



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0052864

(51)^{2022.01} A61P 31/04; A61K 36/61

(13) B

(21) 1-2023-03754

(22) 09/06/2023

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/09/2023 426A

(73) Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A13, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

(72) Võ An Quân (VN); Thái Hoàng (VN); Nguyễn Thúy Chinh (VN); Hoàng Trần Dũng (VN); Lê Trọng Lư (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT MÀNG SINH HỌC CHITOSAN BIẾN TÍNH CHỨA CAO LÁ SIM VÀ MÀNG SINH HỌC THU ĐƯỢC THEO QUY TRÌNH NÀY

(21) 1-2023-03754

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính bằng cách in 3D, trong đó bằng cách chiết và kết hợp thành phần hoạt chất từ lá cây sim (*Rhodomirtus tomentosa*) với thành phần chitosan cho phép thu được chế phẩm có khả năng tạo màng bằng kỹ thuật in 3D. Quy trình sản xuất màng sinh học theo sáng chế cho phép thu được màng sinh học độ dày từ 0,1 đến 1mm có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*, kháng viêm và không gây độc lên tế bào thường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y dược, vật liệu sinh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim bằng kỹ thuật in 3D để trị mụn và viêm do vi khuẩn gây ra. Sáng chế cũng đề cập đến màng sinh học chứa cao lá sim được phân tán trong lớp màng chitosan được in bằng kỹ thuật in 3D để tạo ra màng sinh học có chất lượng bề mặt đồng đều, nhẵn, mịn, có đặc tính, hoạt tính sinh học và hiệu quả điều trị mụn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mụn là một căn bệnh ngoài da mạn tính khá phổ biến, xuất hiện ở nhiều lứa tuổi, thường thấy nhất là ở độ tuổi thanh, thiếu niên (từ 13 đến 25 tuổi). Có nhiều loại mụn cũng như nguyên nhân gây ra bệnh, trong đó có thể kể đến mụn trứng cá thông thường do sự tăng cường hoạt động của vi khuẩn *Cutibacterium acnes* (trước kia gọi là *P.acnes*) hay mụn nhọt, mụn mủ do vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Bệnh này thường thấy xuất hiện trên da, các bộ phận ở mặt và một số bộ phận cơ thể khác. Để chữa trị các bệnh ngoài da gây ra do các vi khuẩn này, các phương pháp phổ biến hiện nay là sử dụng thuốc uống hoặc bôi theo y học hiện đại có chứa chất kháng sinh. Tuy nhiên, phương pháp này có giá thành cao, có nhiều tác dụng phụ như gây kích ứng da, nổi mẩn đỏ, dị ứng hay tình trạng kháng kháng sinh. Vì vậy, trong thời gian gần đây việc sử dụng các thuốc trị mụn có thành phần dược liệu tự nhiên sẵn có trong tự nhiên đang dần trở thành xu hướng phổ biến ở Việt Nam cũng như trên thế giới.

Chitosan là một polyme thiên nhiên dẫn xuất của chitin, có ở vỏ tôm, cua, giáp xác trong tự nhiên. Chitosan tan trong axit loãng và có các đặc tính ưu việt đối với tạo màng phủ, che vết thương hở, bao gồm hoạt tính sinh học, khả năng phân hủy sinh học, không độc tính, tương hợp sinh học và khả năng tạo màng tốt. Ngoài ra, chitosan còn có hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn với nhiều loại vi khuẩn khác nhau, kích thích tăng sinh, nuôi dưỡng tế bào trong điều kiện nghèo dinh dưỡng, chống sưng tấy.

Cao lá sim đã được dùng để trị bỏng, cao lá sim giàu các thành phần polyphenol tốt cho da, không gây kích ứng, bỏng rát hoặc xót, giúp giảm đau nhanh, chống loét lây lan, làm vết thương sạch khô và mau lành. Cao lá sim có tác dụng làm rụng nhanh

các hoạt tử ở vết bỏng, làm se khô và tạo màng thuốc màu đen xám, bền có khả năng che phủ vết thương, tránh vi khuẩn xâm nhập vào, từ đó làm cho vết thương nhanh lành. Trong một vài nghiên cứu hiện nay đã chỉ ra rằng, trong lá sim có chứa các hợp chất hóa học có khả năng làm se và có khả năng kháng sinh, kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hóa rất tốt, không thể không kể đến hoạt chất đại diện là polyphenol, rhodomyrtone. Cao chiết lá sim có tác dụng trên một số dòng vi khuẩn gram dương gây mụn trên mô hình thử nghiệm ở da bò, có tác động lên hệ vi khuẩn gây mụn trên da, nó là tác nhân điều chỉnh hệ vi sinh và có khả năng giảm viêm, chống tái phát.

Trong những năm gần đây, công nghệ in 3D được nghiên cứu phát triển mạnh mẽ, các ứng dụng của công nghệ in 3D được mở rộng trong nhiều lĩnh vực khoa học, kỹ thuật, công nghiệp khác nhau, đặc biệt là trong lĩnh vực y dược. Đây là công nghệ hiện tại được sử dụng để rút ngắn thời gian chế tạo các mẫu thử nghiệm, rất thuận tiện khi cần mở rộng quy mô. Việc ứng dụng công nghệ in 3D trong chế tạo các vật liệu sử dụng cho ngành dược và vật liệu y tế cho thấy tính thực tiễn và tính khả thi cao của công nghệ này. Ưu điểm của công nghệ in 3D đó là hầu như sử dụng rất ít dung môi hoặc không sử dụng nên thân thiện với môi trường, không gây ra ô nhiễm thứ cấp. Hơn thế nữa, có thể thiết kế, kiểm soát dạng hình học của các sản phẩm chế tạo phù hợp với nhu cầu sử dụng. Hafezi và cộng sự (3D printed chitosan dressing crosslinked with genipin for potential healing of chronic wounds, International Journal of Pharmaceutics, Volume 560, 5 April 2019, Pages 406-415) đã chế tạo màng chitosan dạng gel bằng công nghệ in 3D, các đặc trưng, tính chất của màng đã được khảo sát như độ bền kéo đứt, khả năng thấm hút chất lỏng, độ dẻo, mức độ phân tán, hình thái cấu trúc và khả năng gây độc tế bào. Kết quả thu được cho thấy màng chitosan có tính năng phù hợp để phủ và làm lành vết thương.

Tài liệu “Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications– A review” đăng trên tạp chí Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 142, October 2021, 111970, hạt nano chitosan biến tính với tripolyphosphate được sử dụng để mang các hợp chất polyphenol thực vật bằng phương pháp gel ion hóa. Hạt nano có tác dụng bảo vệ, kiểm soát và phân phối polyphenol trực tiếp tại chỗ và có thể được sử dụng như một hệ thuốc mới hoặc thực phẩm chức năng. Tuy nhiên, tài liệu này chưa đề cập đến việc sử dụng chitosan biến tính để bao các hoạt chất, cụ thể là thành phần có trong cao

lá sim cho phép tạo màng bằng phương pháp in 3D để ứng dụng trong điều trị các bệnh về da.

Tài liệu “Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles”, đăng trên tạp chí Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 82, Issue 2, 1 February 2011, Pages 297-301, các tác giả đã chế tạo hạt nano polyphenol trà được phủ với chitosan bằng phương pháp gel ion hóa. Các đặc trưng phổ hồng ngoại, hình thái cấu trúc, hàm lượng thuốc và tốc độ bao thuốc của hạt nano đã được đánh giá. Hạt nano này có khả năng ức chế tế bào ung thư HepG2. Bài báo này sử dụng polyphenol trà để nghiên cứu, họ không sử dụng polyphenol lá sim. Ngoài ra, phương pháp chế tạo sử dụng là phương pháp gel ion hóa, chưa đề cập đến phương pháp in 3D.

Sáng chế CN102631472A đề cập đến phương pháp chế tạo hạt nano chitosan polyphenol trà bằng phương pháp gel ion hóa sử dụng tác nhân tạo gel là natri tripolyphosphat, chất tạo xốp silic dioxit. Hạt nano có tỷ lệ khối lượng chitosan từ 3 đến 6 phần, silic dioxit xốp từ 1 đến 2 phần, và polyphenol trà từ 1 đến 4 phần. Các hạt nano này có thể ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực y sinh và các sản phẩm thực phẩm chức năng, có thể sử dụng để hạ cholesterol máu, điều trị bệnh béo phì, chống oxy hóa, ngăn cản và điều trị khối u.

Có thể thấy, việc kết hợp giữa chitosan biến tính và cao chiết lá sim hiện chưa có công bố hay sáng chế, giải pháp hữu ích liên quan. Các vật liệu chitosan chứa polyphenol chủ yếu là polyphenol trà, vật liệu được chế tạo ở dạng hạt nano bằng phương pháp gel ion hóa. Nói cách khác, nghiên cứu phát triển vật liệu màng sinh học chitosan biến tính chứa polyphenol có trong cao lá sim bằng công nghệ in 3D ứng dụng trong điều trị mụn còn rất hạn chế. Vật liệu sinh học dạng màng chitosan biến tính với natri tripolyphosphat và cao lá sim giàu hoạt chất polyphenol được đề cập trong sáng chế sở hữu các đặc tính như khả năng trương nở, bọc bịt, kháng khuẩn, khi phủ lên vết mụn sẽ giúp ức chế vi khuẩn, tạo màng che chắn, chống xâm nhập, giúp vết thương mau lành, không để lại sẹo.

Do đó, vẫn có nhu cầu phát triển một loại vật liệu kết hợp các đặc tính của chitosan và cao chiết lá sim để tạo màng, tốt nhất là có thể tạo ra bằng kỹ thuật in 3D

để tận dụng tối đa khả năng tái tạo cấu trúc 3D thích hợp kết hợp để khai thác được ưu thế của màng chitosan và thành phần cao chiết lá sim.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính bằng cách in 3D, trong đó bằng cách kết hợp thành phần chitosan với cao chiết từ lá sim cho phép phát triển chế phẩm có hoạt tính kháng khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn gây viêm *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes* cũng như có khả năng kháng viêm và không gây độc lên tế bào thường. Ngoài ra, bằng cách in 3D, sáng chế cho phép tạo ra màng sinh học chitosan biến tính kết hợp với thành phần hoạt chất có bề mặt đồng nhất, độ dày được kiểm soát và có thể tạo màng in với cấu trúc phức tạp đáp ứng nhu cầu sử dụng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến màng sinh học chitosan biến tính thu được từ quy trình theo sáng chế.

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính bằng cách in 3D, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chiết tách cao lá sim bằng cách thu hái lá cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa*), sau khi sấy khô và chiết lá sim trong hệ dung môi etanol:nước:axit axetic với tỷ lệ 6:4:0,1 (theo thể tích) ở nhiệt độ 65°C trong 3 giờ trong điều kiện siêu âm, sau khi lọc bã thu dịch chiết và cô bằng thiết bị quay chân không thu được hỗn hợp chiết lá sim dạng cao đặc;

b) chuẩn bị nguyên liệu tạo màng sinh học với các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng sau:

Chitosan	4-6
Cao lá sim	0,5-3
Natri tripolyphosphat	0,01-0,1
Axit axetic 1%	92-95,1

c) chuẩn bị gel chitosan biến tính bằng cách hòa tan lượng chitosan với một lượng vừa đủ axit axetic 1% và khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng thu dung dịch chitosan, tiếp đó hòa tan lượng natri tripolyphosphat với lượng axit axetic 1% còn lại để thu được dung dịch natri tripolyphosphat, sau đó bổ sung từ từ dung dịch này vào

dung dịch chitosan, khuấy mạnh và siêu âm trong 3 giờ thu được gel chitosan biến tính;

d) thu phức hệ gel chitosan-caolá sim bằng cách bổ sung caolá sim vào gel chitosan biến tính thu được ở trên, tiếp tục khuấy trong điều kiện siêu âm trong thời gian 3 giờ để thu phức hệ gel chitosan-caolá sim đồng nhất; và

e) in tạo màng sinh học chitosan biến tính bằng cách chuyển phức hệ chitosan-caolá sim vào bình chứa của máy in 3D, tiếp đó in phủ lên bề mặt vật mang tạo lớp màng in đồng nhất, sau khi để khô tự nhiên ở nhiệt độ $30 \pm 0,1$ °C thu được màng sinh học chitosan biến tính chứa caolá sim có độ dày từ 0,1 đến 1 mm.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quá trình in tạo màng được thực hiện bằng máy in 3D với hình dạng được lập trình trước, sau mỗi quá trình in, màng có thể được để khô tự nhiên ở nhiệt độ $30 \pm 0,1$ °C và in lặp lại từ 2 đến 10 lần để tăng độ dày của màng sinh học.

Theo một phương án ưu tiên khác, trong đó quy trình này còn bao gồm bước cắt và đóng gói vật mang chứa màng sinh học trong túi PE để tránh tạp nhiễm trước khi sử dụng.

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề cập đến màng sinh học chitosan biến tính thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó màng sinh học này sau khi khô tự nhiên bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng như sau:

Chitosan	60-85
Cao lá sim	10-35
Natri tripolyphosphat	0,5-1
Axit axetic	0,02-0,04
Hàm ẩm	2-4

màng này có độ dày từ 0,1 đến 1mm, có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*, kháng viêm và không gây độc lên tế bào thương.

Màng sinh học chitosan biến tính chứa caolá sim theo sáng chế thích hợp dùng để trị mụn cũng như kháng vi khuẩn gây viêm như *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường của màng sinh học được chế tạo theo phương án được ưu tiên theo sáng chế.

Hình 2 là hình ảnh phổ hồng ngoại của màng sinh học được chế tạo theo phương án được ưu tiên theo sáng chế

Hình 3 là hình ảnh thử nghiệm hoạt tính sinh học với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Hình 4 là hình ảnh thử nghiệm hoạt tính sinh học với chủng vi khuẩn *Cutibacterium acnes*

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả thông qua các phương án lựa chọn và các ví dụ thực hiện minh họa cụ thể. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, các phương án lựa chọn và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế. Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính và màng sinh học chitosan biến tính thu được từ quy trình này.

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chiết tách cao lá sim; b) chuẩn bị nguyên liệu tạo màng sinh học; c) chuẩn bị gel chitosan biến tính; d) thu phức hệ gel chitosan-cao lá sim; và e) in tạo màng sinh học chitosan biến tính.

Trong bước chiết tách cao lá sim, thành phần cao lá sim thu được bằng cách thu hái lá cây sim và rửa sạch. Cây sim có tên khoa học là *Rhodomyrtus tomentosa*, là một loài cây bụi, mọc hoang. Lá cây sau khi thu hái, rửa sạch, sau khi sấy khô, lá được chiết để thu cao toàn phần. Quá trình chiết được thực hiện trong hệ dung môi etanol:nước:axit axetic với tỷ lệ 6:4:0,1 (theo thể tích) ở nhiệt độ 65°C trong 3 giờ trong điều kiện siêu âm. Sau khi lọc bã thu dịch chiết và cô bằng thiết bị quay chân không thu được hỗn hợp chiết lá sim dạng cao đặc. Thành phần cao chiết lá cây sim này được sử dụng như một thành phần giàu polyphenol. Hàm lượng polyphenol tổng được xác định trong dịch cao lá sim đặc đạt giá trị khoảng 40 mgGAE/g, khả năng

chống oxy hóa tốt với chỉ số khả năng trung hòa 50 % gốc tự do (SC₅₀) đạt 170 µg/mL, có khả năng kháng vi khuẩn gây viêm như *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu tạo màng sinh học, các thành phần để tạo màng sinh học được chuẩn bị bao gồm chitosan, cao lá sim, natri tripolyphosphat, axit axetic, nước cất với các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng sau:

Chitosan	4-6
Cao lá sim	0,5-3
Natri tripolyphosphat	0,01-0,1
Axit axetic 1%	92-95,1

Chitosan có bản chất là polysaccarit mạch thẳng được cấu tạo từ các D-glucosamine (đơn vị đã được deaxetyl hóa) và N-axetyl-D-Glucosamin (đơn vị chứa nhóm axetyl) liên kết tại vị trí β -(1-4). Chitosan được sản xuất từ quá trình xử lý vỏ các loài giáp xác (ví dụ vỏ tôm, cua) với dung dịch kiềm NaOH. Chitosan được sử dụng theo sáng chế đóng vai trò tạo cấu trúc cho màng sinh học thu được, vừa có khả năng tạo che chắn vết thương (mụn, vết thương nhỏ). Lượng chitosan được sử dụng để tạo màng sinh học theo sáng chế nằm trong khoảng từ 4 đến 8 % theo khối lượng. Nếu lượng chitosan nhỏ hơn 4 %, độ nhớt của dung dịch không đủ lớn để có thể thực hiện quá trình in 3D tạo màng sinh học, màng sinh học thu được có cấu trúc không đồng đều. Ngược lại, nếu lượng chitosan lớn hơn 8 %, độ nhớt của hỗn hợp quá cao, sẽ khó để in 3D tạo màng sinh học.

Thành phần cao lá sim thu được bằng cách chiết lá cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) trong dung môi etanol:nước:axit axetic với tỷ lệ 6:4:0,1 (theo thể tích). Cao lá sim đóng vai trò làm thành phần hoạt chất kháng khuẩn, làm liền sẹo, lành vết thương. Lượng cao lá sim để sản xuất màng sinh học tốt nhất là từ 1 đến 3 % theo trọng lượng nguyên liệu ban đầu.

Thành phần natri tripolyphosphat được sử dụng để biến tính thành phần chitosan. Tác nhân này có vai trò tạo liên kết ngang các chuỗi phân tử chitosan, làm cho cấu trúc của chitosan chặt chẽ hơn, khả năng tạo màng bền hơn so với chitosan không biến tính.

Axit axetic được sử dụng theo sáng chế đóng vai trò là dung môi dùng để hòa tan chitosan. Axit axetic sử dụng để giúp hòa tan chitosan tạo hệ gel và giảm pH của gel, giúp gel có độ nhớt thích hợp khi dùng làm thành phần nguyên liệu khi in bằng thiết bị in 3D để tạo màng.

Trong bước chuẩn bị gel chitosan biến tính, sử dụng axit axetic 1% bằng cách dùng axit axetic 99,9% hòa tan với một lượng nước cất đạt tỷ lệ 1/99 (theo khối lượng). Sau đó bổ sung chitosan và khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng để thu dịch chitosan đồng nhất. Để biến tính chitosan, hòa tan lượng natri tripolyphosphat đã chuẩn bị trong axit axetic 1% rồi bổ sung vào dung dịch chitosan. Sau khi khuấy trong điều kiện siêu âm trong 3 giờ thu được gel chitosan biến tính.

Trong bước thu phức hệ gel chitosan-caolá sim bằng cách bổ sung caolá sim vào gel chitosan biến tính thu được ở trên, tiếp tục khuấy trong điều kiện siêu âm trong thời gian 3 giờ để thu phức hệ gel chitosan-caolá sim đồng nhất. Tốt nhất là quá trình này được thực hiện trong điều kiện rung siêu âm trong 3 giờ để đảm bảo caolá sim được phân tán tốt, không bị vón cục, để thu được mẫu gel đồng nhất. Caolá sim được phối trộn vào màng chitosan biến tính theo tỉ lệ phù hợp nhằm bọc bịt, bảo vệ tránh bị oxy hóa, kéo dài thời hạn sử dụng cho caolá sim.

Trong bước in tạo màng sinh học chitosan biến tính, tiến hành chuyển phức hệ chitosan-caolá sim vào bình chứa của máy in 3D. Tiếp đó in phủ lên bề mặt vật mang tạo lớp màng in đồng nhất, sau khi để khô tự nhiên ở nhiệt độ $30 \pm 0,1$ °C thu được màng sinh học chitosan biến tính chứa caolá sim có độ dày từ 0,1 đến 1 mm. Tốt nhất là quá trình này màng được thực hiện bằng máy in 3D với hình dạng được lập trình trước, sau mỗi quá trình in, màng có thể được để khô tự nhiên ở nhiệt độ $30 \pm 0,1$ °C và in lặp lại từ 2 đến 10 lần để tạo ra từ 2 đến 10 lớp in chồng lên nhau để tăng độ dày của màng sinh học.

Theo một phương án ưu tiên, màng sinh học được in từ 2 đến 5 lớp, tốt hơn là có độ dày màng khô nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 mm, tốt nhất là 0,4 mm để tạo thuận lợi cho quá trình tạo ra màng sinh học chitosan biến tính chứa caolá sim có cấu trúc và độ dày đồng đều, nhờ đó tăng khả năng điều trị mụn. Khi ở trong màng chitosan, nhờ các tương tác giữa các nhóm chức hóa học của polyphenol có trong caolá sim và chitosan biến tính, các liên kết vật lý, tĩnh điện hình thành sẽ hỗ trợ cho quá trình hấp

phụ polyphenol trong cao lá sim vào màng chitosan biến tính và làm thay đổi quá trình giải phóng của polyphenol.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quy trình này còn bao gồm bước cắt và đóng gói vật mang chứa màng sinh học trong túi PE để tránh tạp nhiễm trước khi sử dụng.

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề cập đến màng sinh học chitosan biến tính thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó, sau khi khô tự nhiên, màng sinh học này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng như sau:

Chitosan	60-85
Cao lá sim	10-35
Natri tripolyphosphat	0,5-1
Axit axetic	0,02-0,04
Hàm ẩm	2-4

màng này có độ dày từ 0,1 đến 1mm, có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*, kháng viêm và không gây độc lên tế bào thường.

Màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim theo sáng chế có thể bao gồm từ 1 đến 10 lớp màng được in 3D chồng lên nhau, thích hợp dùng để trị mụn cũng như kháng vi khuẩn gây viêm như *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*.

Màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim có chất lượng bề mặt đồng đều, nhẵn, mịn, có đặc tính, hoạt tính sinh học và hiệu quả tốt đối với điều trị các loại mụn. Màng sinh học có tính ổn định cao, an toàn, thân thiện và có khả năng tương thích sinh học tốt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim giàu polyphenol

Lá cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) tươi được thu hái, rửa sạch, sấy khô. Sau đó chuyển 250 gam lá khô của cây sim vào bình chiết chứa 5 lít hệ dung môi ethanol: nước: axit axetic theo tỷ lệ thể tích là 6:4:0,1. Tiến hành chiết lá sim ở nhiệt độ 65°C trong vòng 3 giờ trong điều kiện siêu âm. Dịch chiết sim được gạn lọc vào bình chứa,

loại bỏ phần bã lá. Sau đó, dịch chiết sim được cất loại còn ở nhiệt độ 50°C bằng thiết bị cô quay chân không thu được 80 ml phần chiết ở dạng cao đặc.

Để thực hiện biến tính chitosan, sử dụng 1g chitosan hòa tan trong 20 g dung dịch axit axetic 1%, khuấy liên tục bằng thiết bị khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng, thu được dung dịch chitosan đồng nhất. Tiếp đó, thêm 2 g dung dịch natri tripolyphosphat (0,01 g natri tripolyphosphat định mức với dịch axit axetic 1% đến 2 g dung dịch) vào dung dịch chitosan, sau đó khuấy hỗn hợp liên tục trên máy khuấy từ kết hợp siêu âm trong 3 giờ để thu được gel chitosan biến tính.

Chuẩn bị 3 mẫu (kí hiệu M1, M2, M3) bằng cách bỏ sung lần lượt 0,14 g, 0,28 g và 0,55 g cao lá sim thu được ở trên vào mẫu gel chitosan biến tính ở trên theo (tương ứng với tỷ lệ 1,18 % theo khối lượng trên tổng hỗn hợp gel). Sau đó khuấy hỗn hợp liên tục trên máy khuấy từ kèm khuấy siêu âm trong 3 giờ để thu được hỗn hợp gel đồng đều. Mẫu gel chitosan biến tính chứa cao lá sim được đưa vào xi lanh và được xem như mực in và được lắp vào thiết bị in 3D.

Quá trình in được tiến hành như sau: trước tiên, tệp tin thiết kế 3D hình dạng màng sinh học được thiết kế trên phần mềm SolidWorks sau đó được lưu dưới dạng tệp có đuôi dạng .stl, tiếp theo, tệp tin g-code để điều khiển máy in 3D được tạo trên phần mềm KISSlicer và được sử dụng để điều khiển máy in 3D tùy biến với đầu in sử dụng mực in dạng lỏng để đẩy mực in đã được chuẩn bị trong xilanh qua đầu kim phun lên trên để in tạo ra sản phẩm in theo thiết kế. Đầu in sử dụng kim phun G20 (đường kính trong 0,6 mm, đường kính ngoài 0,91 mm), tốc độ in 20 mm/s, mẫu in có kích thước 50x50 mm. Sau khi hoàn thành một lượt in, để màng khô tự nhiên, máy in tiếp tục được điều khiển để in lớp sau phủ lên lớp trước đến khi thu được màng sinh học có độ dày phù hợp.

Cuối cùng, để màng sinh học thu được ở trên khô tự nhiên ở nhiệt độ $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ để thu được các màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim có độ dày từ 0,1- 0,5 mm tương ứng với mẫu M1, M2 và M3. Bảo quản màng sinh học thu được trong túi PE kín.

Ví dụ 2. Đánh giá chất lượng màng sinh học

Để đánh giá chất lượng màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim thu được, các mẫu M1, M2 và M3 thu được từ Ví dụ 1 được đánh giá về phổ hồng ngoại

(xác định nhóm chức), hình thái cấu trúc (xác định độ đồng đều), độ trương và khả năng kháng khuẩn, kháng viêm, điều trị mụn. Các mẫu đối chứng được kiểm tra bao gồm ĐC1 chỉ có cao chiết lá sim và ĐC2 chỉ có chitosan với lượng tương ứng với mẫu M1.

Kết quả cho thấy polyphenol có trong cao lá sim được phân tán đều trong nền chitosan, không xuất hiện kết tụ.

Bảng 1. Các đặc trưng và khả năng kháng khuẩn, kháng viêm và điều trị mụn của các màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim chế tạo bằng quy trình in 3D

Đặc trưng	M1	M2	M3	ĐC1	ĐC2
Nhóm chức	N-H, C-O, O-H, C-H	N-H, C-O, O-H, C-H	N-H, C-O, O-H, C-H	O-H, C-O	O-H, C-O, N-H, C-H
Cấu trúc của màng	đồng đều	đồng đều	đồng đều	không đồng đều	đồng đều
Độ trương trong dung dịch mô phỏng dịch cơ thể người (SBF) sau 30 phút thử nghiệm (lần)	0,6-0,8	0,6-0,8	0,6-0,8	0	0,7-1,5
Giá trị IC ₅₀ hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxit trên tế bào RAW264.7 (hoạt tính kháng viêm) (µg/ml)	19,4	19,5	19,6	22,76	21,08
Độc tế bào thường Vero (IC ₅₀ , µg/ml)	> 100	> 100	> 100	>256	> 100

Kết quả thể hiện trên Bảng 1 cho thấy, các mẫu M1, M2 và M3 là các mẫu màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim được tạo từ quy trình in 3D theo sáng chế có cấu trúc đồng đều, có chứa các nhóm chức C-O, N-H, O-H, C-H, có hoạt tính kháng khuẩn, kháng viêm và điều trị mụn tốt hơn đáng kể so với các mẫu đối chứng chỉ chứa các thành phần riêng lẻ là cao lá sim (ĐC1) hoặc chitosan (ĐC2). Hoạt tính kháng viêm của màng sinh học thu được theo sáng chế tốt hơn so với các mẫu đối chứng. Hơn thế nữa, màng sinh học thu được theo sáng chế không gây độc lên tế bào thường. Như vậy, bằng quy trình in 3D, màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim giàu hoạt chất polyphenol được chế tạo theo sáng chế có hiệu quả kháng viêm và điều trị mụn vượt trội so với các thành phần riêng lẻ.

Ví dụ 2. Đánh giá tác dụng đối với vi khuẩn gây bệnh

- Mẫu thử nghiệm gồm 3 mẫu màng sinh học M1, M2, M3 lần lượt chứa 0,14 g, 0,28 g và 0,55 g theo tỉ lệ khối lượng cao lá sim/ chitosan biến tính, tương đương với 11,6%, 20,7% và 34,3% trên tổng khối lượng màng thu được. Các mẫu ĐC1 gồm cao sim 100% pha loãng với nước cất đến 40 lần, ĐC2 gồm màng chitosan 100%.

- Đối tượng vi khuẩn sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính gồm *S. aureus* và *C. acnes*

- Đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao sim và màng sinh học có chứa cao sim được tiến hành theo phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa. Chủng vi khuẩn kiểm định *Staphylococcus aureus* được nuôi trên môi trường LB bán lỏng trong điều kiện hiếu khí. Chủng *Cutibacterium acnes* được nuôi trên môi trường Mueller-Hinton thạch đặc trong điều kiện kỵ khí (Mais E. Ahmed et. al., 2020). Hoạt tính kháng khuẩn được biểu thị bằng việc không có sự phát triển của vi khuẩn ngay bên dưới mẫu thử nghiệm (Bauer et al., 1966). Cụ thể: 50 µl dịch huyền phù vi khuẩn kiểm định ($OD_{600} = 1$) đã được bổ sung vào 25 ml môi trường thạch để đổ đĩa. Các đĩa thạch được đục giếng (có đường kính 8 mm) và 100 µl dịch chiết cao sim đã được nhỏ vào trong giếng.

Ba mẫu màng sinh học M1, M2, M3 nêu trên đã được cắt thành các miếng có hình tròn với đường kính 0,5 mm và được đặt lên bề mặt thạch. Mẫu màng 100% chitosan được sử dụng làm màng đối chứng âm. Các đĩa thạch được giữ ở 4°C trong 4 giờ và chuyển sang nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian nuôi ở trên, lấy mẫu ra quan sát và đo kích thước các vòng tròn vô khuẩn.

- kết quả thu được, so sánh kết quả, số liệu chứng minh, hình chụp 1A

Đặc trưng	M1	M2	M3	ĐC1	ĐC2
Đường kính vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn <i>S.aureus</i> (mm)	30	28	32	10	0
Đường kính vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn gây mụn <i>C. acnes</i> (mm)	26	29	37	7	0

Các mẫu màng sinh học chitosan biến tính chứa cao lá sim có hoạt tính tốt hơn so với các mẫu đối chứng chỉ chứa chitosan (ĐC2) hoặc cao lá sim pha loãng (ĐC1). Kết quả thử nghiệm cho thấy giá trị đường kính vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn gây mụn

viêm *S.aureus* của màng sinh học theo sáng chế gấp khoảng 3 lần so với mẫu đối chứng (polyphenol cao lá sim và chitosan). Thử nghiệm đối với vi khuẩn gây mụn *P. acnes* cho thấy

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình chế tạo màng sinh học chitosan biến tính có chứa cao lá sim giàu hoạt chất có tác dụng trị mụn và màng sinh học thu được bằng quy trình này có chất lượng bề mặt đồng đều, nhẵn, mịn, có đặc tính, hoạt tính sinh học và hiệu quả tốt đối với điều trị các loại mụn. Cụ thể hơn, khi so với mẫu đối chứng là màng chitosan, màng chitosan biến tính và cao lá sim, màng sinh học theo sáng chế có hiệu quả tiêu diệt các vi khuẩn gây mụn *P.acnes* vượt trội so với các mẫu đối chứng chỉ chứa chitosan hoặc cao lá sim.

Sản phẩm của sáng chế là màng sinh học có hiệu quả hiệp đồng làm tăng khả năng chống nhiễm trùng, giảm sưng viêm từ đó gia tăng hiệu quả điều trị, đồng thời sản phẩm sẽ sở hữu các đặc tính như ổn định, an toàn, thân thiện, tương thích sinh học, ngoài các ưu điểm khác về chất lượng bề mặt, độ đồng đều và thời gian chế tạo ngắn.

Ngoài ra, giải pháp theo sáng chế được cho là không chỉ hoàn toàn khác biệt với các giải pháp đã biết xét về công nghệ chế tạo mẫu, hình dạng sản phẩm, thành phần vật liệu và lượng tương ứng, v.v., mà còn có thể dùng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực công nghệ vật liệu mới. Nói cách khác, sáng chế giải quyết được vấn đề cả về tính thực tiễn và học thuật. Quy trình theo sáng chế phù hợp với điều kiện chế tạo và ứng dụng tại Việt Nam và còn được sử dụng làm cơ sở tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan trong lĩnh vực kỹ thuật này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất màng sinh học chitosan biến tính bằng cách in 3D, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chiết tách cao lá sim bằng cách thu hái lá cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa*), sau khi sấy khô và chiết lá sim trong hệ dung môi etanol:nước:axit axetic với tỷ lệ 6:4:0,1 (theo thể tích) ở nhiệt độ 65°C trong 3 giờ trong điều kiện siêu âm, sau khi lọc bã thu dịch chiết và cô bằng thiết bị quay chân không thu được hỗn hợp chiết lá sim dạng cao đặc;

b) chuẩn bị nguyên liệu tạo màng sinh học với các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng sau:

Chitosan	4-6
Cao lá sim	0,5-3
Natri tripolyphosphat	0,01-0,1
Axit axetic 1%	92-95,1

c) chuẩn bị gel chitosan biến tính bằng cách hòa thành phần axit axetic với một lượng nước cất theo tỷ lệ 1/90 (theo khối lượng), sau đó bổ sung chitosan và khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng thu dung dịch chitosan đồng nhất, sau đó hòa tan lượng natri tripolyphosphat với lượng nước cất còn lại rồi bổ sung vào dung dịch chitosan, sau khi khuấy trong điều kiện siêu âm trong 3 giờ thu được gel chitosan biến tính;

d) thu phức hệ gel chitosan-cao lá sim bằng cách bổ sung cao lá sim vào gel chitosan biến tính thu được ở trên, tiếp tục khuấy trong điều kiện siêu âm trong thời gian 3 giờ để thu phức hệ gel chitosan-cao lá sim đồng nhất; và

e) in tạo màng sinh học chitosan biến tính bằng cách chuyển phức hệ chitosan-cao lá sim vào bình chứa của máy in 3D, tiếp đó in phủ lên bề mặt vật mang tạo lớp màng in đồng nhất, sau khi để khô tự nhiên ở nhiệt độ 30±0,1 °C thu được màng sinh học chitosan biến tính chứa polyphenol lá sim có độ dày từ 0,1 đến 1 mm.

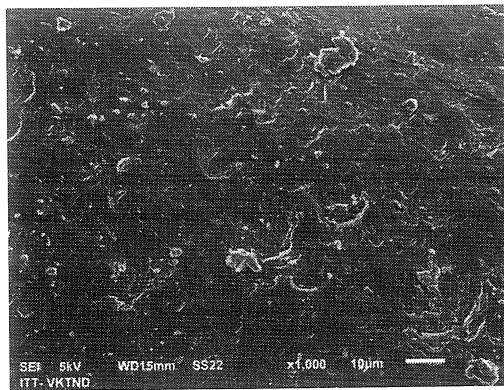
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quá trình in tạo màng được thực hiện bằng máy in 3D với hình dạng được lập trình trước, sau mỗi quá trình in, màng có thể được để khô tự nhiên ở nhiệt độ 30±0,1 °C và in lặp lại từ 2 đến 10 lần để tăng độ dày của màng sinh học.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó còn bao gồm bước cắt và đóng gói vật mang chứa màng sinh học trong túi PE để tránh tạp nhiễm trước khi sử dụng.

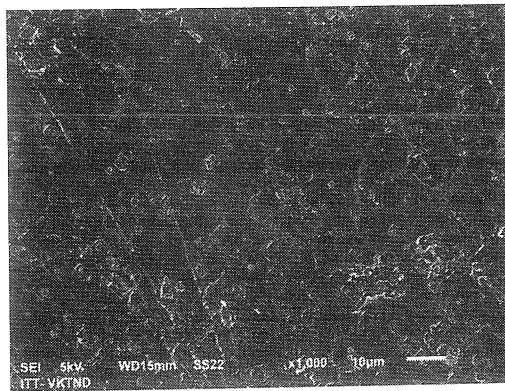
4. Màng sinh học chitosan biến tính thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó màng sinh học này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng như sau:

Chitosan	60-85
Cao lá sim	10-35
Natri tripolyphosphat	0,5-1
Axit axetic	0,02-0,04
Hàm ẩm	2-4

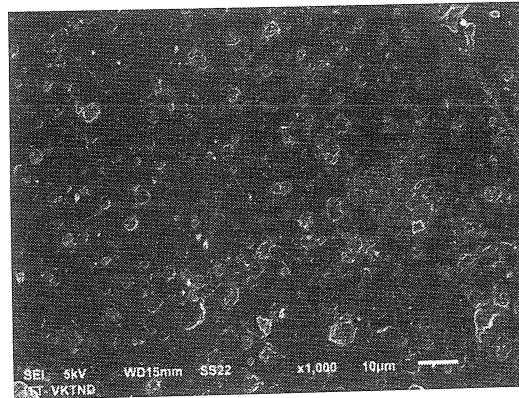
màng này có độ dày từ 0,1 đến 1mm có hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Cutibacterium acnes*, kháng viêm và không gây độc lên tế bào thường.

HÌNH 1

Ảnh SEM mẫu màng sinh học chitosan biến tính không chứa cao sim



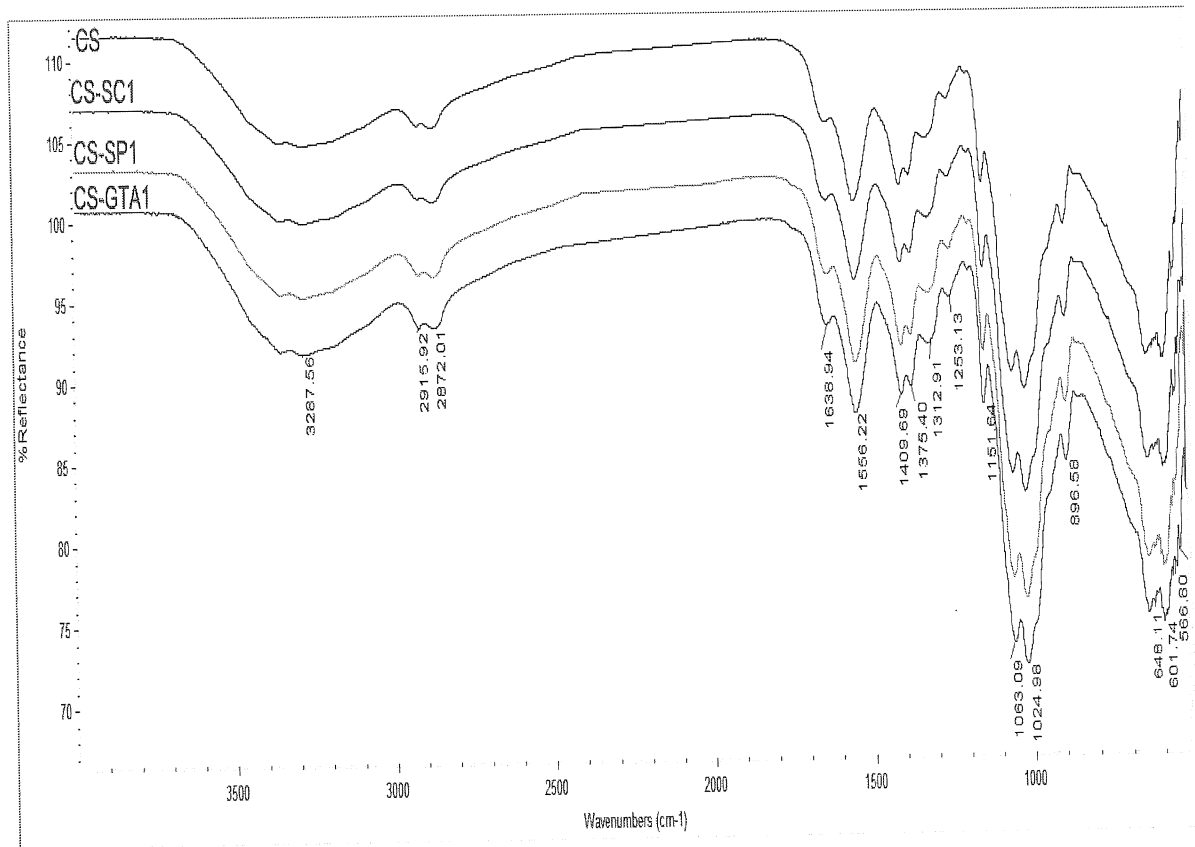
Ảnh SEM mẫu màng sinh học M1 sau khi in 3D



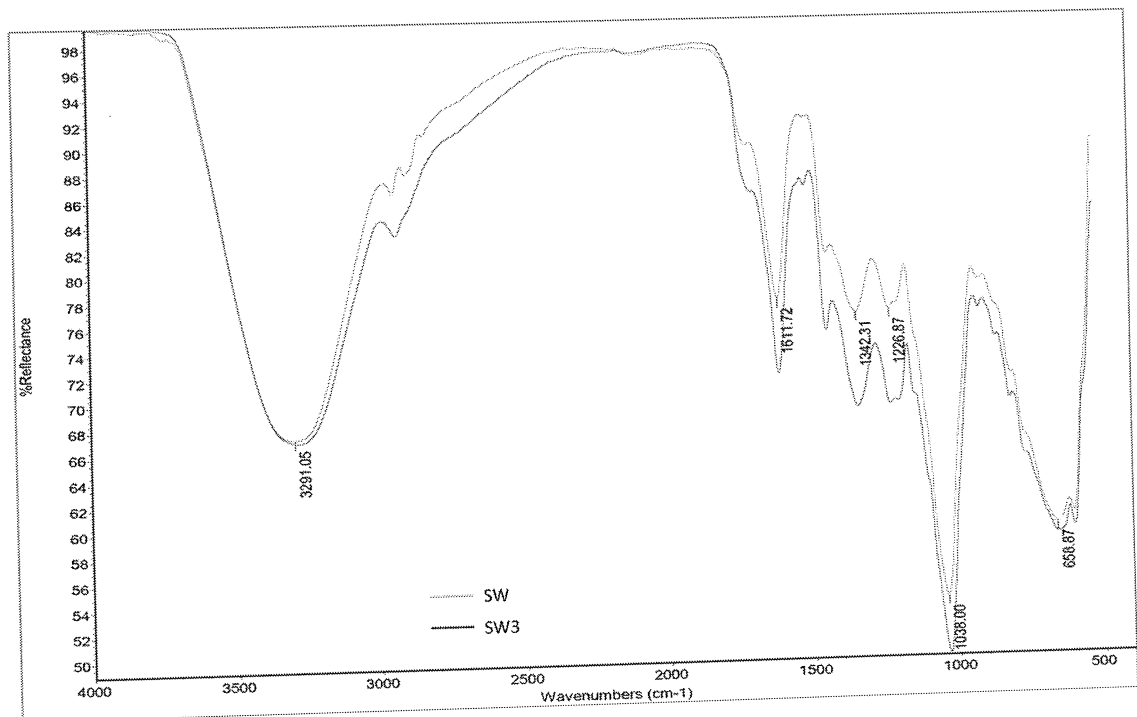
Ảnh SEM mẫu màng sinh học M3 sau khi in 3D

Ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường (SEM) của màng sinh học M1 M2 M3 thu được

HÌNH 2

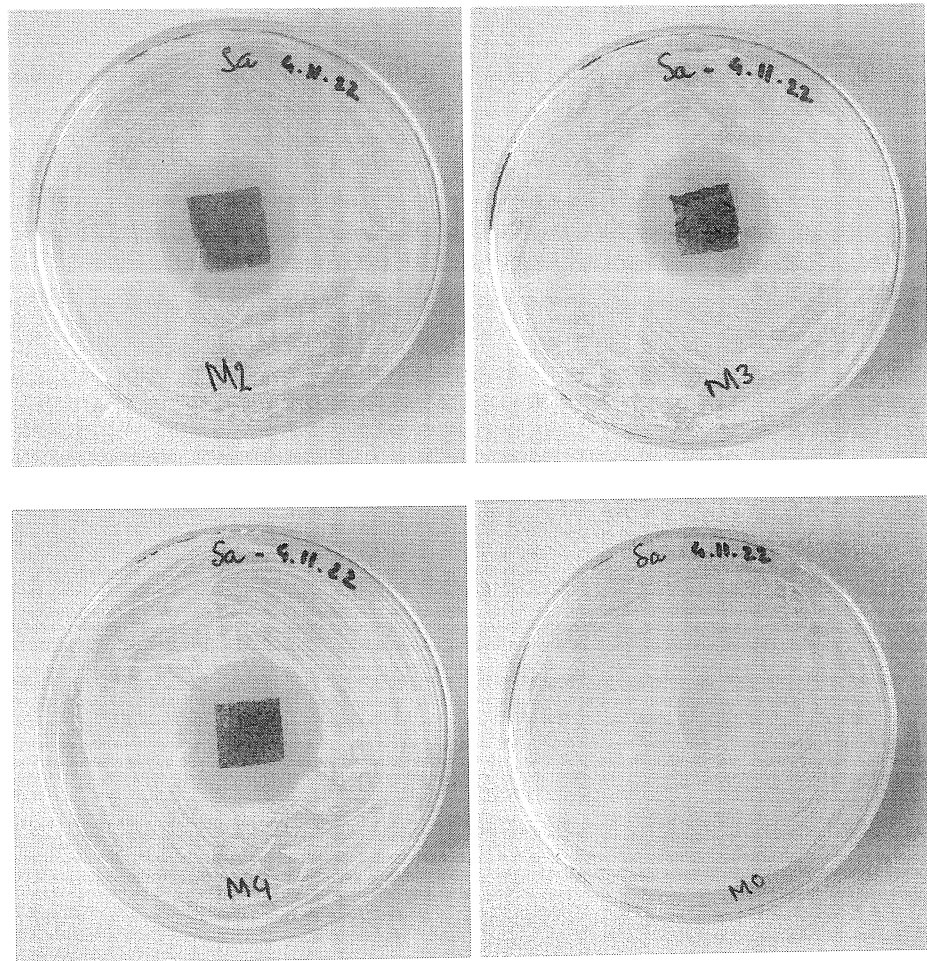


Phổ hồng ngoại của các màng sinh học chitosan biến tính thu được



Phổ hồng ngoại của màng sinh học M1, M2, M3 thu được

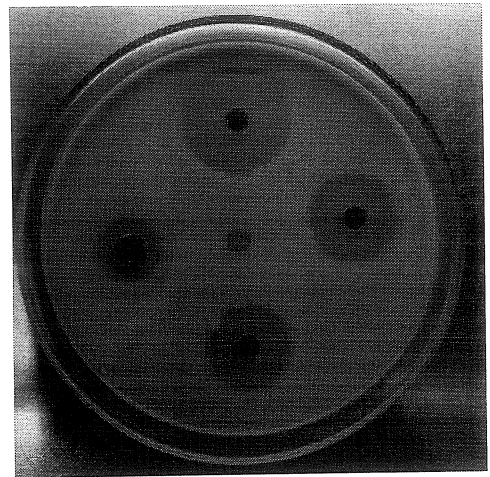
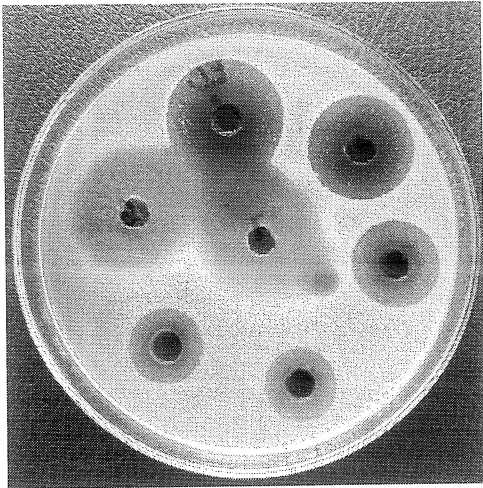
HÌNH 3



Hình ảnh thử nghiệm hoạt tính sinh học với chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Các mẫu M1, M2, M3 và mẫu ĐC2

HÌNH 4



Hình ảnh thử nghiệm hoạt tính sinh học với chủng vi khuẩn *Cutibacterium acnes*