

# Studying the influence of solvent concentration on the fabrication of PCL membrane for wound dressing applications

Khiem Nguyen<sup>1,2</sup>, Nghi Nguyen<sup>1,2</sup>, Thanh Ngoc<sup>1,2</sup>, Tam Phan<sup>1,2</sup>, Phuc H. Vo<sup>1,2</sup>, Thao Nhi Dang Ngoc<sup>1,2</sup>, Kieu Nguyen<sup>1,2</sup>, Thi Hiep Nguyen<sup>1,2,\*</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

**Introduction:** The aim of this study is to evaluate the influence of the concentration of acetone (AC) and acetic acid (AA) solvents to fabricate a polycaprolactone (PCL) membrane for wound dressing applications. The viscosity of PCL solutions is evaluated to choose the best AC and AA solvent ratio. **Methods:** The PCL membrane was successfully fabricated by the electrospinning method. The physicochemical properties of the membranes were evaluated using a scanning electron microscope (SEM), fiber diameter distribution, water contact angle measurements, the moisture vapor transmission rate, and a biocompatibility assay. **Results:** The results show that two samples of 15%PCL-AC and 12%PCL-AC are suitable for fabricating the membrane by electrospinning method. **Conclusion:** Therefore, two samples consisting of 12%PCL-AC and 15%PCL-AC with good physical-chemical properties and good biocompatibility can be selected for use in wound dressing applications.

**Key words:** electrospinning, polycaprolactone, acetone, acetic acid, cell adhesion

## INTRODUCTION

Skin is an extremely important organ that protects the human body. While it is often thought of as just an exterior cover, there are various important reactions that take place on the human skin such as microbial defenses, hydration, and thermal control. The innate immune system's first line of protection against infection is the skin, which reduces the likelihood of microbial attacks<sup>1,2</sup>. However, skin is easily prone to external injuries such as bruises, burns, cuts, lacerations, gashes, and tears, causing wounds. When the skin is wounded, one of the major complications is infection, which makes the wound progress from an acute to a chronic condition if the wound site is not treated as soon as possible<sup>3</sup>. Choosing a suitable wound dressing is necessary and important. Various types of wound dressing have been researched by scientists and are manufactured using many different methods in which electrospinning has been applied for gauze fabrication in recent decades<sup>4</sup>. This method is very convenient and has the ability to be used for a variety of polymers with different levels of biological compatibility such as cellulose, gelatin, silk, polyvinyl alcohol, polycaprolactone (PCL), etc<sup>5</sup>. In addition to being able to be used in traditional dressings, the electrospun membrane has demonstrated advantages such as breathability, easy synthesis, and especially the easy addition of other substances to

increase the antibacterial abilities and wound healing support. Among the types of materials used for wound dressing, PCL membranes are outstanding thanks to their mechanical properties, high biological compatibility, and electrospun PCL membranes that hardly deform when influenced by body temperature and room temperature<sup>6</sup>. Electrospinning technology is a simple technology with the ability of high economic efficiency because of the ability to create thin membranes. This saves on the cost of materials during production. Moreover, this technology is gradually becoming popular in the medical industry due to its versatility with many materials. From this process, we can produce different healthcare products using electrospinning which can match the required international quality at lower prices. Electrospinning uses an electrospinner in which the machine structure includes (1) a one-way high-voltage power supply, (2) the fiber collection system, and (3) the electrical syringe system containing the polymer. Electrospinning can produce nanofibers by applying high electric fields. When a high enough voltage is placed in a drop of liquid, the liquid will be charged, and the electrostatic force thrusts against the surface tension from which the liquid drops are stretched to form a spray connected to the membrane collector. Overall, electrospinning is a set of electric fields that control the polymer spray rays in relation to the membrane

<sup>1</sup>Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Biomedical Engineering, International University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### Correspondence

**Thi Hiep Nguyen**, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Biomedical Engineering, International University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: nthiep@hcmiu.edu.vn

### History

- Received: 2022-06-27
- Accepted: 2022-12-30
- Published: 2023-01-20

DOI : 10.32508/stdj.v25i4.3960



### Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article:** Nguyen K, Nguyen N, Ngoc T, Phan T, Vo PH, Ngoc TND, Nguyen K, Nguyen TH. **Studying the influence of solvent concentration on the fabrication of PCL membrane for wound dressing applications.** *Sci. Tech. Dev. J.*; 2022, 25(4):2600-2607.

collection block that forms a non-woven format product. Electrospinning products obtained with a microstructure consist of countless interwoven polymer fibers with a diameter of several hundred nano to several micrometers. The parameters include the properties of the polymer solution (molecular weight, electrical conductivity, conformation of polymer chains, surface tension, and solvent type) while the process parameters include applied voltage, the distance between the needle and collector, electrode geometry, the rotating speed of the collector, the feeding rate of the polymer solution, and the environmental conditions (temperature and humidity)<sup>7</sup>. The viscosity of solution is one of the most important properties<sup>8</sup>. For a successful electrospinning procedure, the selection of an appropriate solution viscosity is among the key parameters because continuous fibers cannot be produced with a solution consisting of low viscosity. At a high viscosity, the electrical charges fail to generate the required strength to attenuate the solution to form fibers. With an increase in viscosity, the amount of polymer chain entanglement of the solution also increased and the shape of the beads transformed from spherical to spindle-like until a smooth fiber was produced. It has been found that the optimum spinning viscosity ranges from 1 to 200 poise approximately a range of 1 to 20 uniform nanofibers can be produced<sup>9</sup>. Therefore, the aim of this study is to evaluate the influence of solvent concentration on the process of creating PCL membranes using the electrospinning method in relation to wound dressing applications.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Polycaprolactone (Mn= 80000, Sigma-Aldrich), Acetone (>99,5%, Xilong), acetic acid (>99,9%, xilong), acetonitrile (>99,9%, Sigma-Aldrich), Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher), Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher), Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher), and Resazurin (Thermo Fisher) were used.

### Methods

The PCL membrane was successfully fabricated using the electrospinning method. The physicochemical properties of the membranes were evaluated using a scanning electron microscope (SEM), fiber diameter distribution, water contact angle measurements, moisture vapor transmission rate, membrane surface hydrophilicity, and a biocompatibility assay.

### Scanning electron microscopy (SEM)

The membranes (1x1 cm<sup>2</sup>) were sputter coated with gold (JEOL Smart Coater, Japan) for 60 seconds. The SEM (JSM-IT100, JEOL, Japan) with an acceleration voltage of 10kV was then used to evaluate the surface and side morphologies of the membranes. The fiber diameter, pore size, and thickness of the membranes were analyzed using the ImageJ software (NIH, USA).

### Water absorbability

The water contact angle measurements were taken according to the following protocol. Principally, 10  $\mu$ l of water droplets were dispensed onto the surface of the membranes using a pipette. Immediately, any change in water droplet shape during the testing period was recorded using the contact angle set including the DSLR camera (Canon) together with a pedestal system. The contact angle of the recorded images was analyzed using the ImageJ software (NIH, USA). The experiment was performed in triplicate at three different locations on the surface membranes.

### Moisture Vapor Transmission Rate (MVTR)

The Moisture Vapor Transmission Rate (MVTR) of the membranes was carried out according to BS EN 13726-2:2002. A cup filled with distilled water was completely covered by the testing membrane of 6x6 cm<sup>2</sup> (A), provided that the membrane was placed 5mm above water level. The system, including the container, membrane, and water, was then weighed (W1, g) before being incubated in an oven at 37°C for 24 hours (T). After that, the whole system was weighed again (W2, g) and the dressing was observed. Each test was replicated five times. The Water Vapor Transmission Rate (MVTR) of the samples was calculated as follows:

$$MVTR = (W_1 - W_2) \times \frac{10000}{A} \times \frac{24}{T} \text{ (g/m}^2 \cdot 24\text{h)}$$

### Tensile strength test

The mechanical strength of the membranes was tested using Texture Analyser (TA.XTplus, Stable Micro Systems, USA). Firstly, specimens with a rectangular shape of 1x3 cm<sup>2</sup> were prepared from the membranes. Prior to testing, the thickness of the membrane was measured using an electronic caliper. The stress and strain graphs of the membrane were reported. The measurements were repeated three times and the data presented as average  $\pm$  standard deviation.

### Biocompatibility assay

First, the membranes (1 cm x 1 cm) were soaked in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cell culture medium (ratio of 0.1g/mL) with 10% bovine serum (Fetal Bovine Serum, FBS) and 1% antibiotic (Penicillin, PS) for 24 h to collect the extracted solution. Secondly, the extracted solution was used to culture L929 mouse fibroblasts in a 96-well culture plate at a concentration of  $10^4$  cells/100 $\mu$ L/well for 24 h. After that, resazurin was added to each well at a concentration of 2  $\mu$ g/100 $\mu$ L and incubated for another 4 hours. Finally, the fluorescence signal was measured at an excitation wavelength of 530 nm and absorption wavelength of 590 nm. The experiments were repeated three times.

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Sigma Plot V.12.0 version (SSI, USA). Differences between samples were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). The data was expressed as the mean  $\pm$  SD and P values, while those that were less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were determined to be statistically significant.

## RESULTS

Table 1 shows that the viscosity results of the PCL solutions with different concentrations of 12%, 15% and 20% (w/v) PCL in AC and AA solvents, along with mixed solvent systems of 7AA:3AC, 8AA:2AC and 9AA:1AC, were recorded. These results show there to be a correlation between the solvents' composition and viscosity as the solution became more viscous with the increasing concentration of AA in the mixture. Specifically, when using the AC solvent, the viscosity of the 12%, 15% and 20% PCL solutions was  $225 \pm 4.96$  cP,  $450 \pm 4.96$  cP and  $1940 \pm 31.04$  cP, respectively. The results also show that the viscosity of the solution was affected by the solvent, where the solution dissolved in AA had a higher viscosity than that of AC. The solution dissolved in a two-solvent system with a changing solvent proportion shows that increasing the ratio of AA and decreasing the ratio of AC will increase the viscosity of the solution. The solution at the same PCL concentration of 20% when dissolved with AA and AC has a viscosity ratio greater than  $1940 \pm 31.04$  cP which is not suitable for the electrospinning method.

More specifically, increasing the AA ratio in the series of solvent mixtures yielded greater viscosity ratings for the newly synthesized 12% PCL membrane (from 225 cP with no AA present up to 515 cP with

only AA present in the solvent). Moreover, in the previous work of the group<sup>10</sup>, PCL membranes were successfully using AC solvent at a 15% PCL concentration corresponding to 450 cP viscosity. In this study,  $450 \pm 4.96$  cP was chosen as the control value and the solution samples with an approximate viscosity value (12% PCL-8AA:2AC) were investigated using the new electrospinning system. A solution of 12% PCL-7AA:3AC, 12% PCL-9AA:1AC and 12% PCL-AA with viscosity values of  $400 \pm 9.04$ ,  $470 \pm 17.84$  and  $515 \pm 9.84$  cP respectively were also chosen due to their resistance regarding the clogging of the nozzle (no need to clear the needle)<sup>11</sup>. In addition, a solution of 12% PCL-AC with a viscosity value of  $225 \pm 4.96$  cP, was also selected for its good membrane forming ability from the experiment. Therefore, the six solution samples of 15% PCL-AC, 12% PCL-AC, 12% PCL-AA, 12% PCL-9AA:1AC, 12% PCL-8AA:2AC and 12% PCL-7AA:3AC were chosen and the other remaining samples were not selected.

Table 2 shows that the two solutions containing 12% PCL-8AA:2AC and 12% PCL-7AA:3AC obtained the high membrane bombardment efficiency in terms of membrane fabrication due to the ratios of AC in the mixed solvent systems of 9AA:1AC, 8AA:2AC and 7AA:3AC being rather ineffective. On the other hand, AA is not a good PCL solubilizer and only plays a role in reducing the evaporation rate of AC, helping to avoid condensation at the injector head and increasing the membrane forming efficiency. However, this creates a granular texture on the surface of 12% PCL-8AA: 2AC (Figure 1c) and 12% PCL-7AA: 3AC (Figure 1d), 12% PCL-9AA:1AC (Figure 1e) and 12% PCL-AA (Figure 1f). This does not happen in the two samples of 15% PCL-AC (Figure 1a) and 12% PCL-AC (Figure 1b). Therefore, two samples of 15% PCL-AC and 12% PCL-AC were determined to be suitable for fabricating wound dressing membranes.

The average sizes of the membranes synthesized from 12% PCL-AC and 15% PCL-AC were  $0.88 \pm 0.40$   $\mu$ m and  $2.29 \pm 0.34$   $\mu$ m. On top of that, the average pore sizes were  $2.13 \pm 0.64$   $\mu$ m and  $8.66 \pm 2.69$   $\mu$ m. Figure 2 shows that when the 12% PCL solution in AC was used, 33,33% of all PCL strands had diameters of 0.4 - 0.6  $\mu$ m and nearly 50% of the pores spanned 1.5-2.0  $\mu$ m across in diameter. Nevertheless, as the concentration of PCL in the solution increased from 12% to 15%, the diameter of the strands, in conjunction with the pore sizes, were observed to increase in lock-step. Additionally, strands with diameters of 2.2-2.4  $\mu$ m made up 36.67% and pores with diameters of 6-8  $\mu$ m made up nearly 50%.



**Table 1: Table of viscosity ratings of PCL solutions at various concentrations of 12%, 15% and 20%, dissolved in AA, AC solvents and mixed solvent systems of 7AA:3AC, 8AA:2AC and 9AA:1AC (n=10)**

	12% PCL	15% PCL	20% PCL
AC	225 ± 4.96	450 ± 4.96	1940 ± 31.04
7AA:3AC	400 ± 9.04	700 ± 6.64	3190 ± 35.84
8AA:2AC	445 ± 11.04	765 ± 18.56	3270 ± 20.16
9AA:1AC	470 ± 17.84	1050 ± 16.56	3475 ± 26.4
AA	515 ± 9.84	1625 ± 9.36	3500 ± 18.32

**Table 2: Table of records from membrane synthesis and membrane bombardment efficiency ratings during the assessment procedure of the effects of PCL concentration and its solvents**

Voltage and Observation Distance	Cleaning of Injector Head	Bead formation	Efficiency Rating (%)
15%PCL-AC	+	-	89 ± 1.04
12%PCL-AC	+	-	90 ± 1.40
12%PCL-AA	-	+	83 ± 1.44
12%PCL-9AA:1AC	-	+	84 ± 1,36
12%PCL-8AA/2AC	-	+	89 ± 1.04
12%PCL-7AA/3AC	-	+	97 ± 1.04

SEM scans and distribution diagrams of the membrane's thickness for the two samples 12% PCL-AC and 15% PCL-AC are illustrated in Figure 3. The results were indicative of a uniform thickness across the membranes synthesized by the electrospinning device with negligible inconsistencies between the measurements. Under the same injection conditions and solution volume (45mL), the membrane made from 12% PCL-AC averaged around  $230.7 \pm 20.1 \mu\text{m}$  of thickness less than the membrane fabricated from the solution 15% PCL-AC of  $301.3 \pm 19.3 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ). This was mainly due to the average strand size of the membrane from 12% PCL-AC being much less, leading to an overall reduction in thickness.

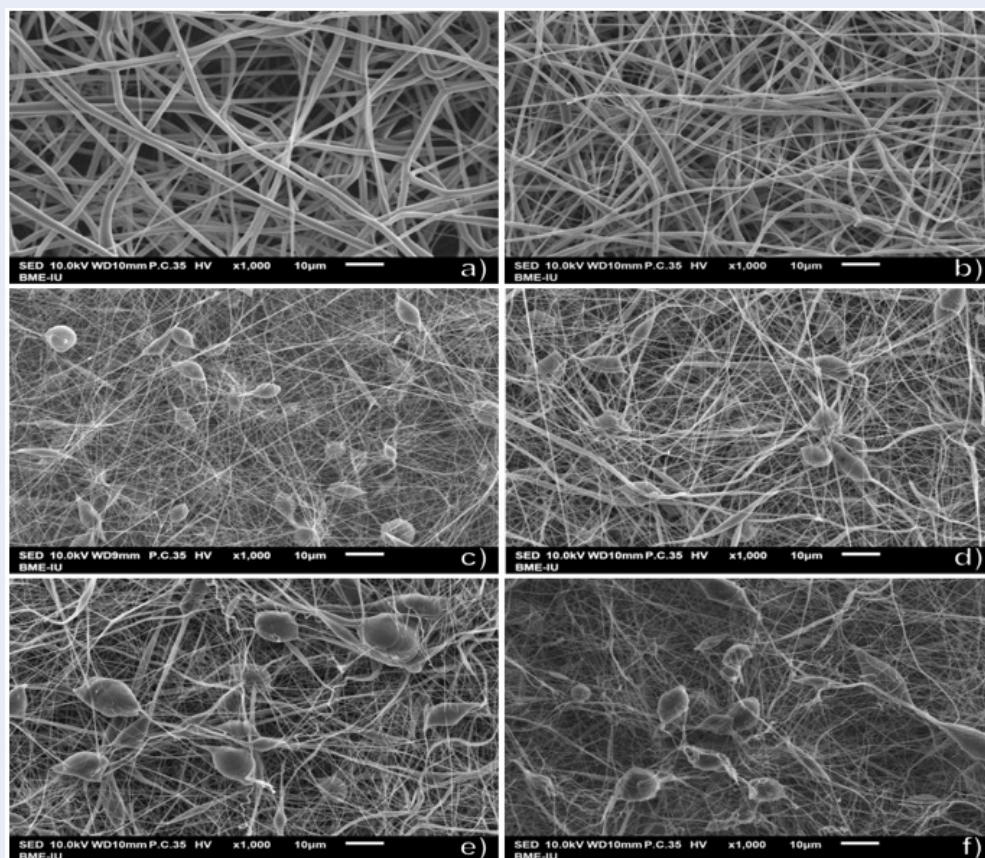
Table 3 shows that the moisture vapor transmission rate (MVTR) of the membranes was employed and that the membranes for 12% PCL-AC and 15% PCL-AC possessed a great average trans-membrane evaporation rate with each being  $3690 \pm 283$  and  $3866 \pm 141(\text{g}/\text{m}^2 \cdot 24\text{h})$  in that order. This further moisture vapor transmission relates to its ability to keep the surface of the wound dry and well-ventilated, speeding up the recovery process as a result.

Figure 4a shows that the 12% PCL - AC and 15% PCL - AC membranes acquired hydrophobicity (with contact angles greater than  $90^\circ$ ). More specifically, the less hydrophobic surface was found for the 12% PCL membrane synthesized in AC solvent with a contact

angle of  $116.7 \pm 5.6^\circ$ . The 15% PCL - AC membrane was more hydrophobic, leading to a widened contact angle of  $127.1 \pm 5.4^\circ$ . Besides, Figure 4b shows that the PCL 12%-AC membrane possessed a tensile strength of  $4.011 \pm 0.380 \text{ MPa}$  and a strain of  $672,900 \pm 44,028\%$ , both of which are significantly greater than some of the physico-mechanical properties of the PCL 15%-AC membrane with a  $2.594 \pm 0.250 \text{ MPa}$  tensile strength and strain of  $579,491 \pm 97,284\%$ . Finally, Figure 4c illustrates that both samples of 12% PCL-AC and 15% PCL-AC obtained good biocompatibility with the L929 cell viability maintained above 90% at a 100% extract concentration. The results showed statistically significant differences in cell viability across the three different concentrations of 100%, 50%, and the control in the 15% PCL-AC sample ( $p < 0,05$ ). Overall, cell viability remained over 90% across all samples. The results indicate that the samples including 12% PCL-AC and 15% PCL-AC are biocompatible.

## DISCUSSION

The concentration, viscosity, and surface tension of the solution are the factors that determine the morphology of the fibers. Surface tension tends to reduce the surface area of the droplet and the viscosity helps the droplet resist deformation when subjected to external influences. In contrast, electrospinning can increase the surface area of the droplet via



**Figure 1:** Overview of the effects of PCL concentration and solvent composition on the morphology of membrane surface (a) 15%PCL-AC, (b) 12%PCL-AC, (c) 12%PCL-8AA/2AC, (d) 12%PCL-7AA/3AC, (e) 12%PCL-9AA:1AC and (f)12%PCL-AA (Measuring scale: 10 µm)

**Table 3:** Table of average evaporation rates of the samples 12%PCL-AC và 15%PCL-AC (n=5)

Sample	Average evaporation rate (g/m <sup>2</sup> .24h)
12%PCL-AC	3690 ± 283
15%PCL-AC	3866 ± 141

droplet elongation (by the Coulomb force) to form polymer fibers. Therefore, the higher the surface tension and the higher the viscosity, the more difficult it is to stretch the droplet to produce fibers with a larger diameter (Figure 5)<sup>12</sup>. This could account for the increase in PCL concentration from 12% to 15% with the increase in surface tension and viscosity leading to an increase in fiber size.

Viscosity has been listed as one of the more impactful factors that mainly impinges on the formation of polymer strands and other characteristics such as the diameter and formation of polymeric beads on the strands. In addition, it was agreed that the greater the solvent’s viscosity, the higher the average size of

the polymeric strands. In our previous study, a PCL membrane was successfully synthesized using PCL in AC which yielded a viscosity rating of 450 cP<sup>10,11</sup>; samples with a suitable viscosity were chosen. When varying the concentration of PCL in solution across the different samples including 15% PCL-AC, 12% PCL-AC, 12% PCL-8AA/2AC, 12% PCL-7AA/3AC, 12% PCL-9AA:1AC, and 12%PCL-AA, there was an increase in fiber diameter as well as pore size. The number of beads increased significantly as the different AA concentrations were increased (Figure 3). Besides, the 2 membranes of 12% PCL-AC and 15% PCL-AC possessed great hydrophobicity due to their angles of contact being greater than the offset of 90°.

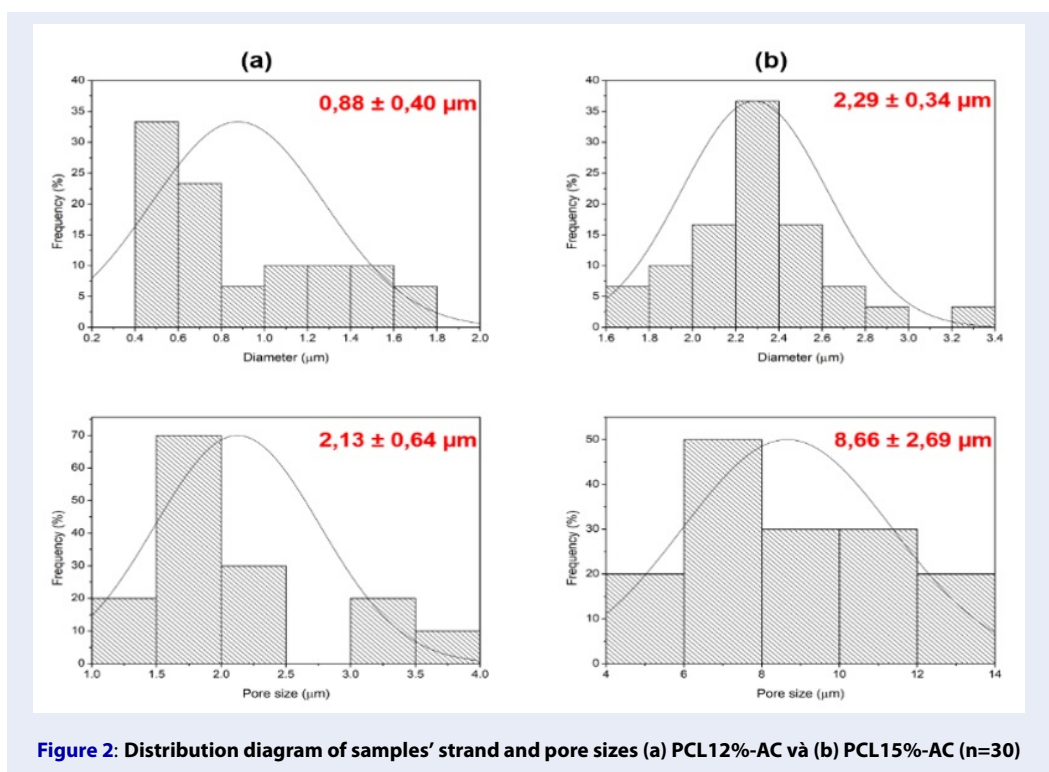


Figure 2: Distribution diagram of samples' strand and pore sizes (a) PCL12%-AC và (b) PCL15%-AC (n=30)

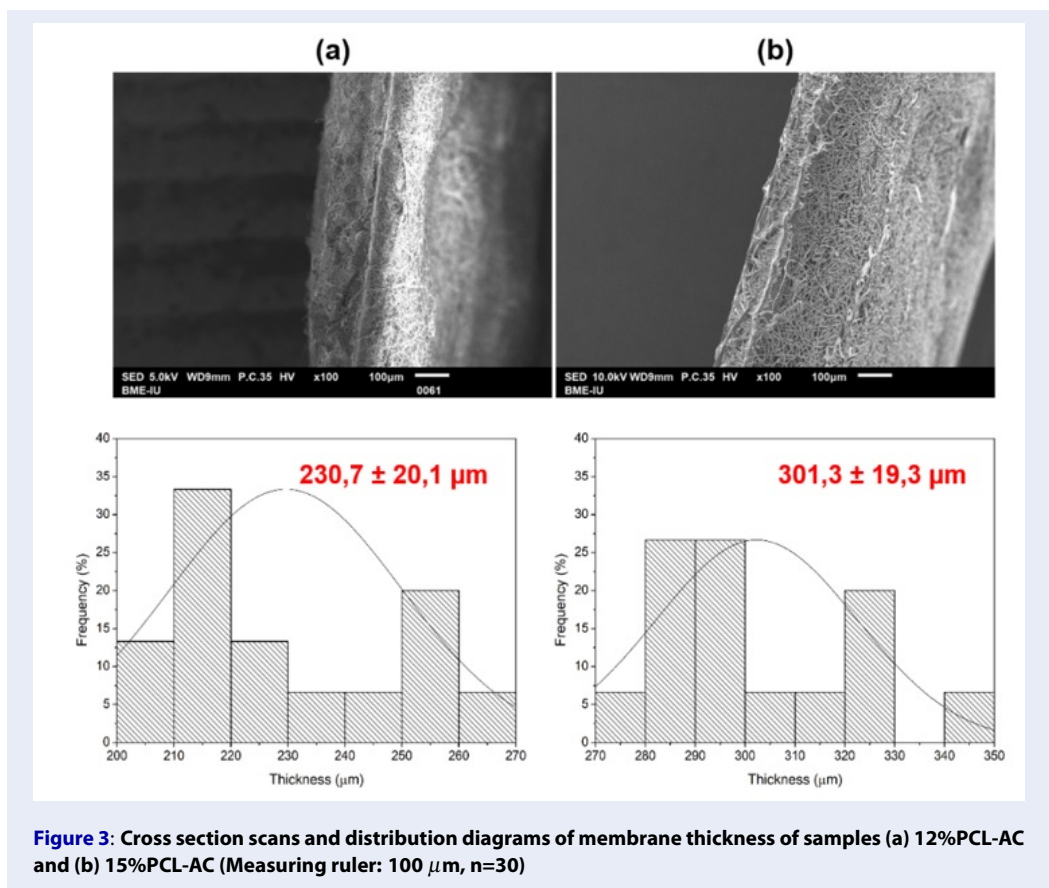


Figure 3: Cross section scans and distribution diagrams of membrane thickness of samples (a) 12%PCL-AC and (b) 15%PCL-AC (Measuring ruler: 100 μm, n=30)

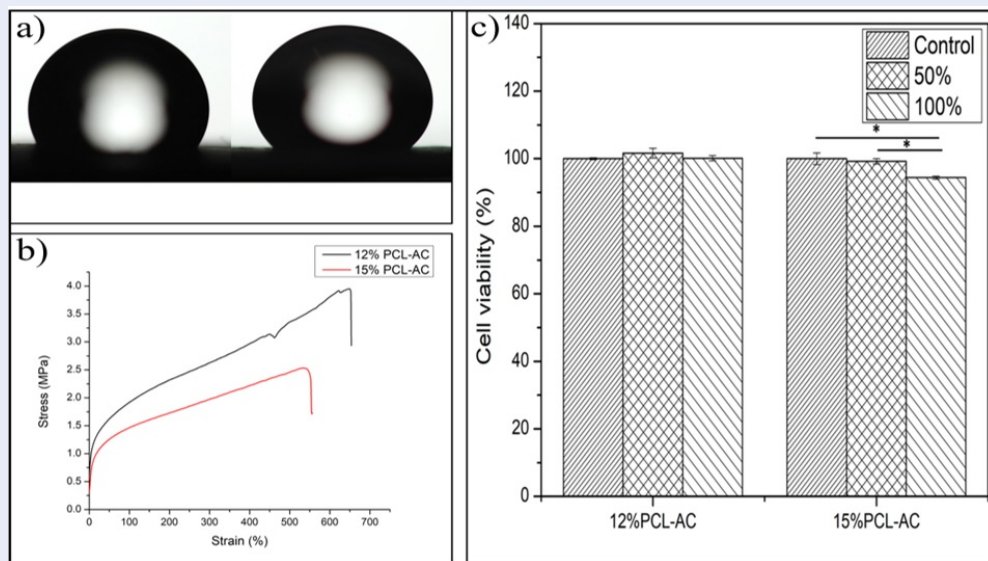


Figure 4: (a) The hydrophobicity, (b) the mechanical, and (c) the biocompatible properties of membranes

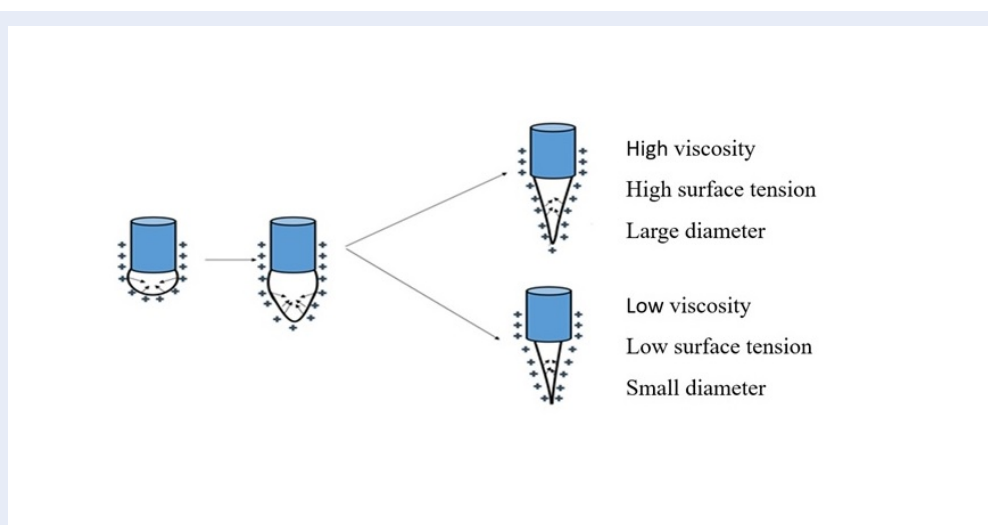


Figure 5: The effect of viscosity on fiber size.

A possible explanation can be because the pore sizes of the 15% PCL-AC membrane were more prominent (Figure 4a), prompting an inflation in hydrophobicity as more water droplets were pushed to the surface, resulting in much larger contact angles. In addition, the two membranes of 12% PCL-AC and 15% PCL-AC met all the preset physical conditions at a relatively satisfactory level where the ultimate tensile strength must be no less than 1.8 MPa with a deformation capacity of more than 30%. However, the 12% PCL-AC membrane was thinner, retaining greater tensile strength and elasticity (Figure 4b). Therefore, the 12%

PCL-AC samples were chosen for use in wound dressing applications.

## CONCLUSION

Two samples of 15% PCL-AC and 12% PCL-AC were determined to be suitable for fabricating membranes and both samples exhibit prominent biocompatibility where the cell viability is over 70%, which is needed to apply it to a wound dressing. However, the 12% PCL-AC sample is a more suitable option for use in wound dressing applications than 15% PCL-AC and the other samples evaluated in this study.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was funded by the Department of Science and Technology of Ho Chi Minh City under the grant number 01/2020/HĐ-QPTKHCN. This work was also supported by Vietnam National University under the grant number NCM2020-28-01.

## AUTHORS' CONTRIBUTION

Thi-Hiep Nguyen: Conceptualization, project administration; Van Khiem Nguyen: Data curation, formal analysis, visualization; Nghi Nguyen: Writing – original draft, Tam Phan: Writing – original draft, data curation; Phuc H.Vo: Writing – review and editing, formal Analysis; Thao-Nhi Dang Ngoc: Writing – review and editing; Kieu Nguyen : formal Analysis. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

## ABBREVIATIONS

AA: Acetic acid  
AC: Acetone  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
FBS: Fetal Bovine Serum  
MVTR: Moisture Vapor Transmission Rate  
PCL: Polycaprolactone  
SEM: Scanning electron microscopy

## REFERENCES

1. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*. Nov 2001;414(6862):Art

no. 6862;PMID: 11719807. Available from: <https://doi.org/10.1038/35106587>.

2. Schröder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*. Feb 2006;63(4):469-86;PMID: 16416029. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5364-0>.
3. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. Mar 2010;89(3):219-29;PMID: 20139336. Available from: <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>.
4. Ho MH, Do TB, Dang NN, Le AN, Ta HT, Vo TV et al. Effects of an acetic acid and acetone mixture on the characteristics and scaffold-cell interaction of electrospun polycaprolactone membranes. *Appl Sci*. Jan 2019;9(20):Art no. 20; Available from: <https://doi.org/10.3390/app9204350>.
5. Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S. Clogging-free electrospinning of polycaprolactone using acetic acid/acetone mixture. *Polym Plast Technol Eng*. Mar 2016;55(5):518-29; Available from: <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1036451>.
6. SiLiNdIR M and Özer AY. Sterilization methods and the comparison of E-beam sterilization with gamma radiation sterilization; 2009. p. 12;.
7. Toriello M, Afsari M, Shon HK, Tijing LD. Progress on the fabrication and application of electrospun nanofiber composites. *Membranes*. Sep 2020;10(9):Art no. 9;PMID: 32872232. Available from: <https://doi.org/10.3390/membranes10090204>.
8. Islam MS, Ang BC, Andriyana A, Afifi AM. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. *SN Appl Sci*. Sep 2019;1(10):1248; Available from: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1288-4>.
9. Sarina S, Waclawik ER, Zhu H. Photocatalysis on supported gold and silver nanoparticles under ultraviolet and visible light irradiation. *Green Chem*. Jun 2013;15(7):1814-33; Available from: <https://doi.org/10.1039/c3gc40450a>.
10. Ho MH, Do TB, Dang NN, Le AN, Ta HT, Vo TV et al. Effects of an acetic acid and acetone mixture on the characteristics and scaffold-cell interaction of electrospun polycaprolactone membranes. *Appl Sci*. Jan 2019;9(20):Art no. 20; Available from: <https://doi.org/10.3390/app9204350>.
11. Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S. Clogging-free electrospinning of polycaprolactone using acetic acid/acetone mixture. *Polym Plast Technol Eng*. Mar 2016;55(5):518-29; Available from: <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1036451>.
12. Cramariuc B, Cramariuc R, Scarlet R, Manea LR, Lupu IG, Cramariuc O. Fiber diameter in electrospinning process. *J Electrostat*. Jun 2013;71(3):189-98; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2012.12.018>.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. V. Ortines *et al.*, “Neutralizing Alpha-Toxin Accelerates Healing of Staphylococcus aureus-Infected Wounds in Nondiabetic and Diabetic Mice,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, no. 3, pp. e02288-17, Feb. 2018, doi: 10.1128/AAC.02288-17.
- [2] S. Guo and L. A. DiPietro, “Factors Affecting Wound Healing,” *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 219–229, Mar. 2010, doi: 10.1177/0022034509359125.
- [3] H. A. Wallace, B. M. Basehore, and P. M. Zito, “Wound Healing Phases,” in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Accessed: Sep. 06, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470443/>
- [4] C. Gonçalves, N. Ferreira, and L. Lourenço, “Production of Low Molecular Weight Chitosan and Chito oligosaccharides (COS): A Review,” *Polymers*, vol. 13, no. 15, p. 2466, Jul. 2021, doi: 10.3390/polym13152466.
- [5] Matica, Aachmann, Tøndervik, Sletta, and Ostafe, “Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, p. 5889, Nov. 2019, doi: 10.3390/ijms20235889.
- [6] G. A. M. Ruiz and H. F. Z. Corrales, “Chitosan, Chitosan Derivatives and their Biomedical Applications,” in *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, E. A. Shalaby, Ed., InTech, 2017. doi: 10.5772/66527.
- [7] R. Kumar, A. M. Isloor, A. F. Ismail, S. A. Rashid, and T. Matsuura, “Polysulfone–Chitosan blend ultrafiltration membranes: preparation, characterization, permeation and antifouling properties,” *RSC Adv.*, vol. 3, no. 21, pp. 7855–7861, May 2013, doi: 10.1039/C3RA00070B.
- [8] A. Bernkop-Schnürch, “Strategies to overcome the polycation dilemma in drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 136–137, pp. 62–72, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.017.
- [9] V. K. Doan *et al.*, “Characterizations and Antibacterial Efficacy of Chitosan Oligomers Synthesized by Microwave-Assisted Hydrogen Peroxide Oxidative Depolymerization Method for Infectious Wound Applications,” *Mater. Basel Switz.*, vol. 14, no. 16, Aug. 2021, doi: 10.3390/ma14164475.
- [10] H. K. No, S. H. Kim, S. H. Lee, N. Y. Park, and W. Prinyawiwatkul, “Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 65, no. 2, pp. 174–178, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.12.036.
- [11] M. Yildirim-Aksoy and B. H. Beck, “Antimicrobial activity of chitosan and a chitosan oligomer against bacterial pathogens of warmwater fish,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 122, no. 6, pp. 1570–1578, Jun. 2017, doi: 10.1111/jam.13460.
- [12] Y. Chung *et al.*, “Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 25, no. 7, pp. 932–936, Jul. 2004.
- [13] T. Dai, M. Tanaka, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, “Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects,” *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, vol. 9, no. 7, pp. 857–879, Jul. 2011, doi: 10.1586/eri.11.59.
- [14] H. Liu *et al.*, “A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 14, pp. 7533–

7549, Feb. 2018, doi: 10.1039/C7RA13510F.

[15]R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, and H. Tamura, “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 3, pp. 322–337, May 2011, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.005.

[16]R. A. A. Muzzarelli *et al.*, “Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 70, no. 3, pp. 274–284, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.04.008.

[17]X. Wang, F. Cheng, J. Gao, and L. Wang, “Antibacterial wound dressing from chitosan/polyethylene oxide nanofibers mats embedded with silver nanoparticles,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 29, no. 8, pp. 1086–1095, Mar. 2015, doi: 10.1177/0885328214554665.

[18]T. K. Varun *et al.*, “Extraction of chitosan and its oligomers from shrimp shell waste, their characterization and antimicrobial effect,” *Vet. World*, vol. 10, no. 2, pp. 170–175, Feb. 2017, doi: 10.14202/vetworld.2017.170-175.

[19]S.-F. Chou, D. Carson, and K. A. Woodrow, “Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers,” *J. Controlled Release*, vol. 220, pp. 584–591, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.008.

[20]A. Haider, S. Haider, and I.-K. Kang, “A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology,” *Arab. J. Chem.*, vol. 11, no. 8, pp. 1165–1188, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.

[21]V. Beachley and X. Wen, “Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 3, pp. 663–668, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.msec.2008.10.037.

[22]Y. Wu, Q. L. Lin, Z. X. Chen, W. Wu, and H. X. Xiao, “Preparation of chitosan oligomers COS and their effect on the retrogradation of intermediate amylose rice starch,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 6, pp. 695–703, Dec. 2012, doi: 10.1007/s13197-010-0210-2.

[23]D. Gheorghită *et al.*, “Chitosan-Based Biomaterials for Hemostatic Applications: A Review of Recent Advances,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 13, Art. no. 13, Jan. 2023, doi: 10.3390/ijms241310540.

[24]“EN 13726-1:2002 - Test methods for primary wound dressings - Part 1: Aspects of absorbency,” iTeh Standards. Accessed: Nov. 08, 2023. [Online]. Available: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/3eb17b79-e68a-4ea2-a2a8-dd6d98145e73/en-13726-1-2002>

[25]“AATCC 100 - Antimicrobial Fabric Testing,” Swiss Anti-Bacterial & Anti-Viral Testing Laboratory, ISO Certified | MIS. Accessed: Sep. 06, 2023. [Online]. Available: <https://microbe-investigations.com/aatcc-100/>

[26]“AATCC 147 - Antibacterial Textile Test,” Swiss Anti-Bacterial & Anti-Viral Testing Laboratory, ISO Certified | MIS. Accessed: Sep. 06, 2023. [Online]. Available: <https://microbe-investigations.com/aatcc-147/>

[27]14:00-17:00, “ISO 10993-1:2018,” ISO. Accessed: Nov. 08, 2023. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/68936.html>

[28]D. Schmauss, F. Rezaeian, T. Finck, H.-G. Machens, R. Wettstein, and Y. Harder, “Treatment of secondary burn wound progression in contact burns-a systematic review

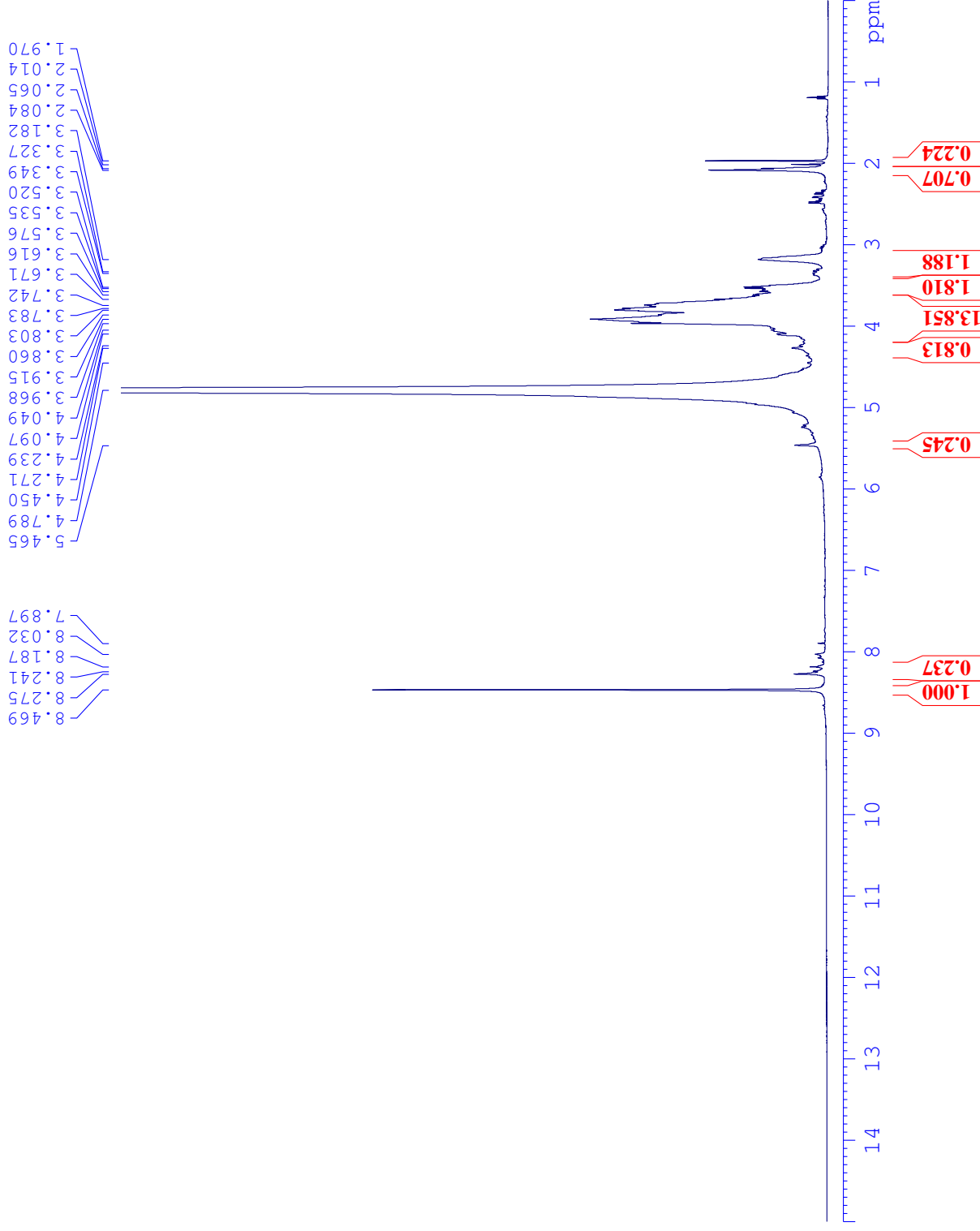
- of experimental approaches,” *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.*, vol. 36, no. 3, pp. e176-189, 2015, doi: 10.1097/BCR.000000000000131.
- [29] M. Mathaba and M. O. Daramola, “Effect of Chitosan’s Degree of Deacetylation on the Performance of PES Membrane Infused with Chitosan during AMD Treatment,” *Membranes*, vol. 10, no. 3, p. 52, Mar. 2020, doi: 10.3390/membranes10030052.
- [30] S. Namli *et al.*, “Effects of deacetylation degree of chitosan on the structure of aerogels,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 250, p. 126123, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126123.
- [31] T.-N. Tang *et al.*, “Fabrication of silver nanoparticle-containing electrospun polycaprolactone membrane coated with chitosan oligosaccharides for skin wound care,” *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 8, no. 3, p. 100582, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.jsamd.2023.100582.
- [32] T. Uyar and F. Besenbacher, “Electrospinning of Uniform Polystyrene Fibers: The Effect of Solvent Conductivity,” *Polymer*, vol. 49, pp. 5336–5343, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.09.025.
- [33] S. Sarabi-Mianeji, J. Scott, and D. Pagé, “Impact of electrospinning process parameters on the measured current and fiber diameter,” *Polym. Eng. Sci.*, vol. 55, Jul. 2015, doi: 10.1002/pen.24150.
- [34] A. Faglie, R. Emerine, and S.-F. Chou, “Effects of Poloxamers as Excipients on the Physicomechanical Properties, Cellular Biocompatibility, and In Vitro Drug Release of Electrospun Polycaprolactone (PCL) Fibers,” *Polymers*, vol. 15, no. 14, Art. no. 14, Jan. 2023, doi: 10.3390/polym15142997.
- [35] Y. Dong, H. Zhu, Y. Shen, W. Zhang, and L. Zhang, “Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*,” *PLOS ONE*, vol. 14, no. 9, Art. no. 9, Sep. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0222322.
- [36] M. T. Haseeb *et al.*, “Linseed hydrogel-mediated green synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial and wound-dressing applications,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 2845–2855, Apr. 2017, doi: 10.2147/IJN.S133971.
- [37] M. H. Ho *et al.*, “Effects of an Acetic Acid and Acetone Mixture on the Characteristics and Scaffold–Cell Interaction of Electrospun Polycaprolactone Membranes,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 20, Art. no. 20, Jan. 2019, doi: 10.3390/app9204350.
- [38] J. A. Galvão Barros, A. J. Caldeira Brant, and L. H. Catalani, “Hydrogels from Chitosan and a Novel Copolymer Poly,” *Mater. Sci. Appl.*, vol. 02, no. 08, pp. 1058–1069, 2011, doi: 10.4236/msa.2011.28143.
- [39] H. Yu, X. Xu, X. Chen, J. Hao, and X. Jing, “Medicated wound dressings based on poly(vinyl alcohol)/poly(N-vinyl pyrrolidone)/chitosan hydrogels,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 101, no. 4, pp. 2453–2463, 2006, doi: 10.1002/app.23344.
- [40] V. K. Doan *et al.*, “Optimization of Oligomer Chitosan/Polyvinylpyrrolidone Coating for Enhancing Antibacterial, Hemostatic Effects and Biocompatibility of Nanofibrous Wound Dressing,” *Polymers*, vol. 14, no. 17, p. 3541, Aug. 2022, doi: 10.3390/polym14173541.
- [41] N. A. Rangel-Vázquez and F. Rodríguez-Félix, “Analysis of chitosan/polyvinylpyrrolidone (structure, ftir, electrostatic potential, homo/lumo orbitals) using computational chemistry,” *Lat. Am. Appl. Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 39–44, Jan. 2015.



- [42]H. Wang, Y. Zhou, Y. Wang, Z. Wang, and J. Wang, “Biguanidine functional chitoooligosaccharide modified reverse osmosis membrane with improved anti-biofouling property,” *RSC Adv.*, vol. 8, pp. 41938–41949, Dec. 2018, doi: 10.1039/C8RA09291E.
- [43]K. Chellamani and R. Balaji, “Quality Evaluation Methods for Textile Substrates Based Wound Dressings,” 2014. Accessed: Sep. 10, 2023. [Online]. Available: <https://www.semanticscholar.org/paper/Quality-Evaluation-Methods-for-Textile-Substrates-Chellamani-Balaji/af338745209c6096887df5a8fb7c30a86444487d>
- [44]M. S. Sukiman, A. Andriyana, B. C. Ang, and H. S. C. Metselaar, “Elastic properties of electrospun PVDF nanofibrous membranes: Experimental investigation and numerical modelling using pixel-based finite element method,” *Polym. Test.*, vol. 81, p. 106218, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.polymertesting.2019.106218.
- [45]S. Thomas and M. Uzun, “2 - Testing dressings and wound management materials,” in *Advanced Textiles for Wound Care (Second Edition)*, S. Rajendran, Ed., in The Textile Institute Book Series. , Woodhead Publishing, 2019, pp. 23–54. doi: 10.1016/B978-0-08-102192-7.00002-3.
- [46]R. Xu *et al.*, “Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, Art. no. 1, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24596.
- [47]R. D. Wolcott, D. D. Rhoads, and S. E. Dowd, “Biofilms and chronic wound inflammation,” *J. Wound Care*, vol. 17, no. 8, pp. 333–341, Aug. 2008, doi: 10.12968/jowc.2008.17.8.30796.
- [48]R. C. Petca *et al.*, “Spectrum and Antibiotic Resistance of Uropathogens in Romanian Females,” *Antibiotics*, vol. 9, p. 472, Aug. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9080472.
- [49]A. K. Abdullah and A. F. Rejab, “Evaluation of Secondary Wound Healing using Moist Exposed Burn Ointment (MEBO) in Rabbits,” vol. 45, no. 02, 2022.
- [50]I. A. Darby, B. Laverdet, F. Bonté, and A. Desmoulière, “Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing,” *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 7, pp. 301–311, Nov. 2014, doi: 10.2147/CCID.S50046.
- [51]D. R. Perinelli *et al.*, “Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity,” *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 117, pp. 8–20, May 2018, doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.046.
- [52]J. Kluytmans, A. van Belkum, and H. Verbrugh, “Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 3, pp. 505–520, Jul. 1997, doi: 10.1128/CMR.10.3.505.

## PHỤ LỤC

# Cos-Microwave-D2O-1H



Cos-Microwave-D2O

NAME	EXPNO	PROCNO	Date_	Time	INSTRUM	PROBHD	PULPROG	TD	SOLVENT	NS	DS	SWH	FIDRES	AQ	RG	DW	DE	TE	D1	TD0
	1	1	20200609	15.51	spect	5 mm PABBO BB-	zg	131072	D2O	24	0	10330.578 Hz	0.078816 Hz	6.3439350 sec	28.5	48.400 usec	6.50 usec	673.2 K	3.00000000 sec	1

==== CHANNEL f1 =====

NUC1	1H
P1	12.30 usec
PL1	1.00 dB
PL1W	17.15925598 W
SFO1	500.1342511 MHz
SI	131072
SF	500.1299502 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00