

Điều chế hydrogel chứa chitosan và dầu dừa bằng phương pháp đông lạnh - rã đông

Lê Xuân Trường, Trần Văn Thành*, Hoàng Kim Nghị

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/3/2021; ngày chuyển phản biện 25/3/2021; ngày nhận phản biện 13/4/2021; ngày chấp nhận đăng 19/4/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm xây dựng công thức cho một hydrogel chứa chitosan (CS) và dầu dừa nguyên chất (VCO) sử dụng các chu kỳ đông lạnh - rã đông (F-T) lặp lại, mục đích cho ứng dụng băng bó vết thương. Nghiên cứu đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của độ thủy phân polyvinyl alcohol (PVA), nồng độ và độ dày lớp dung dịch, số chu kỳ F-T, tỷ lệ CS lên tính chất cảm quan, độ trương nở và phần gel của hydrogel. Khả năng kháng khuẩn của màng PVA/CS/VCO chống lại *Staphylococcus aureus* nhạy methicillin, *S. aureus* kháng methicillin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả cho thấy, PVA có độ thủy phân cao (trên 99%), dễ dàng tạo được hydrogel sau vài chu kỳ F-T. Màng hydrogel càng dày, nồng độ dung dịch PVA càng cao thì độ mềm dẻo, đàn hồi và trương nở càng thấp, đồng thời phần gel càng cao. Công thức dung dịch PVA 10%, tỷ lệ CS/PVA là 40%, 5% (khối lượng/khối lượng - kl/kl) VCO, sau 3 chu kỳ F-T được chọn vì tạo ra hydrogel có tính chất phù hợp và hoạt tính kháng khuẩn tốt.

Từ khóa: chitosan, dầu dừa, hydrogel, polyvinyl alcohol.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Một loạt các loại băng vết thương đã ra đời để phục vụ cho các mục đích khác nhau của quá trình làm lành vết thương. Các loại băng gạc truyền thống có chức năng chính là giữ cho vết thương khô ráo, ngăn chặn sự xâm nhập của vi khuẩn vào vết thương. Tuy nhiên, hiện nay người ta đã chứng minh rằng việc giữ một môi trường vết thương ẩm và ẩm giúp chữa lành vết thương nhanh chóng và hiệu quả hơn. Băng vết thương hiện đại giúp giữ và tạo môi trường ẩm xung quanh vết thương, chúng chủ yếu bao gồm hydrocolloid, alginate và hydrogel [1]. Trong đó, hydrogel được báo cáo là lựa chọn tốt nhất do chúng đáp ứng được yêu cầu cần thiết cho băng vết thương lý tưởng. Nhược điểm duy nhất của hydrogel ở trạng thái trương nở là nó có độ ổn định cơ học thấp. Hạn chế này đã được giải quyết bằng cách sử dụng hệ màng hydrogel hỗn hợp, bao gồm nhiều hơn một polymer trong thành phần băng [2]. Hydrogel giống với mô tự nhiên hơn bất kỳ loại vật liệu sinh học tổng hợp nào khác, do hàm lượng nước cao, độ mềm tương tự như mô tự nhiên, có tính tương thích sinh học [3], mang lại cảm giác mát và giảm đau cho vết thương.

Các polymer thân nước tự nhiên và tổng hợp có thể liên kết chéo về mặt vật lý hoặc hóa học để tạo ra hydrogel cho ứng dụng băng vết thương [4]. Các phương pháp liên kết chéo vật lý, chẳng hạn liên kết hydro, liên kết Van Der Waals hoặc chu kỳ F-T liên tiếp là phương pháp liên kết chéo an toàn nhất để tạo ra hydrogel cho băng vết thương, do những phương pháp này tránh được việc sử dụng dung môi hữu cơ và thuốc thử hóa học có nguy cơ độc hại, khó loại bỏ khỏi sản phẩm... [2].

PVA có thể tạo hydrogel bền vững bằng các chu kỳ F-T lặp đi lặp lại, do sự hình thành tinh thể có vai trò như những liên kết chéo

vật lý [5]. CS là một chất đồng trùng hợp của các đơn vị glucosamin và N-acetyl glucosamin được liên kết bởi 1,4-glucosidic, nó được tạo ra bằng cách deacetyl hóa một phần chitin [6]. CS được coi là chất tạo băng vết thương phổ biến, có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống lại các tác nhân từ môi trường, tính chất kết dính và khả năng thấm oxy rất tốt [2]. Hydrogel hỗn hợp PVA/CS đã tăng cường đáng kể các hoạt động sinh học so với hydrogel chỉ bao gồm PVA [6]. Dầu dừa đã được chứng minh là có rất nhiều giá trị trong y học, VCO có nhiều đặc tính hỗ trợ cho việc làm lành vết thương ngoài da như hoạt tính kháng khuẩn, tác dụng kháng virus, kháng nấm, hiệu quả trong chăm sóc và dưỡng ẩm da [7], chúng có thể được điều chế ở dạng nhũ tương và liposom mà vẫn giữ được các đặc tính kháng khuẩn.

Tại Việt Nam, vật liệu hydrogel đã và đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học, đặc biệt trong nông nghiệp, tuy nhiên nghiên cứu ứng dụng của hydrogel trong y sinh tại Việt Nam hiện vẫn còn rất non trẻ [8]. Có nhiều nghiên cứu trên thế giới và một số nghiên cứu ở Việt Nam đã điều chế hydrogel chứa PVA, CS và kết hợp thêm các thành phần khác nhau như minocyclin [9], oxytetracyclin [10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về hydrogel chứa các loại dầu tự nhiên còn hạn chế, trong đó hydrogel PVA/CS/VCO chưa được nghiên cứu. Vì thế nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn tạo được màng hydrogel có tính chất phù hợp, khả năng kháng khuẩn tốt, an toàn và mang đến sự thoải mái cho người bệnh, giúp đẩy nhanh tốc độ làm lành vết thương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

PVA 1750±50 (độ thủy phân ≥99%) được cung cấp bởi Công ty Shanghai Zhanyun Chemical (Trung Quốc). PVA 217 (độ thủy phân

*Tác giả liên hệ: Email: thanhpharm@gmail.com

Preparation of hydrogel containing chitosan and virgin coconut oil using the freeze-thawing method

Xuan Truong Le, Van Thanh Tran*, Kim Nghi Hoang

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 22 March 2021; revised 13 April 2021; accepted 19 April 2021

Abstract:

This study aimed to formulate a hydrogel membrane containing chitosan (CS) and virgin coconut oil (VCO) using repeated cycles of freezing and thawing (F-T) for wound dressing applications. This study evaluated the effects of degree of hydrolysis of polyvinyl alcohol (PVA), solution concentration and thickness, number of F-T cycles, CS proportion on the sensory properties, swelling ratio, and gel fraction of hydrogels. The antibacterial ability of PVA/CS/VCO membrane against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* was evaluated by disk diffusion method. The results showed that PVA with a high degree of hydrolysis (over 99%) easily generated hydrogel after several F-T cycles. The thicker the hydrogel membrane or the higher the concentration of PVA solution was, the lower the flexibility, elasticity, swelling ratio was, and the higher the gel fraction was. The formula including 10% PVA solution, the ratio of CS to PVA is 40%, 5% w/w VCO, through 3 F-T cycles created hydrogel with suitable properties and good antibacterial activity.

Keywords: chitosan, hydrogel, polyvinyl alcohol, virgin coconut oil.

Classification number: 3.4

87-89%) có nguồn gốc từ Singapore. CS (độ nhớt thấp hơn 20 cps, 96,6% deacetyl hóa) được cung cấp bởi Công ty Chitoworld (Việt Nam). VCO lấy từ Công ty Chế biến dừa Lương Quới (Việt Nam).

2.2. Phương pháp điều chế hydrogel

Bột PVA được cho từ từ vào nước cất ở 90-100°C để tạo thành các dung dịch PVA có nồng độ 7-15% (kl/kl), tiếp tục khuấy 1 giờ ở 90-100°C để PVA tan hoàn toàn. Nếu có bọt khí, giữ yên qua đêm để loại bỏ. Sau đó lượng dung dịch nhất định được đổ ra đĩa petri đường kính 80 mm với độ dày khác nhau (1, 2 và 3 mm). Các đĩa petri này được đông lạnh ở -20°C trong 18 giờ và rã đông ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ (tổng thời gian 24 giờ cho 2 giai đoạn này được gọi là 1 chu kỳ), quá trình này được lặp lại 1 đến 7 lần (chu kỳ) [9].

Hydrogel PVA/CS được điều chế tương tự, dung dịch CS 4% (kl/kl) được chuẩn bị trong dung dịch acid acetic 2% (kl/kl), sau đó các dung dịch có tỷ lệ khối lượng giữa CS và PVA khác nhau (khối lượng CS bằng 0, 5, 10, 20, 30, 40 và 50% so với khối lượng PVA) được trộn bằng cách khuấy từ trong 1 giờ.

Với hydrogel PVA/CS/VCO, phối hợp dầu dừa với tỷ lệ 5% (kl/kl) vào dung dịch PVA/CS, khuấy trong 15 phút để tạo nhũ tương, sau đó tiếp tục như trên.

2.3. Phương pháp xác định phân gel (Gel fraction - GF%)

Các miếng hydrogel thu được sau chu kỳ F-T cuối cùng được cắt thành miếng 2×2 cm, làm khô trong tủ sấy ở 60°C trong 24 giờ và cân (Wo), sau đó chúng được ngâm trong 50 ml nước cất trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng cho đến khi cân bằng khối lượng (Ws) để loại bỏ các phần có thể rò rỉ hoặc hòa tan. Các miếng hydrogel sau đó được làm khô ở 60°C trong tủ sấy trong 24 giờ và cân lại (We). Phân gel (GF%) được tính như sau [11, 12]:

$$GF\% = \frac{We}{Wo} \times 100\%$$

2.4. Phương pháp xác định độ trương nở (Swelling ratio - SR%)

Để đo độ trương nở của hydrogel, các mẫu được cắt thành các miếng 2×2 cm và sấy khô ở 60°C trong tủ sấy trong 24 giờ cho đến khối lượng không đổi (Wa). Các mẫu khô được ngâm trong 50 ml nước cất, duy trì ở 37°C, sau đó đem cân khối lượng (Ws) ở các khoảng thời gian cụ thể (5 phút đến 72 giờ). Sự hấp thụ nước hay tỷ lệ trương nở được tính như sau [10, 12]:

$$SR\% = \frac{Ws}{Wa} \times 100\%$$

Mỗi thử nghiệm được thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình.

2.5. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế vi sinh vật

Hydrogel được kiểm tra khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, môi trường thử nghiệm là thạch Mueller-Hinton, với 4 loại vi sinh vật *S. aureus* nhạy methicillin (MSSA), *S. aureus* kháng methicillin (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* và *Candida albicans*. Cắt hydrogel thành miếng có cạnh 10 mm và để lên bề mặt thạch, sau đó ủ hộp thạch trong tủ ẩm ở 35-37°C trong 24 giờ với vi khuẩn và 48 giờ với vi nấm.

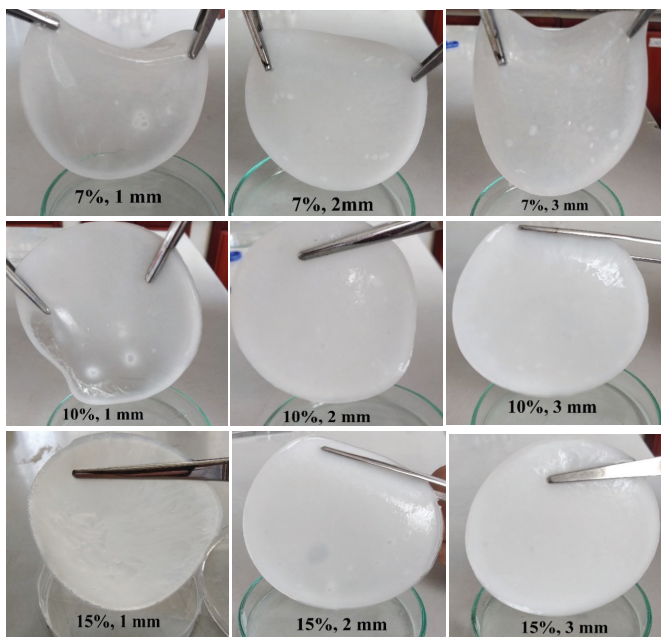
Đọc kết quả: Lấy đĩa petri ra và để lên nền đen không phản quang, xác định đường kính vòng kháng khuẩn (được định nghĩa là đường đi xuyên qua tâm của miếng hydrogel đến mép của khóm vi khuẩn hoặc khóm nấm). Hydrogel được xem là có tính kháng khuẩn khi quan sát rõ đường kính này, và đường kính này càng lớn thì hydrogel có hoạt tính kháng khuẩn càng mạnh.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của độ thủy phân của PVA đến sự hình thành hydrogel

PVA với các độ thủy phân khác nhau được khảo sát trong nghiên cứu này. PVA 217 (độ thủy phân 87-89%) không thể tạo hydrogel ngay cả với nồng độ dung dịch PVA cao (15%) và 7 chu kỳ F-T, sau khi rã đông chúng vẫn ở trạng thái lỏng. Trong khi đó

PVA 1750±50 (độ thủy phân ≥99%) đã có thể tạo hydrogel ngay cả với nồng độ thấp (7%) sau 1 chu kỳ F-T, mặc dù nó không thực sự ổn định. Với dung dịch PVA 1750±50 có nồng độ 7%, hydrogel tương đối ổn định được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T (hình 1). Điều này chứng tỏ rằng mức độ thủy phân của PVA ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo hydrogel bằng chu kỳ F-T, trong đó mức độ thủy phân càng lớn thì khả năng tạo hydrogel càng tốt. Điều này cũng được khẳng định bởi các nhà khoa học, theo đó sự hiện diện của các nhóm acetat cồng kềnh có thể ức chế sự hình thành hydrogel [5]. Đồng thời, F. Yokoyama và cs (1986) [13] cũng có kết luận, sự tạo thành hydrogel rất nhạy cảm với mức độ thủy phân, do tính lỏng lẻo và khả năng chống thấm nước thấp của các nhóm acetyl ngăn cản sự hình thành và phát triển các tinh thể PVA trong môi trường nước. Với PVA có độ thủy phân 98,7%, cần tới hơn 20 chu kỳ F-T mới hình thành được cấu trúc xốp của hydrogel [13].



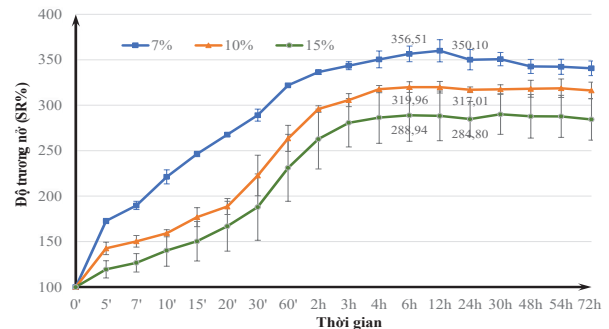
Hình 1. Hydrogel từ PVA 1750±50 với nồng độ và độ dày dung dịch khác nhau.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ và độ dày lớp dung dịch PVA đến tính chất hydrogel

Các hydrogel từ PVA 1750±50 với các nồng độ 7, 10 và 15%, độ dày lớp dung dịch trong đĩa petri là 1, 2 và 3 mm được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T (hình 1).

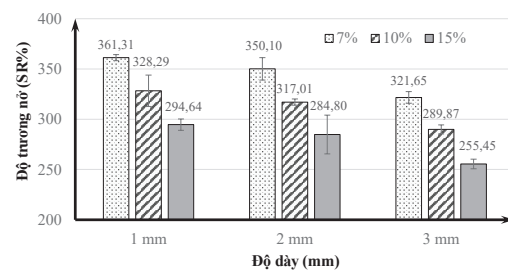
Ở độ dày 1 mm, các hydrogel thu được rất mỏng, mềm, quá linh động, khó cầm nắm cố định. Với độ dày 2 mm thì hydrogel dày hơn, nhờ đó ổn định, ít linh động hơn và dễ cầm được trên tay, nhưng khi độ dày lên đến 3 mm thì chúng lại quá dày, cứng. Tính mềm dẻo, linh hoạt cũng giảm dần theo thứ tự nồng độ 7, 10 và 15%, tức là nồng độ dung dịch tăng thì hydrogel thu được càng cứng và kém linh động hơn, đồng thời độ đàn hồi giảm dần, độ bền tăng dần. Nguyên nhân là mức độ kết tinh tăng lên khi nồng độ PVA tăng lên, do tăng sự chồng chéo và thúc đẩy sự gấp khúc của các chuỗi PVA [14].

Động học trương nở của 3 hydrogel từ dung dịch PVA 7, 10 và 15% với độ dày 2 mm được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T được thể hiện trong hình 2. Đồ thị cho thấy các mẫu trương nở tương tự nhau, chúng đều nhanh chóng hấp thu nước và sau 6 giờ đã đạt đến độ trương nở cân bằng khá tốt (từ 280 đến 350%). Nồng độ dung dịch PVA càng cao, hydrogel có độ trương nở càng thấp.

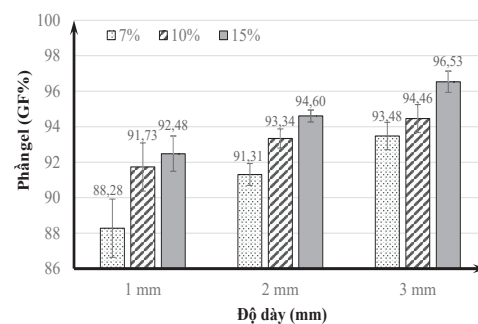


Hình 2. Động học trương nở của hydrogel từ dung dịch PVA ở nồng độ 7, 10 và 15%.

Hình 3 và 4 cho thấy, độ trương nở cân bằng (là độ trương nở tối đa và gần như không thay đổi khi tiếp tục ngâm, quy ước lấy ở thời điểm 24 giờ) và phần gel của các hydrogel từ các dung dịch có nồng độ và độ dày khác nhau. Nhìn chung, độ trương nở tỷ lệ nghịch, còn phần gel tỷ lệ thuận với nồng độ và độ dày lớp dung dịch PVA. Sau 3 chu kỳ, các mẫu đều tạo được hydrogel có phần gel lớn (trên 88%) cho thấy sự liên kết chéo hiệu quả ngay khi nồng độ thấp hay lớp dung dịch mỏng.



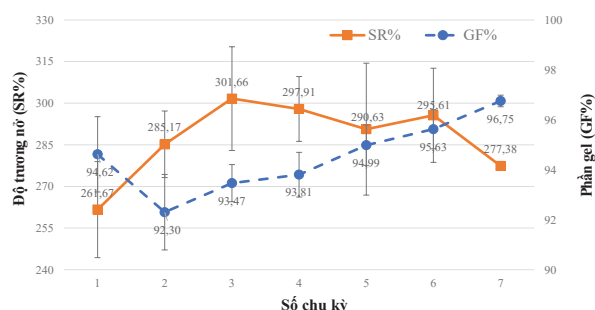
Hình 3. Độ trương nở cân bằng của hydrogel từ dung dịch PVA ở nồng độ 7, 10 và 15% với độ dày 1, 2 và 3 mm sau 3 chu kỳ F-T.



Hình 4. Phần gel của hydrogel từ dung dịch PVA ở nồng độ 7, 10 và 15% với độ dày 1, 2 và 3 mm sau 3 chu kỳ F-T.

3.3. Số chu kỳ F-T và tính chất của hydrogel

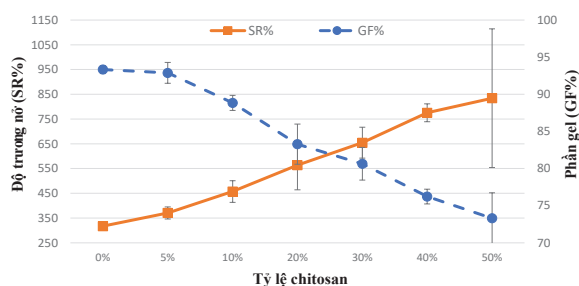
Từ các kết quả trên nhận thấy, hydrogel thu được từ dung dịch PVA có nồng độ 10% với chiều dày 2 mm có các tính chất cảm quan, phần gel, độ trương nở phù hợp, do đó chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của số chu kỳ F-T lên tính chất hydrogel dựa trên mẫu này. Các hydrogel được tạo ra sau 1-7 chu kỳ F-T có độ trương nở và phần gel như ở hình 5. PVA có thể tạo được hydrogel chỉ với 1 chu kỳ F-T, nhưng hydrogel thu được quá dẻo, dính, tính chất cơ học không phù hợp để đắp lên vết thương. Khi số chu kỳ tăng, phần gel tăng lên do tăng số lượng các tinh thể đóng vai trò như các điểm liên kết chéo, làm cho mạng lưới bền vững, chặt chẽ hơn [14]. Từ chu kỳ thứ 3 trở đi, nhìn chung tăng số chu kỳ thì độ trương nở giảm, các hydrogel liên kết chéo ít chặt chẽ có xu hướng cho thấy khả năng hấp thụ nước cao hơn. Tuy nhiên, khác biệt về độ trương nở của 3, 4, 5 và 6 chu kỳ là không đáng kể. Vì vậy, chọn số chu kỳ là 3 để vừa có lợi về thời gian, vừa đảm bảo tính chất phù hợp của hydrogel.



Hình 5. Ảnh hưởng của số chu kỳ F-T đến độ trương nở cân bằng và phần gel.

3.4. Hydrogel PVA/CS

Khi phối hợp thêm CS, hydrogel vẫn được tạo ra sau 3 chu kỳ F-T. Khi tỷ lệ CS càng cao, hydrogel thu được càng mềm dẻo, linh hoạt, nhưng khi tỷ lệ lên đến 50% chúng trở nên quá dẻo và khó cầm nắm cố định. Độ trương nở và phần gel của PVA/CS được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ CS đến độ trương nở cân bằng và phần gel của hydrogel PVA/CS.

Dễ dàng nhận thấy, khi có mặt CS, hydrogel thu được có độ trương nở tăng, phần gel giảm so với hydrogel chỉ chứa PVA và tỷ lệ CS càng cao thì độ trương nở càng lớn, phần gel càng thấp. Điều này là do sự có mặt của CS làm giảm liên kết chéo của các chuỗi polymer, mặc dù CS có thể liên kết chéo với PVA

nhưng độ bền liên kết chéo của CS yếu hơn PVA [9]. Khi chỉ có PVA (0% CS), hydrogel cấu trúc liên kết chéo cao đã được thu và cấu trúc này có khả năng trương nở thấp, khoảng 320%. Sau khi tăng hàm lượng CS lên 50%, độ trương nở tăng lên đến 850%, do hàm lượng CS cao làm tăng tính thấm ướt và tính ưa nước của hydrogel.

Từ các kết quả trên nhận thấy, hydrogel thu được từ dung dịch có tỷ lệ CS/PVA là 40% có các tính chất cảm quan (độ linh hoạt, mềm dẻo vừa phải, không quá mềm), phần gel cao (trên 75%), độ trương nở tốt (tối đa 780%). Ngoài ra, tỷ lệ CS khá cao sẽ đảm bảo cho hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của màng. Tuy nhiên màng hydrogel PVA/CS có tính dính cao, khả năng giữ ẩm kém, nhanh chóng bị khô khi tiếp xúc với không khí. Vì vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ CS/PVA là 40% cho nghiên cứu tiếp theo.

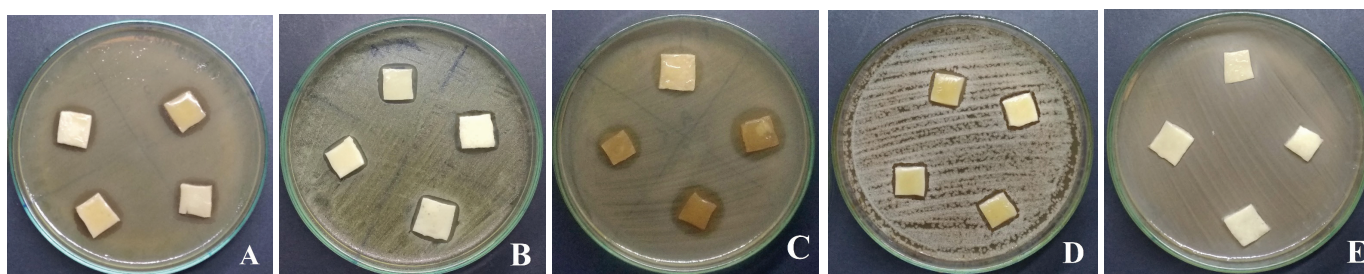
3.5. Hydrogel PVA/CS/VCO

Khi có mặt dầu dừa với tỷ lệ 5% (kl/kl), hydrogel vẫn được tạo ra. Màng hydrogel thu được (hình 7) cho thấy tính đồng nhất, không có vết nứt, không có dấu hiệu của sự tách pha trên bề mặt hydrogel và mềm dẻo, không dính. Hydrogel màu trắng đục, có mùi dầu dừa nhẹ và không có bọt khí trên bề mặt. Cấu trúc đồng nhất này cho thấy sự tương thích tốt giữa các thành phần.



Hình 7. Hydrogel PVA/CS/VCO sau 3 chu kỳ F-T.

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn được thể hiện ở hình 8. *MRSA*, *MSSA*, *P. aeruginosa* và *C. albicans* là những vi sinh vật thường thấy trong vết thương bị nhiễm trùng [15, 16]. Hydrogel chỉ chứa PVA (hình 8E, nhóm chứng) không có hoạt tính kháng khuẩn do không quan sát được bất kỳ vòng ức chế nào xung quanh miếng hydrogel, trong khi đó hydrogel PVA/CS/VCO cho thấy các vòng kháng khuẩn có đường kính khá lớn, do đó nó ức chế tốt cả 4 loài vi sinh vật nêu trên. Điều đó là nhờ hoạt tính ức chế vi sinh vật của dầu dừa và của CS trong môi trường acid loãng. CS có nhiều ưu điểm như phổ kháng khuẩn rộng hơn, hoạt tính kháng khuẩn cao hơn và độc tính đối với tế bào động vật thấp hơn so với các chất kháng khuẩn khác. Tính chất này liên quan đến điện tích dương của CS do các nhóm amin proton hóa trong môi trường acid yếu [17]. Một cơ chế được đề xuất để giải thích cho hoạt tính kháng khuẩn là tương tác giữa các điện tích dương của CS trong môi trường acid và điện tích âm của màng tế bào vi sinh vật làm cho protein và các thành phần của tế bào bị rò rỉ [18].



Hình 8. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của hydrogel PVA/CS/VCO trên MRSA (A), MSSA (B), *P. aeruginosa* (C), *C. albicans* (D) và của hydrogel chỉ chứa PVA trên MRSA (E - nhóm chứng).

4. Kết luận

Bằng chu kỳ F-T, các hydrogel PVA, PVA/CS và PVA/CS/VCO đã được tạo ra thành công. Độ thủy phân của PVA, nồng độ và độ dày lớp dung dịch, số chu kỳ F-T đều có ảnh hưởng lớn đến tính chất, độ trương nở và phân gel của hydrogel tạo ra. Từ PVA có độ thủy phân trên 99%, nồng độ dung dịch 10%, tỷ lệ CS/PVA là 40%, 5% VCO, sau 3 chu kỳ F-T, mỗi chu kỳ đông lạnh 18 giờ ở -20°C và rã đông 6 giờ ở nhiệt độ phòng, đã hình thành hydrogel có tính chất cơ học phù hợp, hoạt tính kháng khuẩn tốt chống lại MRSA, MSSA, *P. aeruginosa* và *C. albicans*. Màng hydrogel này sẽ là một ứng viên cho một băng vết thương tiềm năng để thúc đẩy quá trình lành vết thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, et al. (2008), "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, pp.2892-2923, DOI: 10.1002/jps.21210.

[2] E.A. Kamoun, E.R.S. Kenawy, X. Chen (2017), "A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings", *Journal of Advanced Research*, **8**(3), pp.217-233, DOI: 10.1016/j.jare.2017.01.005.

[3] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, et al. (2000), "Hydrogels in pharmaceutical formulations", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, pp.27-46, DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.

[4] E. Caló, V.V. Khutoryanskiy (2015), "Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products", *European Polymer Journal*, **65**, pp.252-267, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.

[5] C.M. Hassan, N.A. Peppas (2000a), "Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods", *Biopolymers PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*, Springer, pp.37-65, DOI: 10.1007/3-540-46414-X_2.

[6] E.A. Kamoun, X. Chen, M.S.M. Eldin, et al. (2015a), "Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers", *Arabian Journal of Chemistry*, **8**, pp.1-14, DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.07.005.

[7] M. DebMandal, S. Mandal (2011), "Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **4**, pp.241-247, DOI: 10.1016/S1995-7645(11)60078-3.

[8] V.V. Phuoc, P.T.D. Trinh, N.C. Thien (2019), "Hydrogel materials - properties and potential biomedical applications", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **61**(11B), pp.62-68 (in Vietnamese).

[9] J.H. Sung, M.R. Hwang, J.O. Kim, et al. (2010), "Gel characterisation and *in vivo* evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan", *International Journal of Pharmaceutics*, **392**, pp.232-240, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.024.

[10] F. Lotfipour, M.A. Milani, S. Salatin, et al. (2019), "Freeze-thaw-induced cross-linked PVA/chitosan for oxytetracycline-loaded wound dressing: The experimental design and optimization", *Research in Pharmaceutical Sciences*, **14**, pp.175-189, DOI: 10.4103/1735-5362.253365.

[11] J.O. Kim, J.K. Park, J.H. Kim, et al. (2008), "Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone", *International Journal of Pharmaceutics*, **359**, pp.79-86, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.03.021.

[12] E.A. Kamoun, E.R.S. Kenawy, T.M. Tamer, et al. (2015b), "Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: characterization and bio-evaluation", *Arabian Journal of Chemistry*, **8**, pp.38-47, DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.12.003.

[13] F. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, et al. (1986), "Morphology and structure of highly elastic poly (vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting", *Colloid and Polymer Science*, **264**, pp.595-601, DOI: 10.1007/BF01412597.

[14] C.M. Hassan, N.A. Peppas (2000b), "Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels", *Macromolecules*, **33**, pp.2472-2479, DOI: 10.1021/ma9907587.

[15] S. Noori, M. Kokabi, Z.M. Hassan (2018), "Poly (vinyl alcohol)/chitosan/honey/clay responsive nanocomposite hydrogel wound dressing", *Journal of Applied Polymer Science*, **135**, DOI: 10.1002/app.46311.

[16] A. Basu, K. Heitz, M. Strømme, et al. (2001), "Wound microbiology and associated approaches to wound management", *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, pp.244-269, DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.10.085.

[17] A.M.A. Mohsen, A.S. Aly, R. Hrdina, et al. (2011), "Eco-synthesis of PVA/chitosan hydrogels for biomedical application", *Journal of Polymers and The Environment*, **19**, pp.1005-1012, DOI: 10.1007/s10924-011-0334-0.

[18] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C.V. Stevens, et al. (2003), "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action", *Biomacromolecules*, **4**, pp.1457-1465, DOI: 10.1021/bm034130m.