

CHẾ TẠO VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐIỀU TRỊ BÔNG CỦA TỔ HỢP VẬT LIỆU AGNP - CURCUMIN - CHITOSAN HÒA TAN TRONG NƯỚC

Nhận bài:

25 – 03 – 2015

Chấp nhận đăng:

25 – 06 – 2015

<http://jshe.ued.udn.vn/>

Trần Thị Nguyệt^a, Nguyễn Bá Trung^{b*}

Tóm tắt: Bài báo trình bày phương pháp điều chế vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan và đánh giá khả năng điều trị bông của tổ hợp vật liệu này. AgNP được tổng hợp từ AgNO₃ với tác nhân khử natri citrat, có kích thước tương đối đồng nhất, nằm trong khoảng 16 – 18nm. Sự hình thành của nano bạc đã được khẳng định thông qua phương pháp đo phổ UV-Vis và nhiễu xạ tia X; kích thước hạt được xác định bằng phương pháp đo TEM. Đánh giá khả năng kháng khuẩn cho thấy tổ hợp vật liệu này có khả năng ức chế tốt với cả 2 chủng vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Kết quả thử nghiệm lâm sàng trên thỏ cũng đã thể hiện khá rõ khả năng điều trị bông của vật liệu này; các vết thương bông khô, không có hiện tượng viêm nhiễm và không để lại sẹo khi lành.

Từ khóa: chitosan hòa tan; nano bạc; curcumin; vật liệu trị bông; vật liệu kháng khuẩn

1. Mở đầu

Theo thống kê hàng năm trên thế giới, tai nạn do bông chiếm vị trí hàng đầu trong những loại tai nạn xảy ra tại gia đình và cũng là nguyên nhân đứng thứ hai gây ra tử vong ở trẻ em. Vết thương bông thường dễ bị nhiễm khuẩn do vùng da bị tổn thương, tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển, đặc biệt là khuẩn tụ cầu, làm tăng nguy cơ nhiễm trùng, có thể dẫn đến nhiễm trùng huyết nếu vi khuẩn bị nhiễm vào máu và lan truyền trên khắp cơ thể. Nhiễm trùng huyết thường tiến triển nhanh, có thể gây sốc và suy tạng, đe dọa nghiêm trọng đến sinh mạng sống.

Bông không chỉ ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe trong quá trình điều trị mà ngay khi lành vết thương, nó còn để lại nhiều di chứng nặng, đặc biệt là khía cạnh thẩm mỹ. Điều trị vết thương gây ra do bông là một quá trình diễn biến phức tạp, dễ bị biến chứng. Nghiên cứu điều trị bông hiệu quả luôn là đối tượng quan tâm của các nhà y học với mục tiêu thúc đẩy nhanh quá trình hồi phục và không để lại di chứng. Quá trình điều trị diễn ra thông qua hàng loạt các sự cố

chồng chéo lên nhau như keo tụ, viêm nhiễm, tăng trưởng và tái tạo mô [1]. Để quá trình phục hồi tổn thương có thể diễn ra một cách hoàn hảo, một số hợp chất hóa học đặc biệt, gọi là các chất kích thích phân bào (cytokin), xuất hiện để gửi tín hiệu đến các tế bào [2, 3]. Các chất này có vai trò quan trọng trong các quá trình khơi mào, duy trì và điều tiết các phản ứng xảy ra sau khi tổn thương xuất hiện. Chính các chất này là nguyên nhân làm cho tình trạng vết thương có thể xấu đi, hình thành sẹo lồi, hoặc xuất hiện các phản ứng viêm không kiểm soát được [4].

Một số công trình nghiên cứu đã đánh giá một cách định lượng tác dụng của mỗi cytokin, đồng thời tìm kiếm các tác nhân có khả năng tác động lên hiệu quả hoạt động của các cytokin trong điều trị vết thương. Các nghiên cứu đó đã chỉ ra rằng nano bạc có khả năng điều tiết giải phóng từ từ các ion bạc vào dịch vết thương, giúp diệt khuẩn [5], điều biến, ức chế mạnh các cytokin và kích thích cytokin kháng viêm trong quá trình điều trị vết thương, đặc biệt là vết thương bông. Điều này giúp quá trình hồi phục vết thương hoàn thiện hơn và không để lại sẹo.

Bên cạnh nano bạc, chitosan - poly(β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose), là polymer thiên nhiên có trong vỏ các loài giáp xác như tôm, cua... [6], đã và đang được chú ý sử dụng làm màng trị bông do có hoạt tính sinh học cao: kháng khuẩn, kháng nấm, tăng cường miễn dịch của cơ thể; có khả năng tăng sinh tế bào [7]. Vì vậy, gel

^a Học viên cao học K27 Hóa hữu cơ, Đại học Đà Nẵng

^b Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

* Liên hệ tác giả

Nguyễn Bá Trung

Email: nbtrung@ud.edu.vn

Điện thoại: 0905188257

chitosan đã và đang được sử dụng nhiều trong điều trị bỏng mô [8, 9]. Ngoài ra, curcumin chiết tách từ nghệ được biết đến là chất có tác dụng giúp vết thương chóng lành, trị thâm, liền sẹo [4].

Với mục tiêu điều chế màng trị bỏng có khả năng kháng khuẩn, thúc đẩy nhanh quá trình làm lành vết thương, chống sự hình thành mô sẹo lồi, chúng tôi sử dụng chitosan hòa tan (WS chitosan), nano bạc và curcumin để tạo tổ hợp vật liệu AgNP – Curcumin – WS chitosan, ứng dụng trong điều trị vết thương gây ra do bỏng.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu và hoá chất

Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu AgNO_3 (r), chitosan hòa tan (WS chitosan) thuộc loại tinh khiết của hãng Sigma, Aldrich. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn được sử dụng cho nghiên cứu tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa là Mueller-Hinton (Bio-RAD). Vi khuẩn gốc *Escherichia coli* (*E. coli*) và *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) được cung cấp từ Khoa Vi sinh, Bệnh viện Đà Nẵng.

Thỏ được sử dụng để nghiên cứu là thỏ trưởng thành, được nuôi nhốt riêng trong suốt quá trình thí nghiệm. Chuồng nuôi được vệ sinh sạch sẽ hàng ngày để tránh lây nhiễm trùng vết thương bỏng do các tác động của yếu tố bên ngoài.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều chế dung dịch nano bạc

Cho vào cốc phản ứng 125ml dung dịch AgNO_3 5mM, dung dịch được đặt trên máy khuấy từ gia nhiệt đến 90°C, khuấy đều trên máy khuấy từ với tốc độ 200 vòng/phút. Nhỏ từ từ từng giọt 5ml dung dịch natricitrat 1% vào dung dịch AgNO_3 trên. Tiếp tục duy trì nhiệt độ phản ứng ở 90°C và khuấy đều trong 20 phút. Hỗn hợp phản ứng chuyển dần từ không màu sang vàng đậm đến nâu sẫm, chứng tỏ có sự hình thành AgNP. Sản phẩm keo AgNP được để nguội đến nhiệt độ phòng và lưu giữ ở 4°C đến khi sử dụng.

2.2.2. Tạo tổ hợp vật liệu AgNP – Curcumin – WS chitosan

Hòa tan 0,1 gam curcumin vào 1ml cồn tuyệt đối, khuấy đều thu được dung dịch lỏng sệt. Thêm tiếp 2 gam WS chitosan vào hỗn hợp trên, tiếp theo cho thêm vào 5ml dung dịch nano bạc (500 ppm), khuấy trộn kỹ để tạo hỗn hợp đồng nhất. Đậy kín và bảo quản hỗn hợp vật liệu AgNP – Curcumin – WS chitosan ở 4°C cho đến khi sử dụng.

2.2.3. Phân tích các đặc trưng vật lý của vật liệu

Phổ UV-Vis của AgNP trong dung dịch WS chitosan được ghi lại trên máy đo UV-Vis 2 chùm tia Perkin-Elmer Lambda trong khoảng bước sóng từ 350 ÷ 600 nm. Cấu trúc tinh thể của các hạt AgNP trong nền WS chitosan được xác định bằng nhiễu xạ tia X trên máy Bruker AXS D8 Advance. Kích thước hạt AgNP được xác định thông qua chụp TEM có độ phân giải cao trên máy JEOL JEM 1100.

Thành phần hóa học của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan được xác định dựa vào việc ghi lại phổ tán xạ năng lượng tia X.

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan

Tính kháng khuẩn của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan được đánh giá thông qua khả năng ức chế của màng đối với vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa trên môi trường nuôi cấy agarose. Mẫu được tẩm trên giấy lọc, đặt trên nền dinh dưỡng agarose đã được cấy sẵn vi khuẩn cần nghiên cứu, ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, dùng thước đo đường kính vòng ức chế để đánh giá khả năng kháng khuẩn. Đường kính vòng ức chế càng rộng thì khả năng ức chế của màng với vi sinh vật đó càng hiệu quả.

2.3.5. Thử nghiệm khả năng trị bỏng của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan trên thỏ

Khả năng trị bỏng của tổ hợp vật liệu AgNP – Curcumin – WS chitosan được thử nghiệm trên thỏ 3 tháng tuổi có trọng lượng xấp xỉ 2 kg. Vết gây bỏng có tiết diện (1×1) cm^2 được thực hiện bằng cách áp miếng nhôm đã được đốt nóng trên bếp gas trong 2 phút lên vị trí gây bỏng đã được cạo lông. Tiến hành gây bỏng tại 4 vị trí dọc 2 bên lưng của thỏ. Các vết bỏng được vệ sinh hàng ngày và bôi các mẫu thuốc thử nghiệm.

+ Vết bỏng 1: Không sử dụng bất kỳ loại thuốc nào, để vết bỏng lành tự nhiên.

+ Vết bỏng 2: Bôi WS chitosan lên vết bỏng.

+ Vết bỏng 3: Bôi tổ hợp vật liệu AgNP – WS chitosan lên vết bỏng.

+ Vết bỏng 4: Sử dụng hỗn hợp vật liệu AgNP – Curcumin – WS chitosan đã phối trộn ở trên bôi lên vết bỏng.

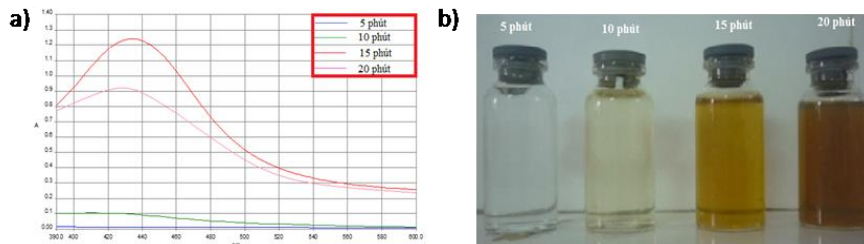
Quan sát các vết bỏng trong quá trình phục hồi vết thương bỏng, đánh giá và rút ra kết luận.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tổng hợp AgNP từ AgNO_3 và natricitrate

Dung dịch keo AgNP được điều chế từ môi trường đồng thể thông qua quá trình khử AgNO_3 bằng natri citrat theo quy trình 2.2.1. Ion citrat có khả năng khử ion Ag^+ thành tập hợp nguyên tử bạc có kích thước nano. Nồng độ của chất khử natri citrat và tiền chất AgNO_3 , nhiệt độ, thời gian phản ứng là những yếu tố quyết định đến kích thước các hạt AgNP tạo thành. Dung dịch AgNO_3 ban đầu không màu, khi thêm chất khử natri citrat, dung dịch chuyển dần sang màu vàng

nâu, rồi đến nâu đen như trình bày ở hình 1b, chứng tỏ các hạt AgNP đã được hình thành. Đây là các hạt keo dương, được làm bền bởi ion citrat còn dư trong dung dịch. Như vậy, ion citrat ngoài đóng vai trò chất khử, nó còn là tác nhân làm bền hạt keo AgNP, tránh hiện tượng dính kết, tập hợp tạo thành các hạt có kích thước lớn hơn, làm giảm tính chất quý vốn có của hạt có kích thước nano.

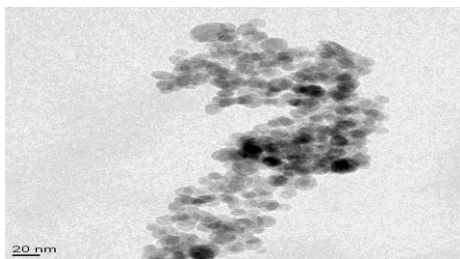


Hình 1. a) Phổ UV-vis của dung dịch AgNP; b) Màu sắc của dung dịch keo AgNP được điều chế với các thời gian khác nhau

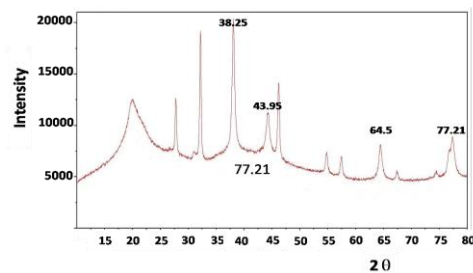
Hình 1a trình bày phổ UV-Vis của dung dịch keo AgNP điều chế ở các thời gian khác nhau. Theo thuyết Mie, đỉnh hấp thụ cực đại của hạt nano sẽ chuyển về vùng có bước sóng lớn khi kích thước hạt tăng lên, nồng độ hạt keo nano càng cao thì độ hấp thụ quang càng lớn. Kết quả đo phổ UV-vis cho thấy 5 phút đầu là giai đoạn tạo thành mầm tinh thể AgNP từ các ion bạc nên cường độ tín hiệu cộng hưởng plasmon ghi được là rất bé. Từ phút thứ 10 trở đi, dung dịch phản ứng có sự thay đổi màu đáng kể, đỉnh hấp thụ cực đại quang phổ plasmon bề mặt của AgNP dịch chuyển về bước sóng lớn hơn, cường độ hấp thụ cũng tăng. Điều này chứng tỏ có sự gia tăng nồng độ, cũng như sự thay đổi kích thước hạt

keo AgNP tạo thành. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với hình ảnh màu ghi nhận được ở Hình 1b.

Kích thước hạt keo AgNP tạo thành (thực hiện phản ứng ở 90°C , 20 phút, AgNO_3 5mM) được thể hiện khá rõ ở Hình 2 thông qua chụp TEM. Các hạt AgNP có kích thước khá đồng đều, phân bố trong khoảng 16 -18 nm. Kết quả phân tích nhiễu xạ tia X của mẫu AgNP ở Hình 3 cho thấy các nhiễu xạ Bragg ở các giá trị 2θ bằng 38.25° , 43.95° , 64.5° và 77.21° , đặc trưng cho các mặt (111), (200), (220) và (311) tương ứng trong mạng lập phương tâm mặt của Ag [10]. Với những đỉnh nhiễu xạ nhận được trên, ta có thể hoàn toàn khẳng định mẫu sản phẩm đã tổng hợp chính là AgNP.



Hình 2. Ảnh TEM của AgNP



Hình 3. Giản đồ XRD của AgNP trong nền WS chitosan

3.2. Tạo vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin - WS chitosan

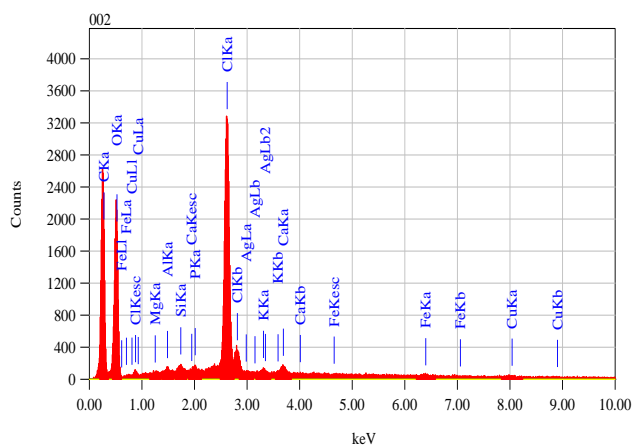
Chúng tôi tiến hành tạo vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan theo mục 2.2.2. Sản phẩm thu

được có màu nâu vàng, hơi sệt; khi bôi lên da hình thành một lớp màng mịn, có khả năng bám dính tốt trên da.

3.3. Xác định thành phần của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin - WS chitosan

Độ đồng nhất của mẫu sản phẩm, thành phần các nguyên tố của vật liệu tổ hợp ở các vị trí khác nhau trong mẫu được xác định bằng cách đo phổ tán xạ năng lượng tia X. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 4 cho thấy ngoài các đỉnh có cường độ cao của nguyên tố C, O có trong thành phần của curcumin và WS chitosan, trên

giản đồ còn có xuất hiện thêm đỉnh nhiễu xạ của bạc kim loại ở giá trị năng lượng 2,983 keV. Thành phần % nguyên tố bạc trong các mẫu xác định được là khá đồng nhất, chiếm 0,01%. Điều này chứng tỏ AgNP phân tán khá đồng nhất trong tổ hợp vật liệu.

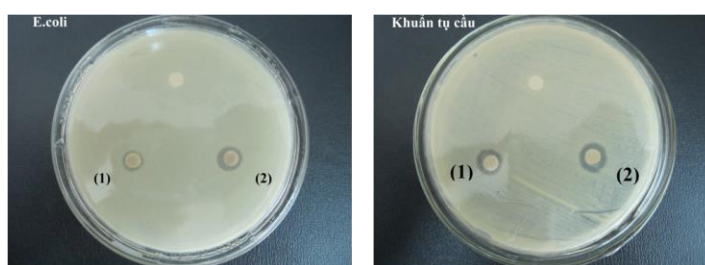


Hình 4. Phổ EDX của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan

3.3. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin - WS chitosan

Chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng kháng khuẩn theo mục 2.2.4. đối với vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan với hai chủng vi khuẩn: Gram (-) *Escherichia coli* và Gram (+) *Staphylococcus aureus* (khuẩn tụ cầu vàng). Kết quả ức chế vi khuẩn ở Hình 5 cho thấy khả năng kháng khuẩn của AgNP nhỏ hơn của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin

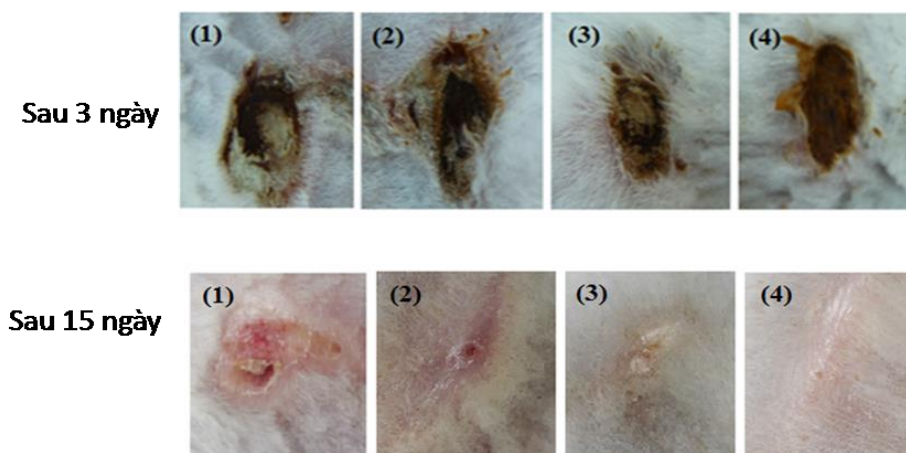
– WS chitosan. Dung dịch keo AgNP có khả năng kháng khá tốt đối với vi khuẩn Gram (-) *Escherichia coli*, ứng với đường kính vòng ức chế là 10 mm và vi khuẩn Gram (+) *Staphylococcus aureus* ứng với đường kính vòng ức chế là 12 mm. Trong khi đó, vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt hơn với đường kính vòng tròn ức chế đối với vi khuẩn Gram (-) *Escherichia coli* và vi khuẩn Gram (+) *Staphylococcus aureus* lần lượt là 12 mm và 14 mm.



Hình 5. Kháng khuẩn đồ của dung dịch keo AgNP (1) và Vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan (2) sau 24 giờ ủ đối với: (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus* (khuẩn tụ cầu)

3.4. Đánh giá khả năng trị bông của vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan

Kết quả thử nghiệm khả năng điều trị bông của tổ hợp vật liệu được trình bày ở Hình 6.



Hình 6. Quá trình hồi phục vết thương sau điều trị; (1) chỉ rửa vết thương, để tự hồi phục; (2) Dung dịch WS chitosan; (3) AgNP - WS chitosan; (4) AgNP – Curcumin – WS chitosan

Sau 3 ngày điều trị, vị trí gây bỏng (1) có hiện tượng viêm, xuất hiện các nốt phỏng có vòm dày, dịch nốt phỏng trắng đục, đáy vết phỏng có màu tím sẫm, đám da bỏng ướt, gồ cao hơn so với vùng da lân cận; vết (2), (3), (4) xuất hiện vài nốt phỏng chứa dịch vàng nhạt, đáy vết phỏng có màu hồng máu, chưa có tiền triển rõ rệt.

Sau 15 ngày, ở vị trí gây bỏng (1): Vết bỏng đã khô, tuy nhiên vẫn chưa lành hẳn, tế bào chết vẫn còn bám chặt vào vết bỏng; vị trí gây bỏng (2) và (3): Quá trình hồi phục nhanh hơn so với vị trí gây bỏng (1), vết bỏng đã dần hồi phục nhưng vẫn còn để lại sẹo; vị trí gây bỏng (4): Vết bỏng phục hồi hoàn toàn, da hình thành bóng mịn và không có dấu hiệu sẹo, lông đã bắt đầu mọc trở lại.

Từ kết quả thử nghiệm lâm sàng ban đầu trên thỏ cho thấy tổ hợp vật liệu AgNP – Curcumin – WS chitosan có tác dụng rõ trong điều trị bỏng, không có hiện tượng hình thành các sẹo lồi. Chính sự phóng thích dần các ion bạc từ các hạt nano bạc đã giúp tiêu diệt khuẩn, tránh nhiễm trùng vết thương và ngăn chặn hiện tượng tạo sẹo lồi; WS chitosan xúc tiến cho việc hình thành các mô mới [8, 9]; curcumin cũng ngăn cản sự tạo thành sẹo trên vết thương.

4. Kết luận

Vật liệu tổ hợp AgNP – Curcumin – WS chitosan hòa tan thể hiện tính kháng khuẩn tốt với hai chủng vi khuẩn: Gram (-) *Escherichia coli* và Gram (+) *Staphylococcus aureus* (khuẩn tụ cầu vàng). Kết quả thử lâm sàng trên thỏ cho thấy vật liệu tổ hợp này có khả năng điều trị bỏng tốt, các vết thương bỏng khô, không

có hiện tượng viêm nhiễm và không để lại sẹo. Tổ hợp vật liệu này có thể tiếp tục nghiên cứu để triển khai ứng dụng trong điều trị bỏng có hiệu quả trên người.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Gia Tiên, Nghiên cứu tác dụng của nano bạc điều trị tại chỗ tổn thương bỏng, Báo cáo nghiệm thu đề tài nhánh Nghị định thư - Viện Bỏng Lê Hữu Trác. Hà Nội, 26 – 27.
- [2] M. H. Branton, J. B. Kopp (1999), TGF-beta and fibrosis, *Microbes Infect.* 1349 – 1365.
- [3] N. H. Chau, N. Q. Buu (2008), et al, Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection- *Adv. Nat. Sci and Tech (VAST).* 241 – 248.
- [4] Trần Thị Ngọc Dung, Nguyễn Hoài Châu, Đào Trọng Hiền... (2011), Nghiên cứu tác dụng của băng nano bạc lên quá trình điều trị vết thương bỏng, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ.* 4987 – 4992.
- [5] Mahendra R, et al (2009), Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnol. Adv.* 76 – 83.
- [6] Entsar S. Abdou, Khaled S.A. Nagy and Maher Z. Elsabee (2008), Extraction and characterization of chitin and WS chitosan from local sources, *Bioresource Technology.* 1359 – 1367.
- [7] Majeti N.V. Ravi Kumar (2000), A review of chitin and WS chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers.* 1 – 27.
- [8] Jin Y, Ling PX, et al (2007), Effects of WS chitosan and heparin on early extension of burns, *Burns.* 1027 – 1031.

- [9] Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S, et al (1995), Evaluation of chitin and WS chitosan on open wound healing in dogs, *J Vet Med Sci.* 57851– 57854.
- [10] Kassae M.Z, et al (2008), γ -Ray synthesis of starch-stabilized silver nanoparticles with antibacterial activities, *Radiation Physics and Chemistry.* 1074 – 1078.

FABRICATING SILVER NANOPARTICLES – CURCUMIN – WATER SOLUBLE CHITOSAN COMPOSITE AND EVALUATING ITS CAPACITY FOR BURN TREATMENT

Abstract: This paper presents a method for fabricating AgNP – Curcumin – WS chitosan composite and evaluating its capability for burn treatment. The size of AgNP synthesized from AgNO₃ using sodium nitrate as a reducing agent was in the range of 16 to 18 nm. The formation of the synthesized AgNP was characterized by means of the UV – Vis method and X-ray diffraction (XRD); the size of the synthesized AgNP was specified via the TEM method. Antibacterial tests against Gram-negative and Gram-positive bacteria showed that the synthesized sample demonstrated significant effects against both *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clinical tests on rabbits resulted in the fact that the burns was dry and disinfected, especially with no scars left after healing, which proved the capability for burn treatment of this material.

Key words: water soluble chitosan; silver nanoparticle; curcumin; antibacterial materials; burn treatment materials.