



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OIPOS DRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

Școala Doctorală a Facultății de Inginerie
Chimică și Protecția Mediului

în cotutelă cu

UNIVERSITATEA DIN ROUEN



REȚELE INTERPENETRATE PE BAZĂ DE COLAGEN FUNCȚIONALIZAT ȘI POLIMERI SINTETICI CU APLICAȚII BIOMEDICALE

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducători de doctorat:

Prof.univ.dr.ing. *dr.h.c.* Marcel Popa

Prof.univ.dr.ing Didier Le Cerf

Doctorand:
Bioinginer Simona Potorac

IAȘI- 2011



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”.

Proiectul „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”, POSDRU/6/1.5/S/9, ID 6681, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Îmbunătățirea formării viitorilor cercetători în cadrul ciclului 3 al învățământului superior - studiile universitare de doctorat - cu impact asupra creșterii atractivității și motivației pentru cariera în cercetare”.

Proiect finanțat în perioada 2008 - 2011.

Finanțare proiect: 14.424.856,15 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea “Vasile Alecsandri” din Bacău

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Carmen TEODOSIU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Gabriel LAZĂR

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că în ziua de 17 noiembrie 2011 la ora 12⁰⁰, în sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat în cotutelă, intitulată:

**"REȚELE INTERPENETRATE PE BAZĂ DE COLAGEN
FUNCȚIONALIZAT ȘI POLIMERI SINTETICI CU APLICAȚII
BIOMEDICALE "**

elaborată de doamna Bioing. **Simona POTORAC** în vederea conferirii titlului științific de doctor în Ingineria Materialelor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

Prof.univ.dr.ing. Dan CAȘCAVAL Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	președinte
Prof.univ.dr.ing. Marcel POPA Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	conducător științific
Prof.univ.dr.ing. Didier LE CERF Universitatea din Rouen (Franța)	conducător științific
Prof.univ.dr.ing. Jacques DESBRIERES Universitatea din Pau et Pays de l'Adour (Franța)	membru
Prof.univ.dr.ing. Thierry HAMAIDE Universitatea Claude Bernard Lyon 1 (Franța)	membru
Conf.dr.ing. Liliana VEREȘTIUC Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T. Popa" Iași	membru

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,

Prof. univ. dr. ing. **ION GIURMA**

Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagăț

Mulțumiri:

Recunoștință și sincere mulțumiri conducătorului științific Prof. dr .ing. Marcel Popa pentru sprijinul moral și îndrumările științifice, pentru încrederea acordată, bunăvoință și înțelegere!

Alese mulțumiri și recunoștință conducătorului științific Prof. dr. Didier Le Cerf pentru prețioasele sugestii și îndrumarea acordată în cursul elaborării tezei, pentru înțelegere și răbdare, precum și pentru căldura cu care am fost primită în Laboratorul Polimeri, Biopolimeri, Suprafețe în cadrul stagiului efectuat la Universitatea din Rouen!

Deosebite mulțumiri și recunoștință dnei Conf. dr. ing. Liliana Vereștiuc pentru timpul acordat, pentru prețioasele sugestii privind realizarea unor experimente în cadrul tezei, precum și pentru contribuția domniei sale la formarea mea ca cercetător!

Mulțumiri speciale dlui Prof. dr. Luc Picton și dnei Ing. Virginie Dulong pentru sfaturile, ideile și încurajările pe care mi le-au dat pe perioada stagiului, pentru realizarea experimentelor de reologie, μ DSC și ^1H -RMN. Mulțumesc dnei Dr. Gabriela Lisă pentru sprijinul acordat în realizarea testelor de termogravimetrie!

Calde mulțumiri familiei, prietenilor, colegilor și tuturor celor care au fost alături de mine și m-au încurajat în finalizarea acestei lucrări!

Cu deosebită considerație,

Simona Potorac

CUPRINS

Introducere

STUDIU BIBLIOGRAFIC

CAPITOLUL I . MATERIALE COLAGENICE CU APLICAȚII BIOMEDICALE	1
I.1. Materiale colagenice	1
I.1.1. Biosinteza collagenului	2
I.1.2. Structura și conformațiile collagenului	4
I.1.2.1. Structura primară	4
I.1.2.2. Structura secundară	5
I.1.2.3. Structura terțiară	6
I.1.2.4. Structura cuaternară	7
I.1.3. Clasificarea materialelor colagenice	8
I.1.4. Metode de extracție a materialelor colagenice	9
I.1.5. Proprietățile materialelor colagenice	11
I.1.5.1. Proprietățile biologice ale collagenelor	11
I.1.5.1.1. Proprietățile hemostatice	11
I.1.5.1.2. Funcția de ghidare celulară și proprietățile chemotactice	12
I.1.5.1.3. Proprietățile imunologice	12
I.1.5.2. Comportamentul de macroion amfoter în soluție apoasă	12
I.1.5.3. Proprietățile mecanice ale collagenului	14
I.1.5.4. Proprietățile termice ale collagenului	14
I.1.5.5. Biodegradarea collagenelor	15
I.1.6. Gelatina	16
I.1.6.1. Proprietățile gelatinei	18
I.1.7. Procedee de obținere a bioproduselor colagenice	19
I.1.8. Reacții de modificare chimică a collagenelor	22
I.1.8.1. Transformări polimer-analoage la grupările COOH, NH ₂ și OH	22
I.1.8.2. Reacții de grefare a collagenelor	24
I.1.8.3. Reticularea collagenelor	25
I.1.8.3.1. Reticularea chimică a collagenelor	26
I.1.8.3.2. Reticularea fizică a collagenelor	28
I.2. Aplicații ale bioproduselor colagenice	29
I.2.1. Aplicații biomedicale ale collagenelor	29
I.2.1.1. Aplicații în ingineria tisulară	30
I.2.1.1.1. Aplicații în refacerea țesuturilor moi	30
I.2.1.1.2. Aplicații în refacerea țesuturilor dure	36
I.2.1.2. Aplicații în oftalmologie	37
I.2.1.3. Aplicații în chirurgie	37

I.2.1.4 Aplicații în industria farmaceutică	38
I.2.2. Aplicații în industria cosmetică	39
I.2.3. Aplicații în industria alimentară	39
CAPITOLUL II. REȚELE INTERPENETRATE CU APLICAȚII BIOMEDICALE	41
II.1. Definiția și clasificarea rețelelor IPN	41
II.2. Hidrogelurile	44
II.2.1. Compoziția hidrogelurilor	45
II.2.2. Metode de obținere a hidrogelurilor cu caracter de IPN	45
II.2.2.1. Obținerea hidrogelurilor prin reticulare chimică	46
II.2.2.2. Obținerea hidrogelurilor prin reticulare fizică	47
II.2.3. Proprietățile hidrogelurilor	48
II.2.3.1. Capacitatea de absorbție/incorporare a fluidelor	48
II.2.3.1. Proprietăți biologice	49
II.2.4. Aplicații ale hidrogelurilor cu caracter de rețea interpenetrată	50
II.2.4.1. Aplicații ale hidrogelurilor în medicină	51
II.3. Concluzii	51
REZULTATE ORIGINALE	
CAPITOLUL III. MATERIALE ȘI METODE EXPERIMENTALE	61
III.1. Concept experimental	61
III.2. Materiale utilizate	62
III.3. Obținerea collagenelor modificate	66
III.4. Obținerea rețelelor interpenetrante	66
III.4.1. Program experimental	67
III.5. Metode de caracterizare	70
III.5.1. Caracterizarea structurală	70
III.5.1.1. Rezonanța magnetică nucleară (¹ H-RMN)	70
III.5.1.2. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	71
III.5.1.3. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier prin reflectanță totală atenuată (FTIR-ATR)	72
III.5.1.4. Analiza elementală. Determinarea azotului total – metoda Kjeldahl	72
III.5.1.5. Analiz a elementală. Dozarea carbonului și azotului total - Cuplaj COT/NOT	74
III.5.1.6. Randamentul reacțiilor de reticulare	74
III.5.2. Determinarea gradului de substituție prin reacția proteinelor cu acidul trinitrobenzen-sulfonic (TNBS)	75
III.5.3. Determinarea gradului de retenție a apei	76
III.5.4. Evaluarea biodegradabilitatii	77
III.5.5. Studiul reologic al soluțiilor de collagen modificat și al hidrogelurilor obținute	78
III.5.5.1. Studiul reologic al soluțiilor diluate de collagen modificat	78
III.5.5.1.1. Principii teoretice	78
III.5.5.1.2. Determinarea vâscozității cu vâscozimetrul Ubbelohde	81

III.5.5.2. Studiul reologic al soluțiilor concentrate de collagen modificat	82
III.5.5.2.1. Principii teoretice	82
III.5.5.2.2. Dispozitivul măsurătorii vâscozimetrice	84
III.5.5.3. Studiul reologic al rețelelor IPN	85
III.5.6. Metode de analiză termică	85
III.5.6.1. Analiza termogravimetrică (ATG)	85
III.5.6.2. Calorimetria diferențială de baleiaj (μ DSC)	86
III.5.7. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	88
III.5.8. Teste de determinare a adezivității	89
III.5.9. Teste <i>in vitro</i> de încărcare/eliberare principii active	90
III.5.10. Teste de biocompatibilitate	91
CAPITOLUL IV. MATERIALE COLAGENICE MODIFICATE CU ANHIDRIDE CICLICE	93
IV.1. Chimismul reacției de modificare a collagenelor cu anhidride ciclice	93
IV.2. Analiza rezultatelor experimentale	96
IV.2.1. Analiza structurală a materialelor collagenice modificate cu anhidride ciclice	96
IV.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie ^1H -RMN	96
IV.2.1.2. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR	100
IV.2.1.3. Analiza elementală - Cuplaj COT/NOT	103
IV.2.2. Influența raportului masic biopolimer/anhidridă asupra gradului de substituție	104
IV.2.3. Influența tipului de anhidridă asupra gradului de substituție	104
IV.2.4. Caracterizarea vâscozimetrică a soluțiilor diluate de collagen modificat	105
IV.2.4.1. Vâscozitatea intrinsecă $[\eta]$	106
IV.2.4.2. Concentrația critică C^*	106
IV.2.5. Studii reologice în mod oscilator a soluțiilor concentrate de collagen pur și modificat	107
IV.2.5.1. Studiu reologic - modificări conformaționale ale collagenului pur și modificat în funcție de temperatură	110
IV.2.6. Analiza termică (μ DSC, ATG)	112
IV.2.7. Analiza morfologică	115
IV.3. Concluzii	118
CAPITOLUL V. REȚELE IPN PE BAZĂ DE COLAGENE MODIFICATE ȘI pHEMA	121
V.1. Chimismul reacției de obținere a rețelelor IPN	122
V.2. IPN-uri pe bază de collagen modificat cu anhidridă maleică (CAM) și pHEMA	124
V.2.1. Analiza structurală a rețelelor IPN pe bază de CAM și pHEMA	125
V.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR	125
V.2.1.2. Randamentul reacțiilor de preparare a rețelelor IPN	126
V.2.1.3. Analiza elementală	127
V.2.2. Analiza timpului de percolație în funcție de compoziția IPN-urilor pe bază de CAM și pHEMA	128
V.2.3. Studiul caracteristicilor de interacțiune cu fluide de interes biologic	130
V.2.4. Analiza rezultatelor privind degradarea enzimatică	131
V.2.5. Analiza termogravimetrică	132

V.2.6. Analiza morfologică	135
V.2.7. Analiza <i>in vitro</i> a capacității de adeziune	136
V.2.8. Analiza rezultatelor privind încărcarea/eliberarea de Ibuprofen	137
V.3. IPN-uri pe bază de collagen modificat cu anhidridă itaconică (CAIT) și pHEMA	139
V.3.1. Analiza structurală a rețelelor IPN pe bază de colagene modificate cu anhidridă itaconică	140
V.3.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR	140
V.3.1.2. Randamentul reacțiilor de preparare a rețelelor IPN	141
V.3.1.3. Analiza elementală	142
V.3.2. Analiza timpului de percolație în funcție de compoziția IPN-urilor pe bază de CAIT și pHEMA	143
V.3.3. Studiul caracteristicilor de interacțiune cu fluide de interes biologic	143
V.3.4. Analiza rezultatelor privind degradarea enzimatică	144
V.3.5. Analiza termogravimetrică	145
V.3.6. Analiza morfologică	146
V.3.7. Analiza <i>in vitro</i> a capacității de adeziune	146
V.3.8. Analiza rezultatelor privind încărcarea /eliberarea de Ibuprofen	147
V.4. IPN-uri pe bază de collagen modificat cu ACIT sau ADMA și pHEMA	148
V.4.1. Analiza <i>in vitro</i> a adezivității	148
V.5. Studii de biocompatibilitate asupra IPN-urilor pe bază de collagen modificat și pHEMA	151
V.5.1. Studii <i>in vitro</i> în culturi celulare – evaluarea citotoxicității	151
V.5.2. Analiza rezultatelor privind viabilitatea celulară în contact cu IPN-urile obținute	153
V.5.3. Vizualizarea celulelor viabile prin Microscopie confocală cu baleiaj laser	155
V.6. Concluzii	155
VI. CONCLUZII GENERALE	159
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	163

INTRODUCERE

Rețelele polimere interpenetrante (interpenetrating polymer network, IPN) sunt considerate printre cele mai eficiente biomateriale moderne. În ultimile decade, IPN-urile au fost investigate în vederea satisfacerii necesităților unor sectoare specifice în industria polimerilor, dar domeniul de aplicabilitate al acestei clase de materiale s-a lărgit considerabil datorită performanțelor superioare demonstrate. Caracteristicile fizice și biologice imprimate IPN-urilor pe parcursul fabricației lor fac din aceste biomateriale resursa primară pentru aplicațiile farmaceutice și medicale, în special pentru obținerea de suporturi în ingineria tisulară a țesuturilor moi și sisteme cu eliberare controlată a principiilor active. Sistemele de eliberare controlată pe bază de rețele interpenetrante sunt concepute pentru a transporta și a elibera medicamentele cu un ritm specific, cu minimum de fluctuație în timp.

În încercarea de a realiza sisteme eficiente și sigure, cunoștințele în domeniul ingineriei, chimiei, farmaciei și medicinei sunt absolut necesare. Alegerea polimerului din care se fabrică IPN-urile este determinată atât de aplicația finală cât și de gradul de retenție, biocompatibilitatea, proprietățile mecanice, gradul de adeziune, trombogenicitatea, porozitatea necesară materialului etc. Importanța utilizării polimerilor biocompatibili și biodegradabili în aplicațiile biomedicale este în continuă creștere datorită capacității lor de a forma rețele tridimensionale cu caracter de hidrogel, care tind să absoarbă cantități mari de fluide biologice. Obținerea de IPN-uri din polimeri naturali și sintetici este considerată utilă mai ales în încercarea de a optimiza biointeracțiunea în condiții fiziologice. În acest scop, proprietățile polimerilor naturali și sintetici pot fi modificate prin grefare, amestecare sau prin reticulare, caracteristicile mecanice și biologice ale sistemului elaborat fiind astfel îmbunătățite.

Datorită biocompatibilității, biodegradabilității, a structurii bine definite și a disponibilității, collagenul este unul dintre cei mai utilizați biopolimeri. Fiind considerat el însuși un medicament, collagenul a fost utilizat ca material hemostatic și ca pansament în tratamentul diferitelor tipuri de leziuni. În cazul afecțiunilor severe ale pielii, administrarea sistemică a principiilor active poate conduce la o concentrație insuficientă a acestora la locul afectat și la efecte secundare. Acest neajuns și-a găsit cu succes rezolvarea în aplicarea locală a medicamentelor, dezvoltându-se astfel sisteme pe bază de collagen ce au ca scop încorporarea și eliberarea locală a principiilor active, collagenul favorizând la rândul lui refacerea țesutului afectat.

Obiectivul lucrării de față constă în realizarea de noi biomateriale pe bază de polimeri naturali și sintetici, care să corespundă cerințelor impuse aplicării în ingineria tisulară. **Noutatea** acestor sisteme constă în formarea de rețele semi-interpenetrante, pe bază de colagene modificate cu anhidride ciclice și reticularea acestora prin copolimerizare radicalică, fără includerea unor agenți de reticulare cu potențial toxic.

În vederea îndeplinirii acestui scop, cercetările au fost desfășurate în următoarele direcții:

- obținerea de materiale collagenice modificate cu anhidride ciclice printr-o metodă originală și caracterizarea acestora din punct de vedere al structurii, morfologiei, retenției de soluții apoase, biodegradabilității, precum și din punct de vedere al proprietăților reologice.

- obținerea de rețele semi-interpenetrare cu caracter de hidrogel, pe bază de colagene modificate și poli(2-hidroxietil metacrilat) (pHEMA), urmărind biocompatibilitatea și capacitatea sistemelor astfel formate de a elibera principii active într-un mediu fiziologic simulat.

Teza este alcătuită din două părți, una teoretică și cealaltă experimentală, fiind structurată în cinci capitole, dintre care: primele două reprezintă studiul bibliografic, iar celelalte, partea originală.

În **capitolul I** sunt prezentate clasificarea, structura, proprietățile, reacțiile de modificare chimică precum și aplicațiile biomedicale ale materialelor collagenice. Este specificată importanța collagenelor în procesul de vindecare a rănilor și stadiul actual al metodelor de tratament împreună cu limitările lor, pentru a evidenția problematica ce a condus la selecția materialelor și strategia experimentală. În **capitolul II** sunt prezentate metodele de obținere și proprietățile rețelelor polimerice interpenetrare, precum și aplicațiile biomedicale ale acestor sisteme, accentul fiind pus pe rețelele interpenetrare cu caracter de hidrogel.

În **capitolul III** sunt prezentate materialele folosite pe parcursul experimentărilor, metodele de sinteză și analiză utilizate.

Capitolul IV constă în prezentarea reacțiilor de modificare chimică a collagenelor cu anhidride ciclice și caracterizarea acestora. În **capitolul V** este discutată prepararea rețelelor interpenetrare pe bază de colagene modificate și copolimerizate în prezența unui monomer hidrofil (2-hidroxietil metacrilat, HEMA) și analiza rezultatelor experimentale obținute, prin prisma proprietăților necesare asigurării aplicației în ingineria tisulară.

Capitolul VI prezintă într-o manieră sintetică principalele rezultate proprii, evidențiind în același timp contribuțiile originale ale lucrării. Datele bibliografice consultate pe parcursul studiilor efectuate încheie lucrarea.

Teza de doctorat se extinde pe 174 pagini și conține 130 figuri, 25 tabele, 32 ecuații și 210 citări bibliografice.

Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin publicarea și trimiterea spre publicare a 6 lucrări, între care 3 la reviste cu coeficient de impact, precum și în comunicarea a 8 lucrări la manifestări științifice interne și internaționale.

Rezumatul tezei de doctorat respectă denumirea capitolelor, numerotarea figurilor, tabelelor și a referințelor bibliografice din teză.

III.1. Concept experimental

Obținerea unor materiale polimere cu potențiale aplicații în medicină și farmacologie constituie obiectul de studiu a numeroase echipe de cercetare din întreaga lume, studiile fiind orientate pe de o parte asupra realizării unor compuși de sinteză cu proprietăți noi, iar pe de altă parte spre inducerea unor efecte sinergetice în materiale pe bază de componente cunoscute. Aceste materiale au aplicații multiple în diverse domenii, de la medicină la industria alimentară și cosmetică. În aplicațiile medicale, o deosebită atenție s-a acordat produselor cu componentă biopolimerică, ca urmare a proprietăților de biocompatibilitate ale acestora, ceea ce le conferă potențial crescut de utilizare în ingineria tisulară, în realizarea de sisteme cu eliberare controlată de medicamente etc.

Interesul legat de utilizarea materialelor cu componentă naturală este de actualitate tocmai datorită necesității de asigurare a unor caracteristici biologice produselor cu aplicabilitate medicală.

În urma analizei rezultatelor științifice din domeniul produselor medicale pe bază de collagen, s-a optat pentru lucrarea de față la o strategie de cercetare care a avut ca obiectiv central:

Obținerea de rețele interpenetrante pe bază de collagen modificat și polimeri sintetici cu aplicații biomedicale.

Pentru atingerea acestui obiectiv cercetările au fost orientate în două direcții:

- transformarea polimer-analogă a unor materiale collagenice cu agenți de acilare și esterificare, în scopul utilizării acestora la realizarea de noi tipuri de materiale cu caracter de rețea interpenetrată;
- prepararea de noi rețele interpenetrante pe bază de derivați collagenici rezultați din modificările chimice și caracterizarea acestora în corelație cu potențialele lor aplicații biomedicale.

Transformările polimer-analoage au avut ca suport materialul collagenic în variantele collagen solubil (Col) și gelatină (Gel), alegerea fiind datorată faptului că acestea se constituie într-o clasă de materiale cu funcționalitate și structură care permit interacțiuni fizice și chimice cu compuși micro- sau macromoleculari.

Sinteza rețelilor interpenetrante pe bază de colagene funcționalizate și polimer sintetic (pHEMA) a avut ca obiectiv formarea de materiale cu caracteristici de hidrogel. Pentru fabricarea IPN-urilor prin polimerizare radicalică s-a utilizat un sistem de inițiere redox constituit din persulfat de amoniu (APS) și N,N,N',N'-tetrametiletlen diamină (TEMED), un sistem capabil să declanșeze reacția de polimerizare ușor, într-un timp scurt și fără să determine producerea de produși citotoxici. Experimentele au urmărit evidențierea influenței gradului de

modificare chimică a collagenului asupra procesului de formare a rețelei tridimensionale, constituindu-se ca element de noutate din punct de vedere al compoziției rețelelor IPN cu componentă collagenică. Valorificarea acestor materiale s-a orientat spre obținerea unor pansamente utilizabile în refacerea țesuturilor, collagenul având calități deja recunoscute în vindecarea arsurilor.

III.3. Obținerea collagenelor modificate

Pentru obținerea biopolimerului modificat, 100 ml soluție collagen (1 % în 0,1 M CH_3COOH) s-au introdus într-un balon de 250 cm^3 cu trei găuri, conectat la un agitator mecanic, cu agitator tip paletă. pH-ul soluției de collagen a fost ajustat la o valoare egală cu 8, prin adăugarea treptată a unei soluții de hidroxid de sodiu (NaOH) de concentrație 1 %.

Viteza de agitare a fost setată la 1500 rotații/minut. Anhidrida a fost solubilizată în dimetil sulfoxid (DMSO) și adăugată treptat peste soluția de collagen, la temperatură ambientală. pH-ul masei de reacție a fost reajustat la 8 prin adăugarea de NaOH de concentrație 1N și menținut la această valoare pe parcursul reacției (24 ore). Pentru a urmări influența raportului masic collagen : anhidridă asupra gradului de substituție al collagenului, s-au utilizat rapoarte între collagen și anhidridă: 1:1, 1:2 și 1:3. Volumul de DMSO utilizat pentru solubilizarea anhidridei a fost de 10 ori mai mic decât volumul soluției de collagen luat în lucru.

Produsul obținut s-a purificat prin dializă (membrană de dializă pentru molecule cu greutate moleculară mai mică de $12.000 - 14.000 \text{ g mol}^{-1}$) contra apei distilate, timp de trei zile, interval în care apa de dializă a fost schimbată de câte 3 ori pe zi. Collagenul modificat a fost izolat prin precipitare cu acetonă și uscare la etuvă, la 37°C .

III.4. Obținerea rețelelor interpenetrante

În vederea obținerii rețelelor interpenetrante, soluția de collagen modificată (10 g L^{-1}) s-a omogenizat foarte bine cu monomer (2-hidroxietil metacrilat, HEMA) și inițiator (APS – 5 % în apă distilată). Apoi s-a adăugat volumul calculat de TEMED și s-a omogenizat viguros, pentru obținerea compoziției finale de polimerizare. Raportul molar APS:TEMED utilizat a fost constant pentru fiecare formulare (1:1, mol:mol). Amestecul format s-a turnat în tăvițe de polietilenă și lăsat să polimerizeze timp de 24 de ore, la temperatura camerei.

Hidrogelurile obținute s-au purificat prin spălări repetate în apă distilată, timp de 3 zile, urmate de congelare la -20°C și liofilizare la -62°C și 0,03 mbar.

CAPITOLUL IV

MATERIALE COLAGENICE MODIFICATE CU ANHIDRIDE CICLICE

În cercetarea întreprinsă s-a optat pentru folosirea collagenelor datorită excelentei biocompatibilități și a faptului că proteinele collagenice se constituie într-o clasă de materiale cu caracteristici structurale care permit interacțiuni fizice și chimice cu compuși micro- și macromoleculari. Una dintre cele mai importante strategii utilizate în prezent în fabricarea produselor cu aplicații în ingineria tisulară este modificarea fizică sau chimică a polimerilor existenți. Tratamentele fizice sau chimice la care sunt supuse materialele collagenice le măresc rezistența la biodegradare, le limitează caracteristicile de umflare și le scad solubilitatea.

Realizarea unor sisteme de eliberare controlată care au ca suport collagenul și ca medicamente antiinflamatoare de tipul Ibuprofenului, pot contribui la îmbunătățirea stării de sănătate umană prin scăderea incidenței tratamentului și a fazelor de evoluție a leziunilor.

Având în vedere cele menționate, s-a studiat posibilitatea preparării de hidrogeluri pe bază de collagene funcționalizate, proces urmat de o copolimerizare grefată prin mecanism radicalic, cu HEMA, precum și influența unor parametri ai reacției de reticulare (raportul biopolimer:monomer și concentrația de inițiator raportată la monomer) asupra proprietăților hidrogelurilor obținute. Modificarea chimică a collagenelor cu anhidride ciclice a fost urmărită prin metode de analiză spectrală și elementală. S-a calculat gradul de substituție și s-a investigat modificarea conformațională a lanțurilor macromoleculare prin măsurători reologice. A fost studiată morfologia în secțiune și s-a determinat stabilitatea termică și temperatura de denaturare a biopolimerului pur și modificat.

IV.1. Chimismul reacției de modificare a collagenelor cu anhidride ciclice

Reacțiile de modificare a grupelor aminice s-au dovedit a fi de mare însemnătate în chimia proteinelor. Modificările chimice ale collagenelor sunt efectuate în vederea obținerii unor materiale noi, cu proprietăți superioare biopolimerilor nativi, în strictă corelație cu o aplicație dată. Realizarea acestui obiectiv se poate face utilizând următoarele metode [168]:

- *transformări polimer-analoage* – reacții la grupările funcționale ale polimerilor naturali cu compuși mic-moleculari, în urma cărora se obțin polimeri cu compoziție diferită față de compusul de plecare, fără a modifica gradul de polimerizare al polimerului natural.

- *reacții de grefare* – reacții la catena principală a biopolimerului ce implică participarea unui reactiv mic-molecular polimerizabil și formarea unor configurații de tip ramificat, influențând sensibil gradul de polimerizare al polimerului.

- *reticulare* – reacții în urma cărora se obțin structuri tridimensionale.

Transformările polimer-analoage ale collagenelor iau în considerare modificarea grupărilor funcționale existente (blocarea acestora cu substanțe chimice diferite) cât și introducerea unor

grupări reactive (funcționalizarea suplimentară a proteinei).

În conformitate cu acestea, studiul de față și-a propus să abordeze reacțiile de funcționalizare ale materialelor collagenice cu reactivi mic-moleculari (anhidride ciclice: anhidrida maleică (AM), anhidrida itaconică (AIT), anhidrida citraconică (ACIT), anhidrida dimetilmaleică (ADMA)) reacții care au ca efect activarea collagenelor cu compuși cu duble legături. Scopul modificării collagenului este de funcționalizare a biopolimerului cu duble legături, care vor fi ulterior implicate în reacții de polimerizare cu monomeri solubili în apă, pentru a forma rețele IPN.

Funcționalizarea collagenelor se realizează prin transformare polimer-analoagă, în sistem omogen. Datele privind chimismul reacției între collagene și anhidridele ciclice indică o preponderență a cuplării la funcția aminică, ca urmare a caracterului nucleofil mai pronunțat. Mecanismul de reacție este unul de substituție nucleofilă la atomul de carbon carbonilic din structura anhidridelor, care decurge prin adiție – eliminare (Figura IV.2).

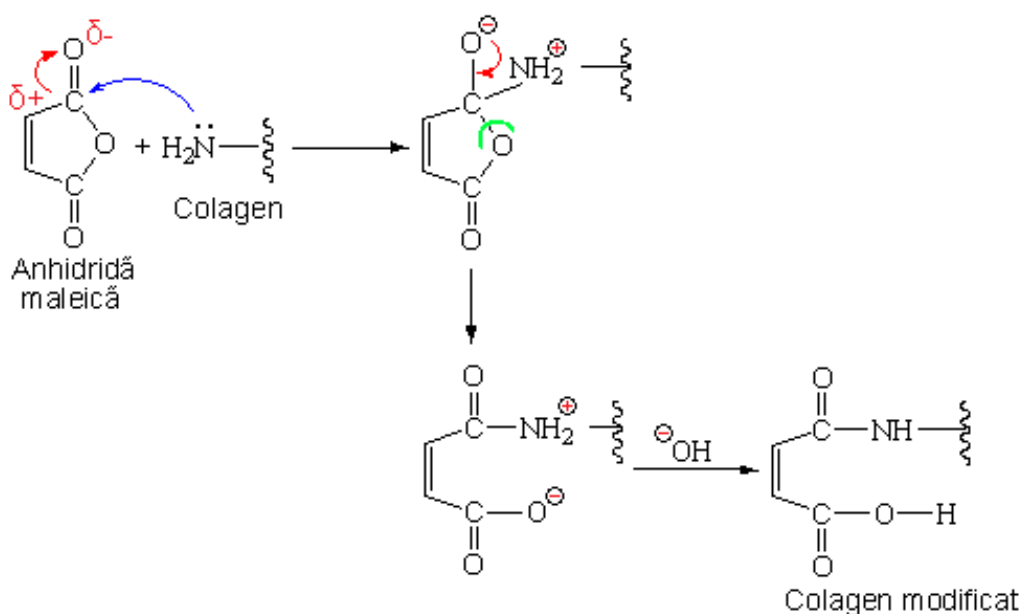


Figura IV.2. Reacția grupării aminice cu anhidrida maleică

La $\text{pH} = 8$, gruparea carbonilică nu este activată de prezența vreunui catalizator și reacția debutează prin atacul nucleofil al grupării aminice, prin perechea de electroni neparticipanți de la atomul de azot (etapa de adiție nucleofilă). Se formează un intermediar tetraedric, în care hibridizarea atomului de carbon carbonilic trece de la sp^2 la sp^3 . Datorită structurii amfionice, acest intermediar nu este stabil și se stabilizează prin scindarea punții anhidridice (etapa de eliminare nucleofilă). Produsul final de reacție rezultă prin transferul de proton de la ionul amoniu (cu proprietăți acide) la anionul carboxilat (cu proprietăți bazice).

Aspectul major în reacția de acilare este hidrolizarea anhidridei. Prezența unui exces de anhidridă în mediul de reacție este, de obicei, suficientă pentru a minimiza producerea hidrolizei.

IV.2. Analiza rezultatelor experimentale

Colagenele modificate au fost congelate la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ și liofilizate în vederea evaluării caracteristicilor fizico-chimice. Modificarea chimică a colagenelor poate fi evidențiată prin tehnici spectroscopice de tipul ^1H -RMN și FTIR-ATR, precum și prin determinarea compoziției în azot și carbon.

IV.2.1. Analiza structurală a materialelor colagenice modificate cu anhidride ciclice

Analiza colagenelor funcționalizate începe cu validarea modificării structurale a moleculelor prin tehnici spectroscopice (^1H -RMN și FTIR-ATR).

IV.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie ^1H -RMN

Considerând ca standard extern acetatul de trimetilsilil propionat (TMS) ($\delta = 0,0\text{ ppm}$), s-au înregistrat spectrele corespunzătoare colagenelor modificate și nemodificate la temperaturi cuprinse între $35 - 85\text{ }^{\circ}\text{C}$, în soluție de clorură de deuteriu (DCl , Sigma-Aldrich, CAS: 7698-05-7).

În Figura IV.3 este prezentat spectrul ^1H -RMN pentru collagenul nemodificat.

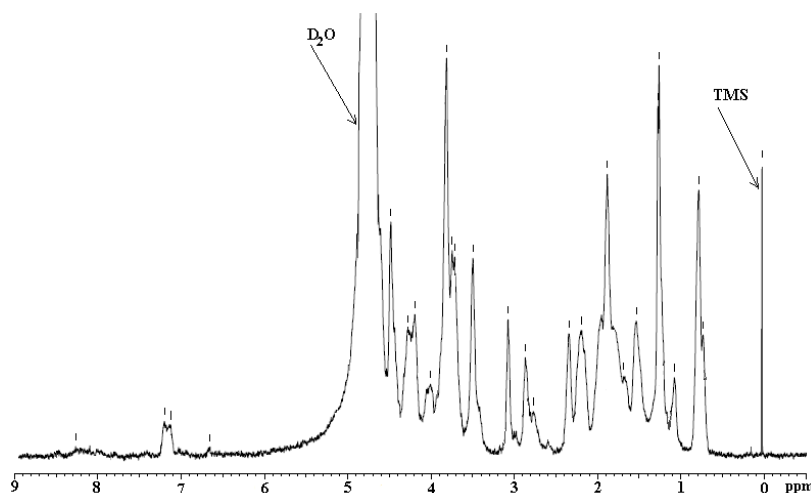


Figura IV.3. Spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru collagenul nemodificat

Spectrul obținut în urma analizei collagenului modificat cu AM (Col:AM , $1:1\text{ g g}^{-1}$) este prezentat în Figura IV.4. Comparând cu spectrul înregistrat pentru collagenul pur, se evidențiază apariția a trei picuri noi: două picuri la $\delta = 6,36\text{ ppm}$ și $\delta = 6,71\text{ ppm}$, fiind atribuite protonilor din dubla legătură ($-\text{HC}=\text{CH}-$) a acidului mono-maleat, iar la $\delta = 8,06\text{ ppm}$ se observă apariția celui de-al treilea pic corespunzător legăturii amidice.

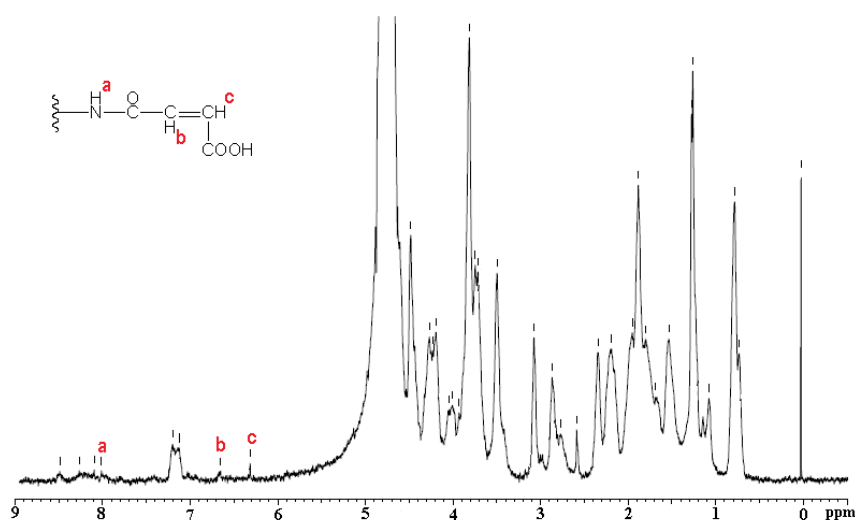


Figura IV.4. Spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru collagenul modificat cu AM (Col:AM, 1:1 g g $^{-1}$)

Spectrul înregistrat pentru collagenul modificat cu AIT (Col:AIT, 1:3 g g $^{-1}$) este redat în Figura IV.5. Spectrele ^1H -RMN ale Col-AIT pentru rapoarte masice Col:AIT 1:1 și 1:2 prezintă benzi de absorbție specifice de intensitate redusă, sugerând un grad ridicat de hidroliză a anhidridei itaconice față de anhidrida maleică.

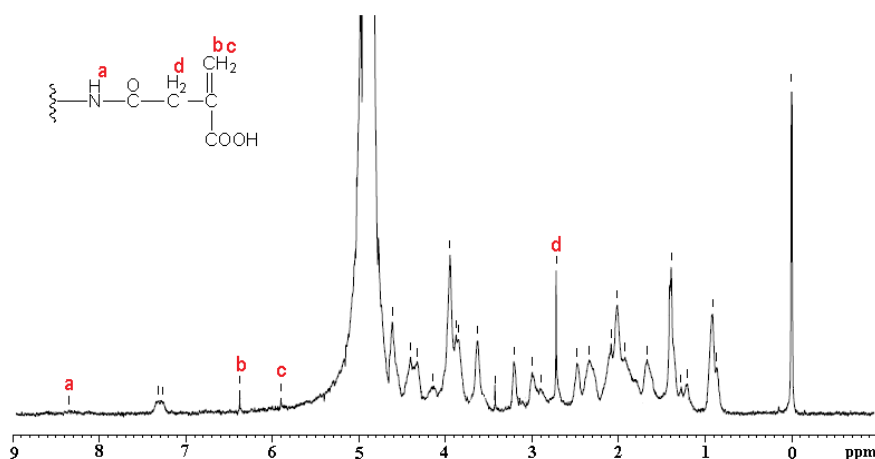


Figura IV.5. Spectrul ^1H -RMN al collagenului modificat cu AIT (Col:AIT, 1:3 g g $^{-1}$)

Pentru un raport masic Col:AIT de 1:3 s-au înregistrat următoarele 4 picuri noi: la $\delta = 8,3$ ppm, caracteristic protonului din gruparea amidică, la $\delta = 5,9$ ppm și $\delta = 6,3$ ppm atribuite protonilor grupării metilen din vecinătatea acidului carboxilic, și la $\delta = 2,7$ ppm specific protonului din gruparea metilen din vecinătatea grupării carbonil.

Modificarea collagenului cu anhidridă citraconică (Col:ACIT, 1:3 g g $^{-1}$) și dimetilmaleică (Col:ADMA, 1:3 g g $^{-1}$) a fost confirmată prin spectroscopie ^1H -RMN și rezultatele sunt prezentate în Figurile IV.6 și IV.7.

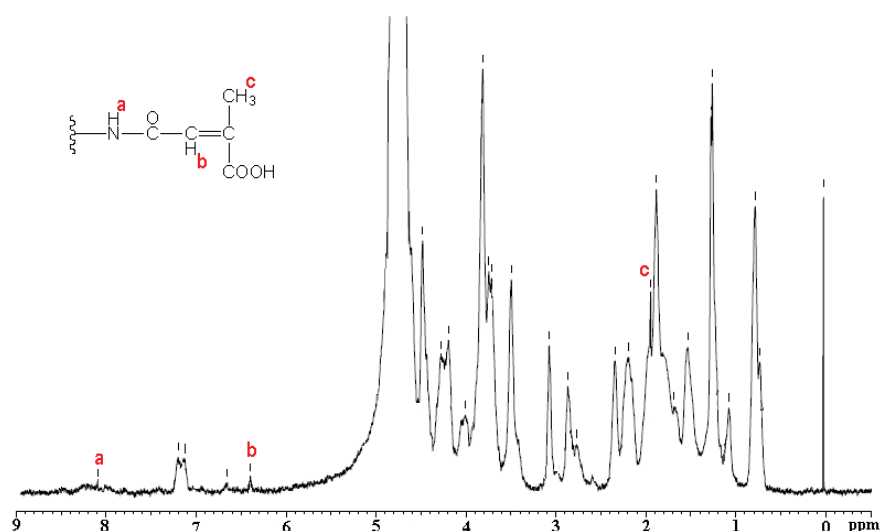


Figura IV.6. Spectrul ^1H -RMN al collagenului modificat cu ACIT (Col:ACIT, 1:3 g g $^{-1}$)

Ca și în cazul modificării collagenului cu anhidridă itaconică, reacțiile cu ACIT și ADMA la rapoarte masice mai mici de 1:3 nu produc modificări ale collagenului vizibile în spectrul ^1H -RMN. Picurile noi apărute în spectrul obținut pentru Col-ACIT (Col:ACIT, 1:3 g g $^{-1}$) sunt: la $\delta = 8,1$ ppm, corespunzător protonului din gruparea amidică, la $\delta = 6,4$ ppm specific protonului din dubla legătură ($-\text{CH}=\text{}$) și la $\delta = 1,9$ ppm atribuit grupării metil (Figura IV.6).

În spectrul înregistrat pentru Col-ADMA (Col:ADMA, 1:3 g g $^{-1}$) se evidențiază apariția a două benzi noi de rezonanță: la $\delta = 8,0$ ppm pentru gruparea amidică și la $\delta = 1,9$ ppm, dat de protonii din grupările metil ale acidului citraconic (Figura IV.7).

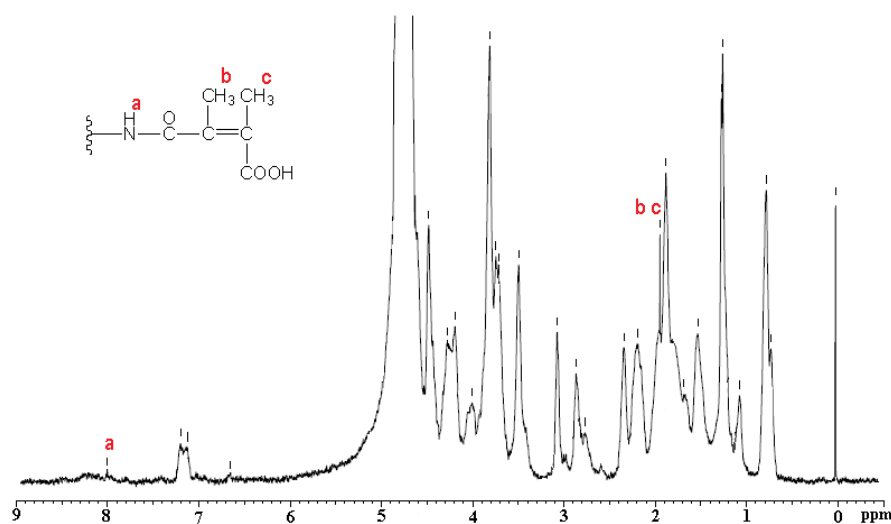


Figura IV.7. Spectrul ^1H -RMN al collagenului modificat cu ADMA (Col:ADMA, 1:3 g g $^{-1}$)

În Figura IV.8 este redat spectrul gelatinei nemodificate, înregistrat în aceleași condiții de temperatură și solvent.

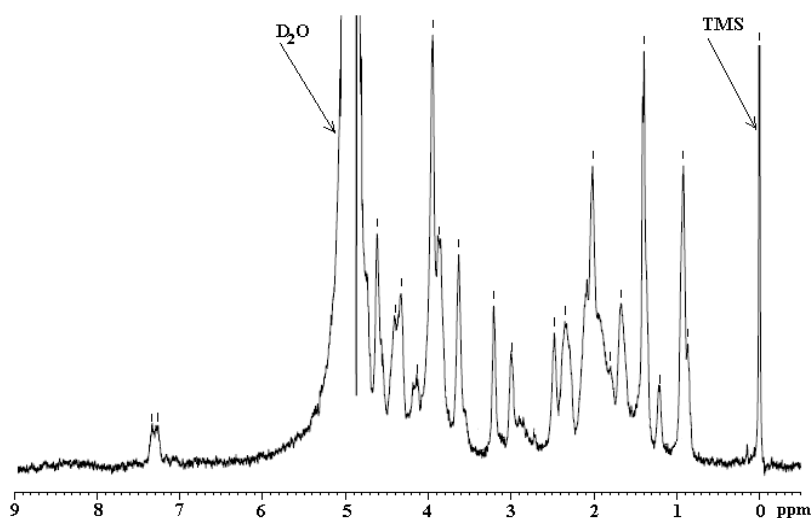


Figura IV.8. Spectrul ^1H -RMN al gelatinei nemodificate

Spectrul gelatinei modificate cu AM (Col:AM, 1:1 g g⁻¹) este prezentat în Figura IV.9. Ca și în cazul modificării collagenului cu AM, benzile de rezonanță nou apărute sunt atribuite protonilor din dubla legătură ($\delta = 6,7$ ppm și $\delta = 6,4$ ppm), precum și protonului din gruparea amidică ($\delta = 8,1$ ppm).

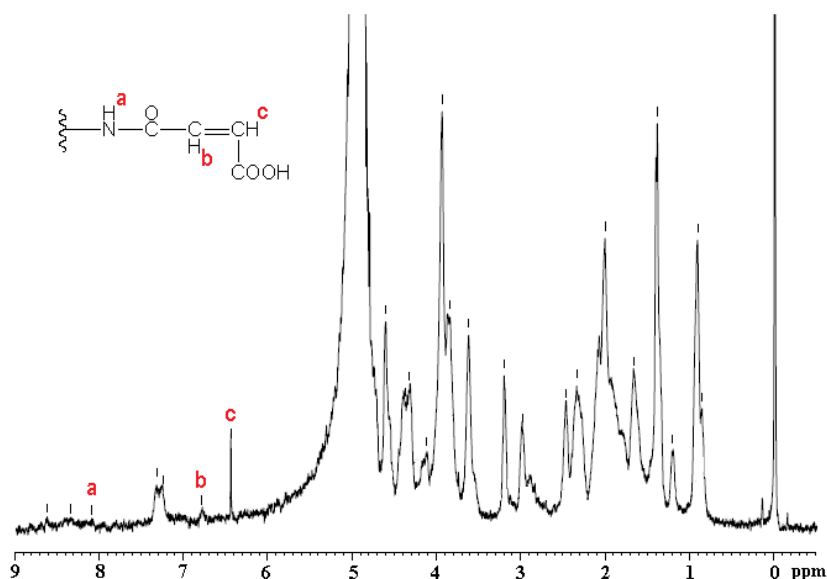


Figura IV.9. Spectrul ^1H -RMN al gelatinei modificate cu AM (Gel:AM, 1:1 g g⁻¹)

În cazul gelatinei modificate cu anhidridă itaconică (Figura IV.10), spectrul ^1H -RMN înregistrează patru picuri noi. Acestea apar la $\delta = 8,3$ ppm, asociat protonului grupării amidice, la $\delta = 5,9$ ppm și $\delta = 6,6$ ppm, asociate protonilor din gruparea metilen învecinată acidului carboxilic, și la $\delta = 2,9$ ppm dată de prezența protonului din gruparea metilen din vecinătatea grupării carbonil.

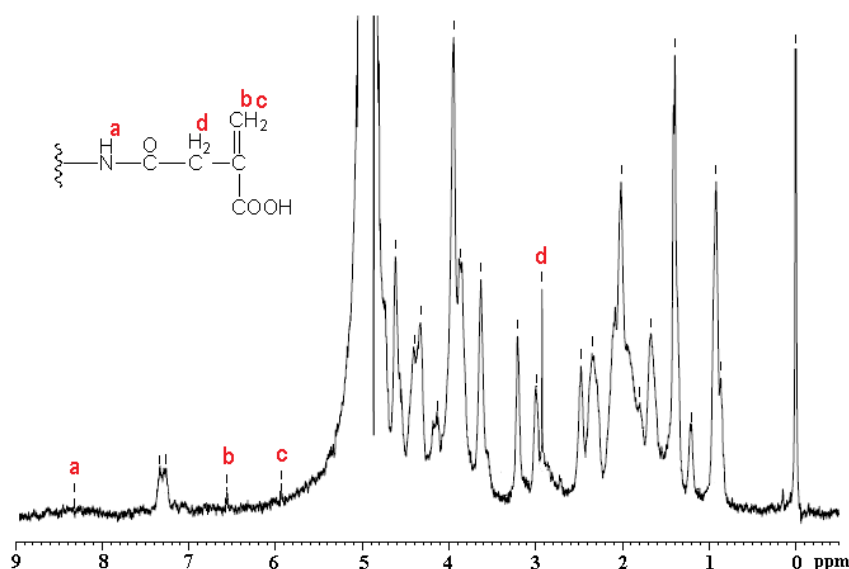


Figura IV.10. Spectrul ^1H -RMN al gelatinei modificate cu AIT (Gel:AIT, 1:3 g g $^{-1}$)

Spectrele ^1H -RMN ale Gel-AIT pentru rapoarte masice Gel:AIT 1:1 și 1:2 nu prezintă benzi de absorbție diferite față de spectrul gelatinei nemodificate.

IV.2.1.2. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR

Modificarea chimică a collagenelor este greu detectabilă prin spectroscopie IR datorită dificultății de obținere a pastilelor de KBr omogene. Collagenul modificat liofilizat este un material ușor, deformabil și greu de mojarat. Din acest motiv s-a apelat la spectroscopia prin reflectie totală atenuată (FTIR-ATR). În Figura IV.11 sunt reprezentate spectrele FTIR-ATR înregistrate pentru collagenul nemodificat (Col), AM și Col-AM (Col:AM, 1:1 g g $^{-1}$).

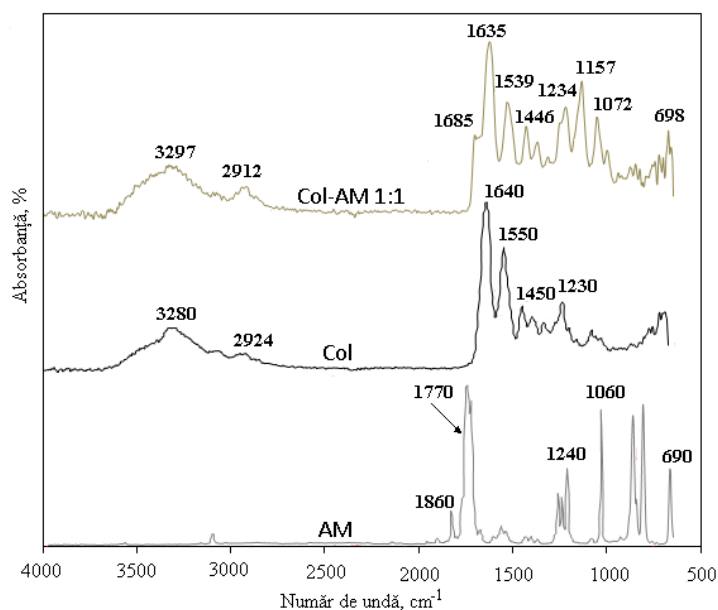


Figura IV.11. Spectrele FTIR-ATR ale collagenului, AM și Col-AM (Col:AM, 1:1 g g $^{-1}$)

Benzile de absorbție caracteristice collagenului apar la următoarele lungimi de undă: vibrații de valență ale -OH – la 3280 cm^{-1} (amidă A); vibrații de valență ale -C-H din -CH_2 – la 2924 cm^{-1} (amidă B); amidă I – 1640 cm^{-1} ; amidă II – 1550 cm^{-1} ; amidă III – 1230 cm^{-1} , valori ce corespund, în mare măsură, cu datele prezentate până acum în literatură [169, 179].

Spectrul ATR al collagenului funcționalizat cu AM prezintă benzi noi de absorbție: la 1685 cm^{-1} , corespunzătoare vibrației de alungire a grupării esterice C=O , la 1157 cm^{-1} , cauzată de vibrația de alungire a grupării C-O și la 1072 cm^{-1} datorate probabil grupelor S=O reziduale ale DMSO. Se mai poate observa, de asemenea, o intensificare a picului la 2912 cm^{-1} , corespunzător grupării alifatică C-H , precum și a picului de la 698 cm^{-1} , indicând formarea de noi grupe -CH=CH- , aparținând acidului maleic.

Frecvențele picurilor corespunzătoare amidelor I și B din spectrul Col-AM (1635 cm^{-1} , 2912 cm^{-1}) sunt deplasate spre valori mai mici comparativ cu cele din spectrul collagenului (1640 cm^{-1} , 2924 cm^{-1}), acest lucru fiind datorat legăturilor de hidrogen generate de compusul maleat. Dispariția semnalului de la 1860 cm^{-1} , caracteristic structurii AM, atestă lipsa compușilor anhidridici nereacționați.

În Figura IV.12 sunt prezentate spectrele FTIR-ATR ale collagenului, AIT și Col-AIT (Col:AIT, 1:3 g g^{-1}). Spectrul corespunzător collagenului modificat cu AIT prezintă picuri caracteristice atât collagenului pur cât și anhidridei. Banda de absorbție de la 1724 cm^{-1} este atribuită vibrației de alungire a legăturii esterice C=O . În plus, la 1446 cm^{-1} apare o altă bandă de absorbție, specifică alungirii legăturii C-N (O=C-NH), iar la 690 cm^{-1} apare banda pentru semnalul slab al grupării N-H . Picul de la 1157 cm^{-1} corespunde vibrației de alungire a grupării C-O . Frecvențele benzilor de absorbție ale amidei I și B (1639 , 1547 cm^{-1}) sunt deplasate spre valori mai mici datorită legăturilor de hidrogen nou apărute.

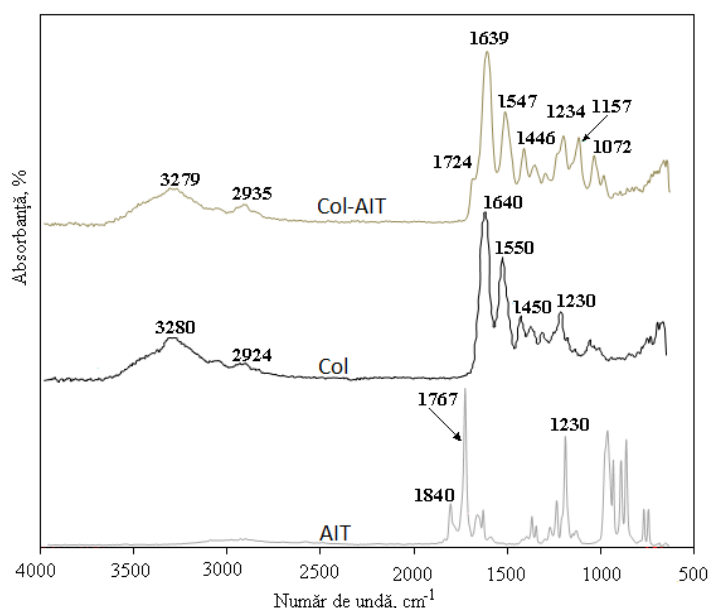


Figura IV.12. Spectrele FTIR-ATR ale collagenului, AIT și Col-AIT (Col:AIT, 1:3 g g^{-1})

Modificarea chimică a gelatinei cu AM (Gel:AM, 1:1 g g^{-1}) și AIT (Gel:AIT, 1:3 g g^{-1}) a fost, de asemenea, investigată prin tehnica FTIR-ATR (Figura IV.13).

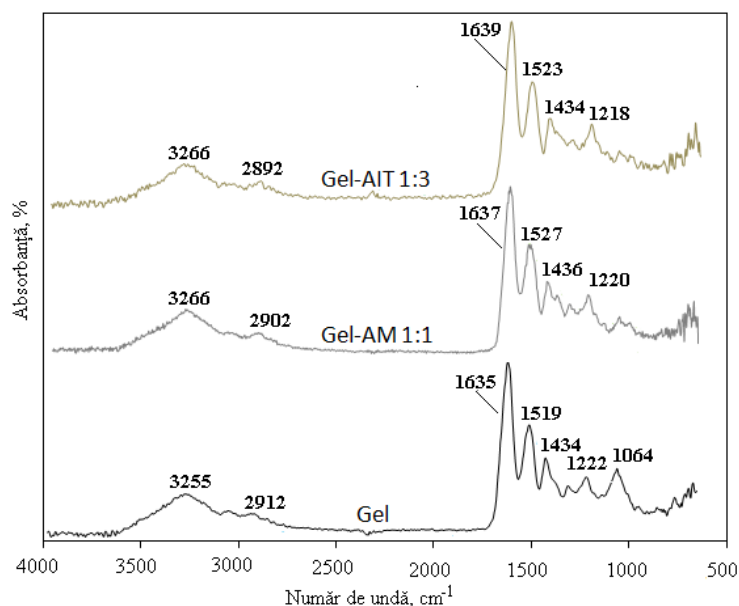


Figura IV.13. Spectrele FTIR-ATR înregistrate pentru gelatină, Gel-AIT (Gel:AIT, 1:3 g g⁻¹) și Gel-AM (Gel:AM, 1:1 g g⁻¹)

Spre deosebire de spectrele înregistrate pentru collagenul modificat, în cazul gelatinei nu apar benzi de absorbție caracteristice legăturilor esterice. Picul corespunzător amidei III (1222 cm⁻¹) a crescut în intensitate și s-a deplasat spre frecvențe mai mici (1220 cm⁻¹ – Gel-AM, 1218 cm⁻¹ – Gel-AIT) sugerând adăugarea de noi grupe C-O.

IV.2.1.3. Analiza elementală - Cuplaj COT/NOT

O altă metodă de validare a modificării chimice a collagenelor este dozarea carbonului și azotului total din proteinele modificate în raport cu collagenele native, prin cuplaj COT/NOT. Principiul metodei constă transformarea carbonului din probă în dioxid de carbon și detectarea acestuia prin spectroscopie IR. Semnalul astfel obținut este proporțional cu cantitatea de carbon din eșantion. Moleculele de azot din probă sunt detectate prin chemiluminiscență după ce sunt transformate în radicali în prezența ozonului și a temperaturii. Astfel, s-au preparat soluții de proteină modificată și nemodificată (în soluție de HCl, pH = 3,5), de concentrație 1 mg mL⁻¹. Pentru fiecare eșantion s-au înregistrat câte trei citiri și media rezultatelor obținute este prezentată în tabelele de mai jos:

Tabelul IV.1. Rezultatele analizei COT/NOT pentru collagenul pur și modificat cu AM și AIT

Proba	TC (mg L ⁻¹) ^a	TN (mg L ⁻¹) ^b	TC/TN
Col	414,6	119,0	3,5
Col-AM 1:1	458,6	128,7	3,6
Col-AIT 1:3	413,4	110,6	3,7

^aTC=concentrația de carbon total; ^bTN=concentrația de azot total

Tabelul IV.2. Rezultatele analizei COT/NOT pentru gelatina pură și modificată cu AM și AIT

Proba	TC (mg L ⁻¹)	TN (mg L ⁻¹)	TC/TN
G pur	398,6	126,4	3,2
Gel-AM 1:1	381,9	113,1	3,4
Gel-AIT 1:3	402,1	112,1	3,6

Analizând rezultatele obținute în urma raportului TC/TN se poate deduce faptul că, spre deosebire de proteinele nemodificate, collagenul și gelatina funcționalizate cu AM (Col:AM, 1:1 g g⁻¹) și AIT (Col:AIT, 1:3 g g⁻¹) conțin un număr mai mare de atomi de carbon, proveniți din structura anhidridelor.

IV.2.2. Influența raportului masic biopolimer/anhidridă asupra gradului de substituție

Gradul de substituție (GS) al proteinelor modificate a fost determinat prin detectarea spectroscopică a produșilor de culoare rezultați în urma reacției dintre acidul trinitrobenzensulfonic (TNBS) și grupările libere ε-amino ale lizinei.

Gradul de substituție a fost calculat utilizând ecuația:

$$(\%)GS = \frac{(\text{absorbanța collagenului nativ} - \text{absorbanța collagenului modificat})}{\text{absorbanța collagenului nativ}} \times 100 \quad (20)$$

În scopul evaluării influenței raportului masic biopolimer/anhidridă asupra gradului de substituție, s-au obținut proteine modificate cu anhidridă maleică (Col-AM și Gel-AM), utilizând rapoarte masice diferite: 1:1, 1:2 și 1:3.

Analizând datele obținute pentru modificarea chimică a collagenului cu AM (Figura IV.14) se constată o creștere a GS cu creșterea cantității de anhidridă folosită.

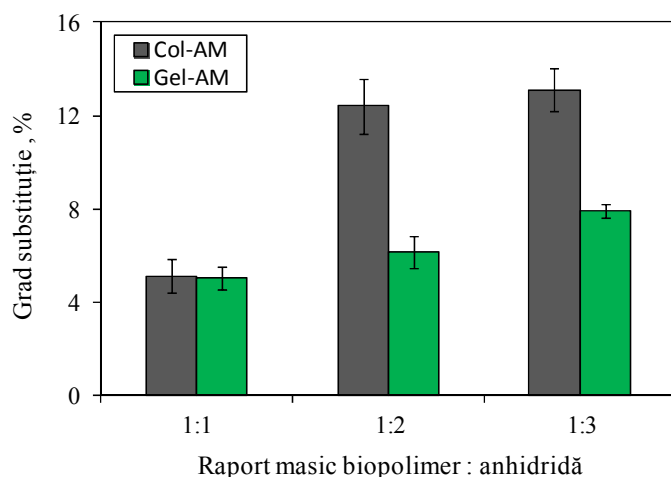


Figura IV.14. Variația gradului de substituție al collagenelor modificate cu AM în funcție de rapoartele masice utilizate (1:1, 1:2, 1:3)

Valoarea gradului de substituție a Col-AM la raport masic 1:1 atinge o proporție de 5,1 %. La un raport Col:AM de 1:3 g g⁻¹, valoarea GS (13,1 %) este apropiată de valoarea GS a Col-AM la raport 1:2 g g⁻¹ (12,4 %).

În cazul gelatinei, gradul de substituție al grupărilor ε-amino crește aproape proporțional cu cantitatea de anhidridă utilizată în reacția de modificare. Diferențele care apar între valorile GS la rapoarte masice 1:2 și 1:3 între cei doi biopolimeri modificați pot fi datorate modului de împachetare supramoleculară și densității de reticulare care diminuează reactivitatea anhidridei.

IV.2.3. Influența tipului de anhidridă asupra gradului de substituție

În vederea analizei influenței tipului de anhidridă utilizată în reacția de modificare a proteinelor, asupra gradului de substituție a acestora, s-au analizat datele obținute pentru GS în cazul collagenului modificat cu cele patru anhidride la un raport masic de 1:3. Reacțiile de modificare chimică s-au desfășurat în aceleași condiții de durată, temperatură și pH.

Valorile gradului de substituție a collagenului modificat (raport collagen:anhidridă 1:3 g g⁻¹) în funcție de tipul de anhidridă sunt prezentate în histograma de la Figura IV.15.

Reacția de modificare a collagenului este mult mai eficientă în cazul utilizării ca agenți de acilare a AM și AIT, valorile GS fiind superioare celor obținute prin modificarea cu ACIT și ADMA, la rapoarte masice identice. Se consideră că rezultatul este datorat atât structurii chimice a anhidridelor și împiedicărilor sterice impuse de aceasta, cât și gradului mare de hidroliză a ACIT și ADMA.

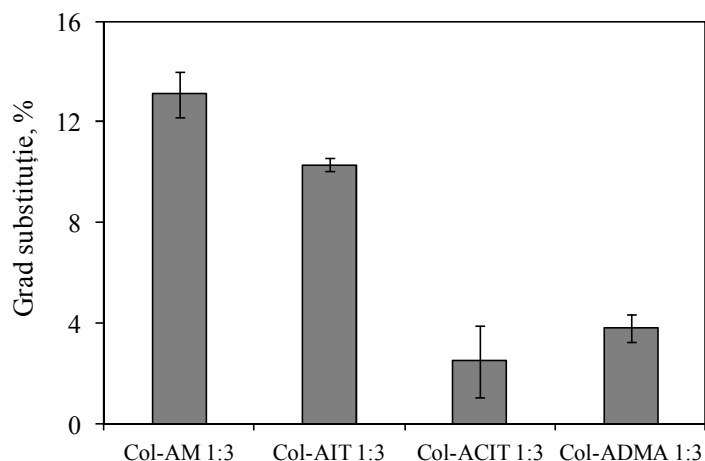


Figura IV.15. Gradul de substituție al collagenului modificat cu AM, AIT, ACIT și ADMA la raport masic 1:3

IV.2.4. Caracterizarea vâscozimetrică a soluțiilor diluate de collagen modificat

Prin studiul vâscozimetric în domeniul diluat al soluțiilor collagenice s-a urmărit comportamentul asociativ al acestora la diferite concentrații în soluție de acid acetic (10⁻¹ M). Domeniul de concentrație studiat variază între 0,25 și 3 g L⁻¹. În Figura IV.16 este reprezentată

variația vâscozității specifice a Col, Col-AM (Col:AM, 1:1 g g⁻¹) și Col-AIT (Col:AIT, 1:3 g g⁻¹) în funcție de concentrație, la 25 °C.

Analizând datele obținute se constată o creștere substanțială a vâscozității specifice a soluției de collagen pur odată cu creșterea concentrației de polimer. Pe de altă parte, soluțiile de collagen modificat cu AM sau AIT comportă o creștere mult mai limitată a vâscozității specifice cu creșterea concentrației polimerului indicând diminuarea proceselor asociative între moleculele proteice ca urmare a modificării chimice cu anhidridă.

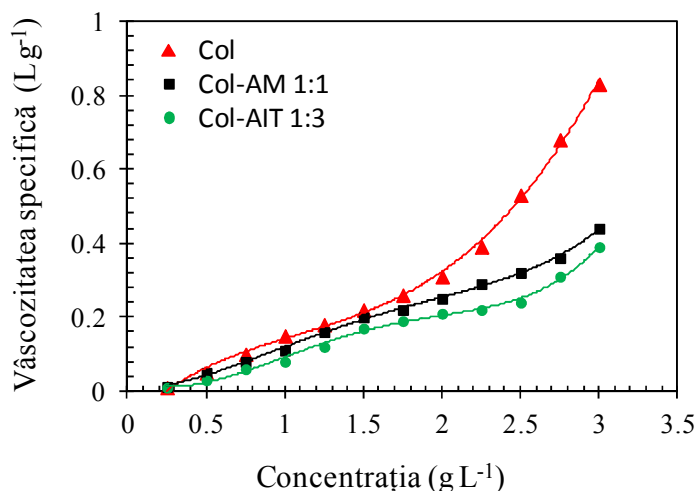


Figura IV.16. Variația vâscozității specifice în funcție de concentrația polimerului (10⁻¹ M CH₃COOH, T = 25 °C)

IV.2.4.1. Vâscozitatea intrinsecă $[\eta]$

Caracterizarea în mediu diluat a eșantioanelor de collagen pur și modificat a fost completată de studiul vâscozimetrie în mediu diluat și semi-diluat în vederea stabilirii vâscozității intrinseci și a concentrației critice C*. C* reprezintă concentrația ce caracterizează limita între regimul diluat și regimul concentrat al soluțiilor polimerice.

Experimental, vâscozitatea intrinsecă s-a determinat prin măsurarea vâscozității soluțiilor de concentrație scăzută, la temperatura de 25 °C, și prin extrapolarea la valoare nulă a vâscozității reduse (η_{red}). Astfel, valoarea vâscozității intrinseci a soluției de collagen pur ($[\eta] = 75 \text{ mL g}^{-1}$) a fost stabilită a fi mai mare decât vâscozitatea intrinsecă a collagenului modificat cu anhidridă itaconică ($[\eta] = 51 \text{ mL g}^{-1}$). Acest comportament se datorează îndepărtării lanțurilor moleculare unele față de altele. Vâscozitatea intrinsecă a collagenului modificat cu anhidridă maleică ($[\eta] = 92 \text{ mL g}^{-1}$) este însă mai mare decât cea a collagenului pur.

IV.2.4.2. Concentrația critică C*

La concentrații mari ale soluțiilor polimerice devin predominante interacțiunile intermoleculare și acestea au un impact major asupra reologiei sistemelor. Aceste interacțiuni pot fi considerate joncțiuni localizate temporare ce se formează și se desfac în mod continuu

între moleculele aflate în mișcare, conducând la formarea unor rețele temporare similare polimerilor reticulați [171]. La valori ale concentrațiilor ce depășesc concentrația critică, orientarea aleatorie a lanțurilor polimere nu mai este posibilă, sistemul manifestând o fază ordonată.

Pentru estimarea valorilor concentrației critice C^* a soluțiilor de collagen și collagen modificat cu AM și AIT s-au trasat curbele bilogaritmice ce reprezintă evoluția vâscozităților specifice în funcție de concentrația de polimer. Măsurătorile au fost realizate la 25 °C cu ajutorul vâscozimetruului Ubbelohde.

În Figura IV.17 este reprezentată curba bilogaritmă a η_{spe} în funcție de concentrația soluției de collagen pur. Intersecția dreptei 1 cu dreapta 2 permite aflarea valorii $C^* = 2,15 \text{ g L}^{-1}$ care separă domeniul diluat de cel semi-diluat.

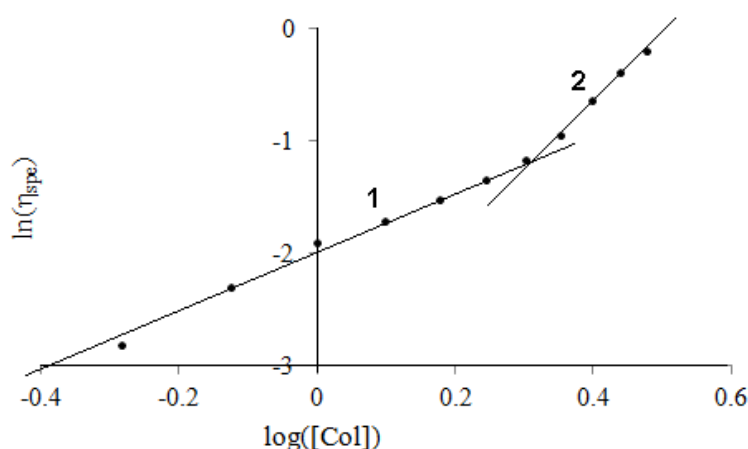


Figura IV.17. Reprezentarea în coordonate bilogaritmice a variației vâscozității specifice în funcție de concentrația collagenului pur (0,25 – 3 g L⁻¹), 10⁻¹ M CH₃COOH

Valorile înregistrate pentru C^* sunt de 2,75 g L⁻¹ pentru Col-AM 1:1, respectiv 2,5 g L⁻¹ pentru Col-AIT 1:3. În concluzie se constată o creștere a concentrației critice, fenomen determinat de modificarea chimică.

IV.2.5. Studii reologice în mod oscilator a soluțiilor concentrate de collagen pur și modificat

Măsurătorile reologice asupra soluțiilor concentrate de collagen pur și modificat au fost realizate cu reometrul AR 2000, utilizându-se geometria con-plan. Astfel, s-a realizat studiul soluțiilor collagenice sub diferite aspecte prin aplicarea a două tipuri de măsurători: curgere și oscilații, variindu-se valorile parametrilor de stare.

Curbele de curgere continuă ale soluțiilor collagenice (Col, Col-AM 1:1 și Col-AIT 1:3) înregistrate pentru aceeași concentrație (10 g L⁻¹, 10⁻¹ M CH₃COOH) și aceeași temperatură (25 °C) sunt reprezentate în Figura IV.20.

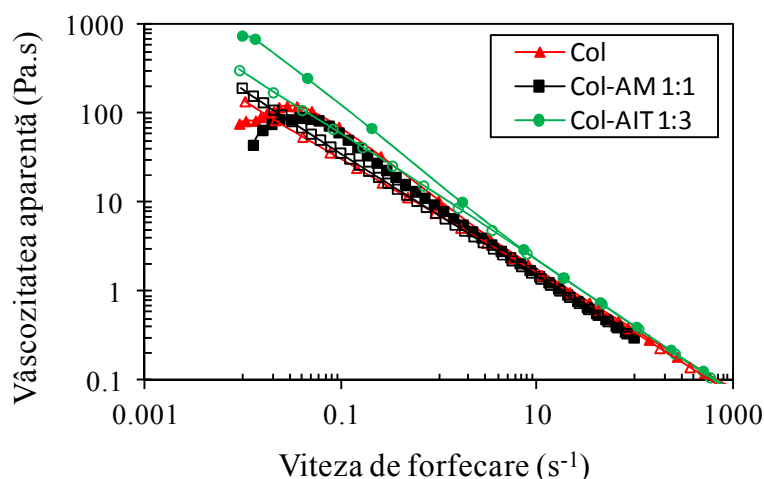


Figura IV.20. Reograma soluțiilor de Col pur și modificat, pentru viteză de forfecare crescătoare (simboluri pline) și descrescătoare (simboluri goale); (10 g L^{-1} în $10^{-1} \text{ M CH}_3\text{COOH}$, 25°C)

Au fost reprezentate atât curbele înregistrate pentru creșterea vitezei de forfecare cât și pentru scăderea acesteia, cu varierea vâscozității aparente, iar reograma obținută ilustrează un comportament pseudoplastic dominant al soluțiilor analizate. La viteze mici de forfecare, collagenul modificat cu AIT prezintă valori mai mari ale vâscozității în comparație cu collagenul pur, în timp ce collagenul modificat cu AM are o vâscozitate mai redusă.

Se pare că fenomenul de reorganizare a lanțurilor moleculare ale collagenului nu este un proces instantaneu, având în vedere faptul că toate eșantioanele analizate necesită timp pentru a reveni la starea inițială atunci când viteza de forfecare este în descreștere [172]. Collagenul pur și cel modificat cu AM au un comportament tixotrop similar, în timp ce collagenul modificat cu AIT are un pronunțat caracter tixotrop.

Măsurătorile reologice oscilatorii permit aplicarea unor deformări slabe astfel încât relația de liniaritate între tensiunea aplicată și deformare să fie respectată. Mărimile cu care se operează în acest caz sunt: componentele modulului de elasticitate complex (modulul elastic, G' și modulul vâscos, G'') și tangenta unghiului de pierdere ($\tan \delta$), definită ca raport între componenta elastică și componenta vâscoasă pentru un corp vâscoelastic. Forma curbelor G' și G'' diferă în funcție de caracteristicile materialului, dar și de valorile variabilelor independente acoperite de aparatul de măsură (frecvență, timp, temperatură, efort).

Preliminar măsurătorii modulelor G' și G'' , s-a determinat liniaritatea proprietăților vâscoelastice a soluțiilor studiate (10 g L^{-1} în $10^{-1} \text{ M CH}_3\text{COOH}$), prin baleierea forței de deformare în domeniul $0,1 - 100 \text{ Pa}$, la o frecvență constantă de 1 Hz . Alegând valoarea forței de deformare pe platoul liniar ($0,1 \text{ Pa}$) s-a continuat cu baleierea frecvenței în domeniul $0,01 - 10 \text{ Hz}$ pentru collagenul pur și modificat și înregistrarea evoluției valorilor G' și G'' în aceste condiții, la aceeași concentrație (10 g L^{-1} , $10^{-1} \text{ M CH}_3\text{COOH}$) și temperatură (25°C) (Figura IV.22).

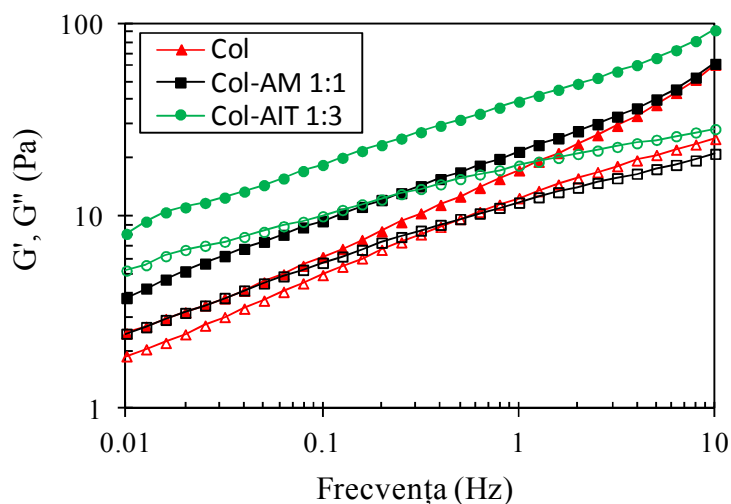


Figura IV.22. Valorile G' (simboluri pline) și G'' (simboluri goale) în funcție de frecvență pentru collagenul pur și modificat cu AM și AIT (10 g L^{-1} în $10^{-1} \text{ M CH}_3\text{COOH}$, 25°C)

Analizând datele obținute în urma testului de baleiere a frecvenței, s-a observat că toate soluțiile collagenice studiate sunt puternic dependente de frecvență. Comportamentul celor trei eșantioane studiate este predominant elastic ($G' > G''$) pe întreg domeniul de frecvență studiat. Modificarea chimică a collagenului cu AM și AIT a afectat proprietățile mecanice ale proteinei. Astfel, valorile G' și G'' pentru Col-AIT 1:3 sunt superioare comparativ cu cele înregistrate în cazul collagenului pur. Valorile G' și G'' obținute pentru Col-AM 1:1 sunt mai mari decât cele pentru collagen, însă la valori mai mari ale frecvenței ($> 10 \text{ Hz}$), vâscozitatea collagenului pur crește, G' (Col) intersectându-se cu G' (Col-AM). În cazul acestor două eșantioane, modulele G' și G'' sunt independente de frecvență până la $0,3 \text{ Hz}$, iar G''/G' este aproape $0,8 \text{ Pa}$ pentru Col și $0,6 \text{ Pa}$ pentru Col-AM 1:1.

IV.2.5.1. Studiu reologic – modificări conformaționale ale collagenului pur și modificat în funcție de temperatură

Caracterul vâscoelastic al soluțiilor collagenice a fost evaluat în funcție de tipul de anhidridă folosită pentru modificările chimice, pe parcursul unor cicluri de încălzire și răcire. Etapa de încălzire a pornit de la 10°C până la 60°C cu o viteză de încălzire de 5°C min^{-1} ; probele au fost ținute la 60°C pentru 2 minute și apoi răcite de la 60°C la 10°C , cu aceeași viteză (5°C min^{-1}). G' și G'' au fost monitorizate în aceste condiții, la o forță de deformare de $0,1 \text{ Pa}$ și o frecvență de 1 Hz . Toate experimentele au fost realizate pentru o concentrație de polimer de 10 g L^{-1} în soluție de acid acetic 10^{-1} M . Reogramele obținute sunt prezentate în Figurile IV.23 și IV.24.

Comportamentul soluțiilor collagenice analizate este elastic în intervalul de temperatură studiat, atât în etapa de creștere a temperaturii cât și la răcire, G' fiind încontinuu superior lui G'' . Gradul mare de dispersare al modulului vâscos în etapele de încălzire/răcire ar putea fi atribuit neomogenității structurale a eșantioanelor analizate [173]. Comportamentul vâscoelastic al collagenului modificat este dependent de tipul de anhidridă utilizat. La inițierea etapei de

încălzire, atât Col-AM cât și Col-AIT prezintă valori superioare ale modulului elastic (46,5 Pa, respectiv 55,6 Pa) comparativ cu modulul elastic al collagenului pur (33,1 Pa), fenomen datorat formării de noi legături de hidrogen intermoleculare, cauzate de apariția a noi grupări carboxil. Tendința a rămas aceeași pe parcursul întregului experiment.

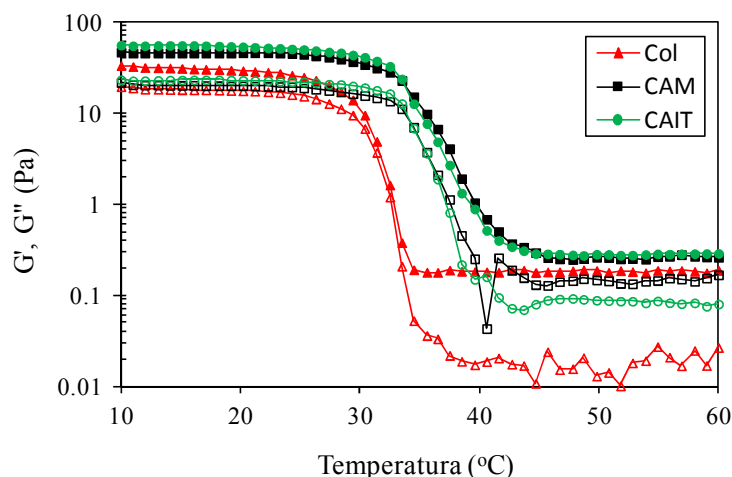


Figura IV.23. Variația valorilor G' (simboluri pline) și G'' (simboluri goale) în funcție de temperatură (10 - 60 °C, 5 °C min⁻¹) pentru collagenul pur și modificat cu AM și AIT

Un alt aspect important este creșterea temperaturii de tranziție conformațională a collagenului modificat. G' și G'' au scăzut dramatic în urma procesului de încălzire, ca rezultat al modificărilor conformaționale suferite de macromoleculele collagenice. Diferența între valorile modulelor de elasticitate ale eșantioanelor studiate a scăzut la finalul procesului de încălzire, ajungând la ~ 0,2 Pa la 60 °C.

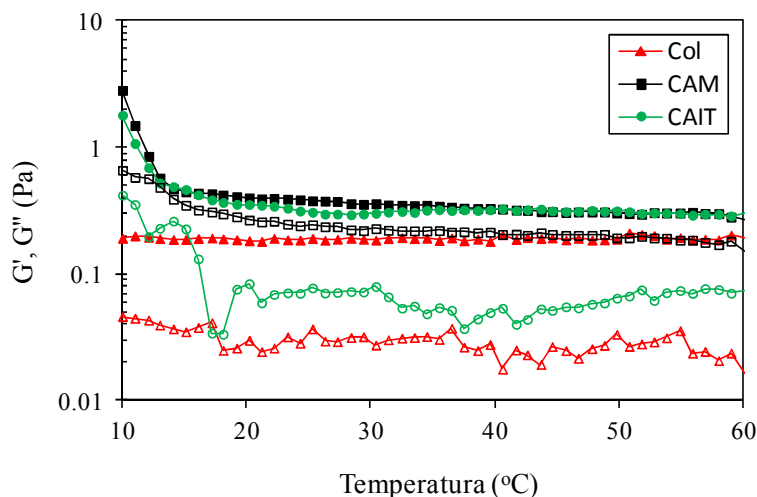


Figura IV.24. Variația valorilor G' (simboluri pline) și G'' (simboluri goale) în funcție de temperatură (60 - 10 °C, 5 °C min⁻¹) pentru collagenul pur și modificat cu AM și AIT

Din analiza reogramelor obținute în timpul răcirii soluțiilor de collagen modificat cu AM și AIT s-a observat o creștere a valorilor G' și G'' atunci când polimerul ajunge la temperaturi joase. În cazul collagenului pur, valorile G' și G'' rămân constante probabil datorită vitezei mari de răcire (5 °C min⁻¹). Indiferent de tipul de anhidridă utilizat pentru modificarea collagenului, această fază de creștere a modulului de elasticitate a început în jurul temperaturii de 18 °C. Tosh

și Marangoni [174] au raportat un interval de temperatură între 18,5 și 34,4 °C necesar gelifierii soluțiilor de gelatină.

IV.2.6. Analiza termică (μ DSC, ATG)

Analizele termice au fost efectuate în vederea detectării temperaturii de degradare și denaturare a collagenelor pure și modificate și pentru a aprecia stabilitatea termică a acestora. Termogramele înregistrate pentru collagenul pur și modificat cu AM și AIT sunt prezentate în Figura IV.25.

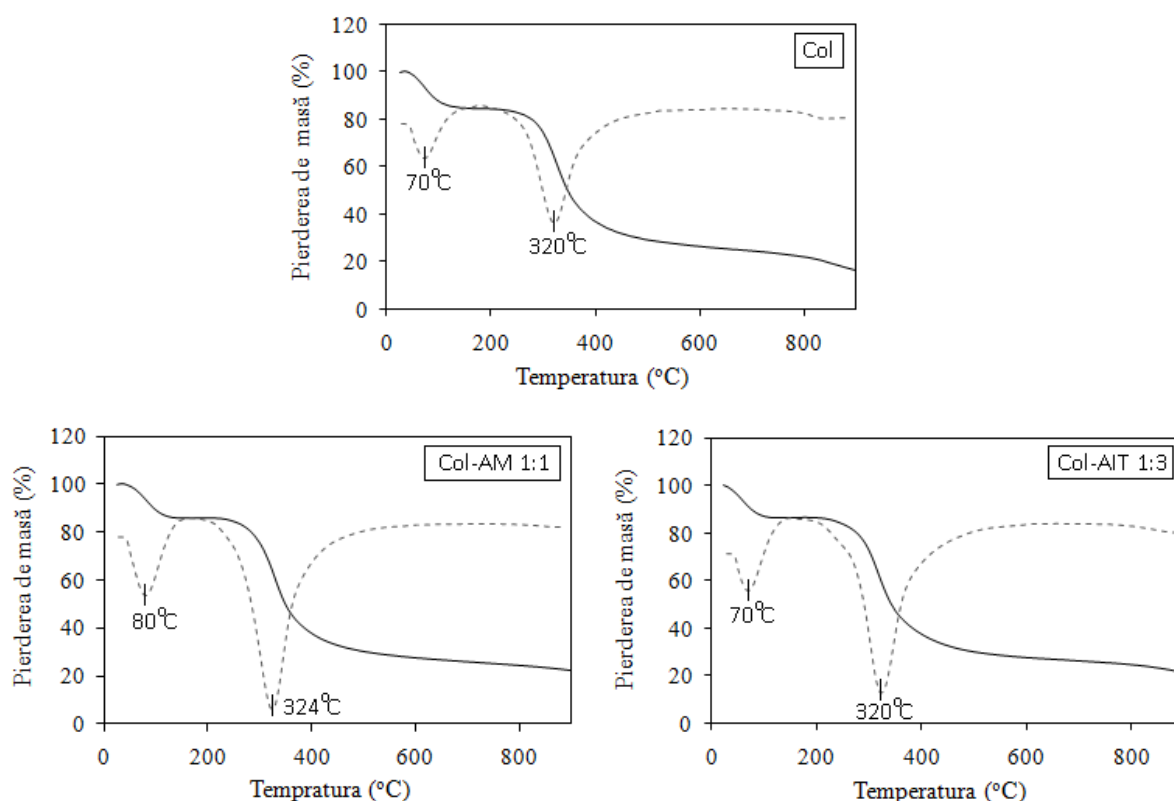


Figura IV.25. Curbele TG/DTG ale collagenului pur, Col-AM (Col:AM, 1:1 g g⁻¹) și Col-AIT (Col:AIT, 1:3 g g⁻¹)

Degradarea termică a proteinei se produce în două etape acompaniate de efecte endo- și exoterme. Prima etapă, în intervalul 25 – 114 °C, este asociată temperaturii de degradare termică a collagenului și cealaltă etapă este corelată cu fenomenul de modificare termică și carbonizare a materialului polimeric [175].

Este bine cunoscut faptul că temperatura de degradare este corelată cu tranziția conformațională a triplului helix în lanțuri dezorganizate [176]. Termogramele înregistrate au pus în evidență temperaturi de degradare similare pentru collagenul pur și cel modificat cu ITA (70 °C), în timp ce collagenul modificat cu AM se degradează la o temperatură mai mare (80 °C). Parametrii de degradare obținuți sunt în corelare cu datele raportate în literatura de specialitate pentru sisteme similare [175]. Gradul maxim de degradare al collagenului pur a fost atins la

320°C și se situează la același nivel cu valorile raportate în literatură [177, 178]. Pentru Col-AM gradul maxim de degradare este atins la 324 °C, iar procesul începe la 270 °C (T_{onset}), în comparație cu T_{onset} pentru collagenul pur, 259 °C.

Valorile similare ale temperaturii de degradare a collagenului pur și modificat cu AIT sugerează faptul că degradarea termică este influențată mai degrabă de gradul de hidratare și de tipul de anhidridă utilizat, decât de gradul de substituție.

Odată începută degradarea termică, materialele polimerice încep să sufere pierderi de masă, fapt ce poate fi pus pe seama diferitelor mecanisme de degradare ce au loc la temperaturi ridicate, cum ar fi: scindări în lanțul principal (depolimerizare), scindări ale grupelor laterale, ciclizări, reticulări. Dacă luăm în considerare pierderea de masă la 489 °C (temperatura ce corespunde gradului maxim de degradare), aceasta se situează la un procent de 81 % pentru collagenul pur și la un procent ceva mai mic pentru colagenele modificate: 78 % pentru Col-AM, respectiv 80 % pentru Col-AIT.

În Tabelul IV.3 sunt sumarizate cele mai importante caracteristici termogravimetrice ale collagenului pur și modificat.

Tabelul IV.3. Caracteristici termogravimetrice ale collagenului pur și modificat cu AM și AIT

Eșantion	Etapele degradării termice	T_{onset} (°C) ^a	T_{peak} (°C) ^b	T_{offset} (°C) ^c	W (%) ^d	M_{Resid} (%) ^e
Col	I	49	70	111	14	19
	II	259	320	414	67	
Col-AM 1:1	I	54	80	114	14	22
	II	270	324	458	64	
Col-AIT 1:3	I	48	70	107	14	19
	II	280	320	489	67	

^a temperatura la care începe degradarea termică; ^b temperatura ce corespunde gradului maxim de degradare;

^c temperatura la care fiecare etapă de degradare ia sfârșit; ^d pierderea de masă în fiecare etapă;

^e pierderea de masă la sfârșitul procesului de descompunere.

Studiul efectuat prin calorimetrie diferențială de baleiaj (μ DSC) pentru evaluarea stabilității termice și a tranziției conformaționale a collagenelor pure și funcționalizate au condus la datele din Figura V.26.

Schimbarea semnificativă a formei termogramelor celor două colagene modificate sugerează modificări intermoleculare ale collagenului [179]. Picul corespunzător temperaturii de denaturare s-a deplasat spre valori superioare în urma reacțiilor de modificare cu AM și AIT, ca efect al formării de noi legături de hidrogen intermoleculare prin apariția de noi grupări carboxil. Col-AM 1:1 s-a denaturat la 39,7 °C, comparativ cu temperatura de denaturare a collagenului pur, 33,9 °C. În curba DSC pentru Col-AIT 1:3 se poate observa creșterea temperaturii de denaturare la 36,4 °C. Aceste deplasări de temperatură pot fi corelate cu creșterea stabilității termice (T_{onset}), cu 3 °C pentru Col-AM și de 5 °C pentru Col-AIT.

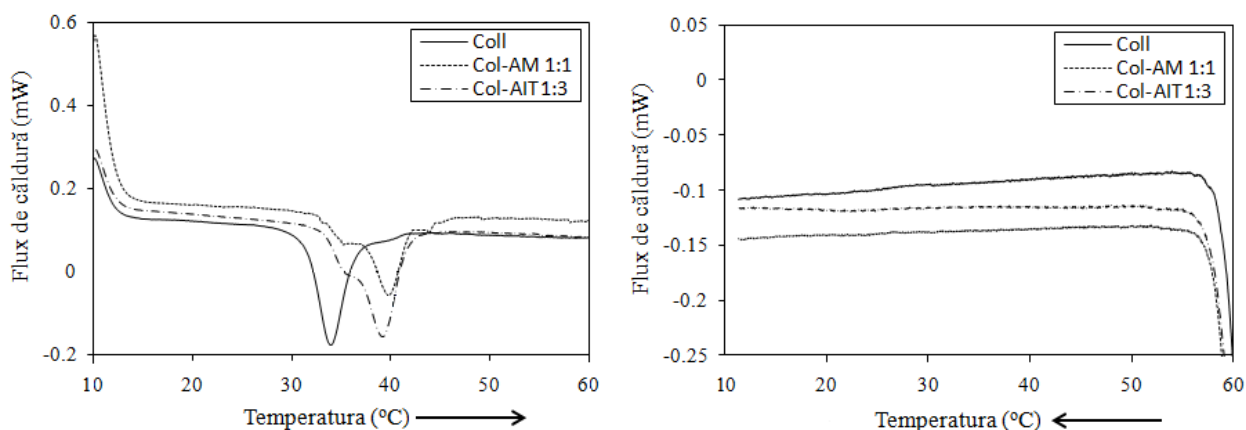


Figura IV.26. Curbele μ DSC pentru collagen pur și modificat (5 g L^{-1} în $10^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$)

Ruperea legăturilor de hidrogen conduce la o tranziție endotermă [180], proces observat în termogramele μ DSC obținute. O modificare a valorii entalpiei ar putea indica denaturarea moleculei de collagen. Collagenul pur și cel modificat cu AM și AIT prezintă valori similare ale entalpiei de tranziție ($\sim 0,15 \text{ J g}^{-1}$), sugerând faptul că proteina modificată necesită aceeași cantitate de energie pentru a fi denaturată.

Picurile suplimentare observate în curbele DSC ale collagenelor modificate ar putea fi atribuite moleculelor collagenice rămase nemodificate. În etapa de răcire a probelor nu a fost detectat niciun semnal, indicând faptul că denaturarea a fost completă și ireversibilă.

Datele obținute în urma analizei μ DSC sunt în concordanță cu rezultatele măsurărilor reologice ale proprietăților vâscoelastice în funcție de temperatură. Temperatura de denaturare a collagenelor modificate este deplasată spre valori mai mari datorită formării de legături covalente ce stabilizează triplul helix [181].

Studiul prin calorimetrie diferențială de baleiaj este util în determinarea temperaturii de denaturare și în cazul gelatinei pure și modificate, însă pentru a putea fi detectate tranzițiile conformaționale ale gelatinei este necesară prepararea unor soluții mai concentrate decât în cazul collagenului și folosirea unei viteze de încălzire mai mici. Curbele μ DSC înregistrate pentru gelatina pură și modificată sunt prezentate în Figura IV.27.

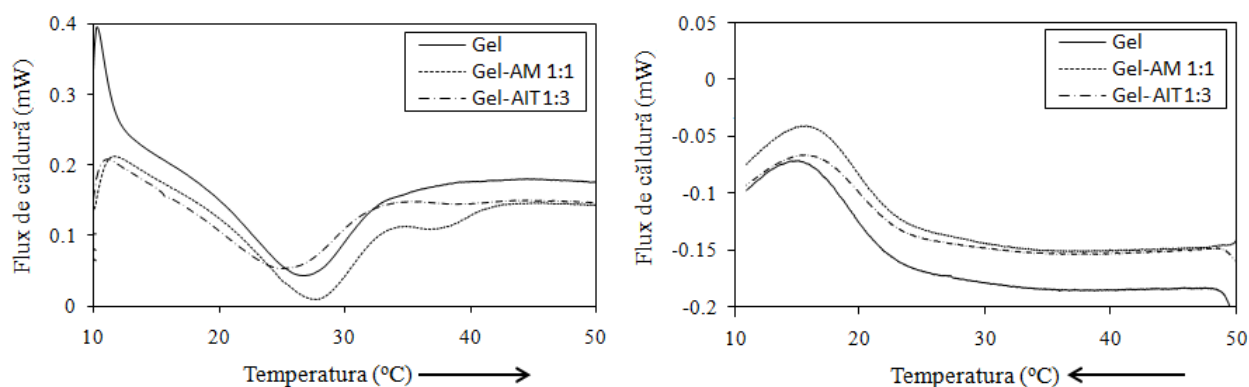


Figura IV.27. Curbele μ DSC pentru gelatină pură și modificată (20 g L^{-1} în apă bidistilată)

Din termogramele μ DSC înregistrate pentru gelatina pură și modificată cu AM (Gel:AM, 1:1 g g⁻¹) și AIT (Gel:AIT, 1:3 g g⁻¹) se observă o deplasare a temperaturii de denaturare spre o valoare superioară în cazul Gel-AM (27,8 °C) și spre o valoare inferioară în cazul Gel-AIT (25,5 °C), comparativ cu temperatura de denaturare a gelatinei (26,3 °C).

Deplasarea temperaturii de degradare spre valori mai mari indică un efect de aditivitate a caracteristicii termice urmărite, în raport cu anhidrida maleică. Această diferență este datorată interacțiunilor suplimentare care se manifestă între lanțurile proteice modificate chimic [182]. În cazul gelatinei modificate cu AIT stabilitatea termică scade.

Tranziția conformațională a moleculelor gelatinei este un proces reversibil, fenomenul fiind surprins și în termogramele μ DSC. Gelifierea soluțiilor de gelatină modificată începe în jurul valorii de 21 °C, în timp ce gelatina pură începe să își revină la starea inițială la 20 °C.

Parametrii ce descriu comportamentul termic al collagenelor pure și modificate sunt prezentați în Tabelul IV.4.

Tabelul IV.4. Parametrii procesului de denaturare extrași din curbele μ DSC și gradul de substituție (%)

Eșantion	T _{onset} (°C) ^a	T _{peak} (°C) ^b	T _{offset} (°C) ^c	ΔH (J g ⁻¹) ^d	GS (%)
Col	31,7	33,9	36,2	0,2	-
Col-AM 1:1	34,6	39,7	41,5	0,1	5,1
Col-AIT 1:3	36,4	39,1	41,2	0,2	10,3
Col-ACIT 1:3	31,8	34,1	36,3	0,1	2,5
Col-ADMA 1:3	31,6	34,0	36,2	0,1	3,8
Gel	21,6	26,3	30,5	0,3	-
Gel-AM 1:1	22,5	27,8	40,6	0,2	5,0
Gel-AIT 1:3	19,2	25,5	29,6	0,2	24,2

^a temperatura la care începe procesul de denaturare; ^b temperatura maximă de denaturare;

^c temperatura la care etapa de denaturare ia sfârșit; ^d entalpia de denaturare.

IV.2.7. Analiza morfologică

Morfologia suporturilor utilizate în ingineria tisulară constituie unul dintre principalii factori care influențează interacțiunea acestora cu celulele, deoarece materialele sunt supuse în timpul contactului cu organismul la procese de infiltrare celulară [183]. Caracteristicile morfologice ale materialelor obținute, cum sunt porozitatea și textura, au fost studiate și imaginile obținute sunt prezentate în continuare.

Datele de microscopie electronică de baleiaj (SEM) pentru collagenul pur, cât și pentru collagenele modificate sunt prezentate în Figura IV.28.

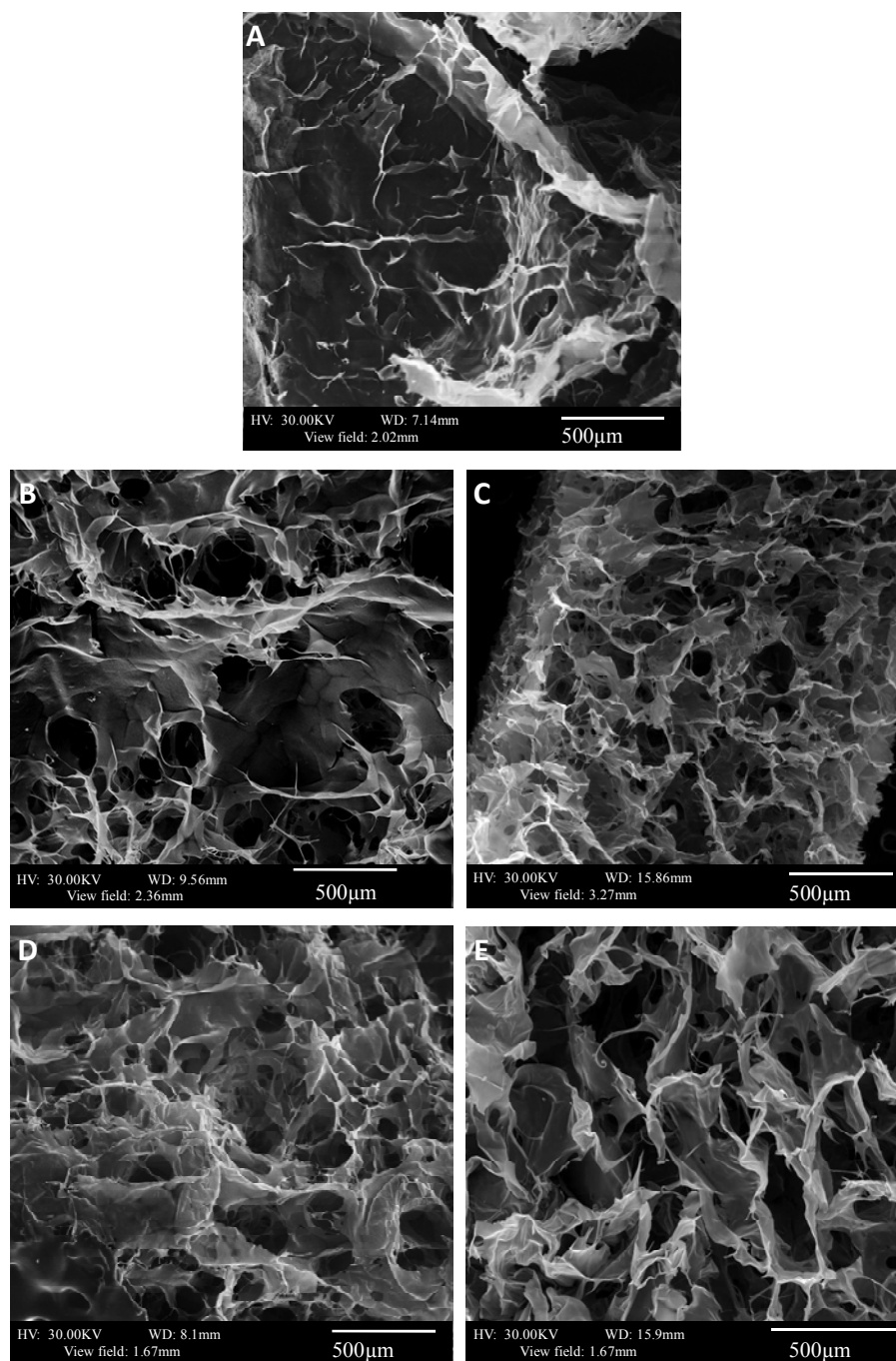


Figura IV.28. Imagini SEM pentru colagenul pur (A), Col-AM (Col:AM, 1:1 g g⁻¹) (B), Col-AIT (Col:AIT, 1:3 g g⁻¹) (C), Col-ACIT (Col:ACIT, 1:3 g g⁻¹) (D), Col-ADMA (Col:ADMA, 1:3 g g⁻¹) (E)

Analizând imaginile SEM obținute se observă structuri morfologice diferențiate între colagenul inițial, nemodificat (Figura IV.28. A) și colagenele modificate (Figura IV.28. B, C, D, E). Acestea din urmă prezintă o structură tridimensională poroasă, mai uniformă, cu pori intercomunicabili. Imaginea înregistrată pentru colagenul pur evidențiază o morfologie neomogenă, cu pori largi, colapsați, distribuiți aleator în masa materialului.

Legarea anhidridelor pe matricea colagenică duce la creșterea porozității totale a materialului colagenic. Dimensiunea acestor pori este mai mică decât în cazul Col pur și sugerează posibilitatea obținerii unui material superabsorbant, respectiv un macrogel.

Porozitatea materialelor este influențată și de parametrii procesului de liofilizare. Prin adăugarea de noi grupări hidrofile ($-\text{COOH}$) macromoleculei de collagen, afinitatea acesteia pentru apă crește, conducând la o porozitate mai mare după liofilizare.

În Figura IV.29 sunt prezentate imaginile SEM obținute pentru gelatina pură și cea modificată cu AM și AIT. Examinând morfologia în secțiune a gelatinei pure obținute în urma liofilizării, s-a observat o microstructură compactă, cu pori mari, neuniform distribuiți. Gel-AM prezintă în schimb o structură lamelară, poroasă, cu pori intercomunicabili alungați, a căror lățime este cuprinsă între 10 și 60 μm . Aceleași caracteristici morfologice sunt observate și în cazul Gel-AIT, cu mențiunea că în acest caz porii sunt colapsați.

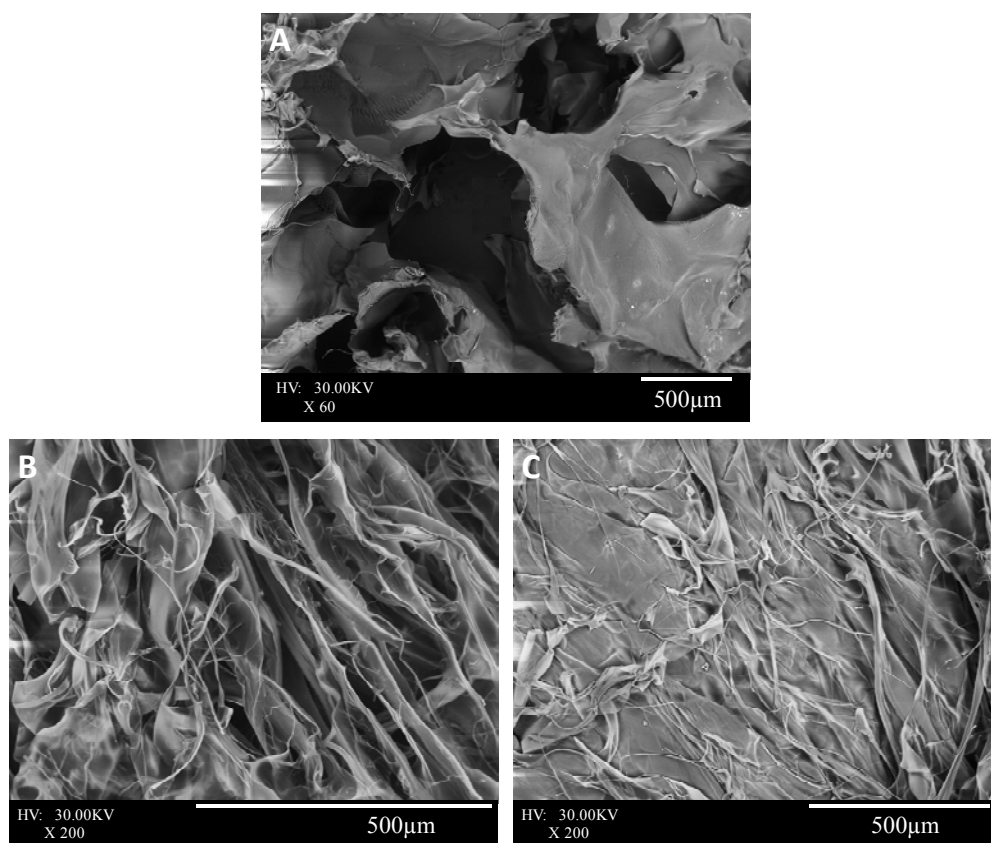


Figura IV.29. Imagini SEM pentru gelatină pură (A) și Gel-AM (Gel:AM, 1:1 g g^{-1}) (B) și Gel-AIT (Gel:AIT, 1:3 g g^{-1}) (C)

IV.3. Concluzii

1. În cercetarea întreprinsă s-a realizat funcționalizarea materialelor collagenice cu anhidride ciclice (maleică, itaconică, citraconică și dimetilmaleică) reacții care au avut ca efect activarea collagenelor cu compuși cu duble legături, în vederea participării ulterioare la reacții de polimerizare-grefare cu monomeri solubili în apă, pentru obținerea de rețele semi-IPN.

2. Modificarea chimică a collagenului și a gelatinei cu anhidride ciclice a fost confirmată prin analize spectroscopice (FTIR-ATR și ^1H -RMN) și prin determinarea azotului și carbonului total.

3. Transformarea chimică a proteinelor a fost evaluată prin dozarea cantitativă a produșilor de culoare rezultați în urma reacției dintre TNBS și grupările ϵ -amino libere ale lizinei din lanțul proteic. Gradul de substituție este determinat de raportul masic biopolimer:anhidridă precum și de tipul de anhidridă. Gradul de substituție crește cu creșterea raportului masic collagen:anhidridă. În plus, dintre agenții de acilare utilizați, anhidrida maleică este cea mai reactivă.

4. Comportamentul asociativ al macromoleculelor de collagen pur și modificat a fost analizat prin studii reologice. În soluții diluate s-a constatat creșterea valorii concentrației critice C^* ca urmare a modificării chimice a collagenului cu anhidridă maleică și itaconică. Studiul reologic al soluțiilor concentrate de collagen modificat ilustrează un comportament pseudoplastic dominant. Rezultatele testelor de baleiaj de frecvență au pus în evidență comportamentul predominant elastic al soluțiilor collagenice pe domeniul de frecvență studiat. În urma studiului de baleiaj de temperatură s-a observat o creștere a temperaturii tranziției conformaționale a collagenului modificat, fenomen datorat legăturilor de hidrogen nou formate între moleculele biopolimerului.

5. Funcționalizarea collagenului cu anhidridă itaconică nu modifică stabilitatea termică a polimerului, în schimb modificarea cu anhidridă maleică conduce la o creștere cu 10 °C a stabilității termice a collagenului. Temperaturile de denaturare corespunzătoare collagenelor modificate cu AM și AIT au fost deplasate în general spre valori mai mari, în timp ce entalpia de denaturare a rămas neschimbată.

6. Porozitatea collagenelor modificate liofilizate a crescut, materialul evoluând către un macrogel, dar cu pori deschiși.

CAPITOLUL V

REȚELE IPN PE BAZĂ DE COLAGENE MODIFICATE ȘI pHEMA

O aplicație importantă a collagenelor prelucrate sub formă de fibre, membrane, geluri sau bureți este vindecarea rănilor. Matricile pe bază de collagen cu structură tridimensională pot fi utilizate ca pansamente pentru răni, deoarece porozitatea interconectată și dimensiunea porilor furnizează un spațiu ideal pentru creșterea și proliferarea celulară [184].

Hidrogelurile biopolimere pot fi preparate ca rețele tridimensionale hidrofile, capabile de a îngloba cantități mari de apă sau fluide biologice și de a elibera principii active în manieră controlabilă. Asemenea rețele pot fi compuse din homopolimeri sau copolimeri și sunt insolubile în apă datorită prezenței reticulărilor (fizice sau chimice). Hidrogelurile obținute din polimeri naturali și sintetici prezintă proprietăți îmbunătățite, caracteristice celor două componente: proprietățile fizice ale polimerului sintetic și particularitățile de bioactivitate ale celui natural [185].

pHEMA este un polimer sintetic biocompatibil, intens utilizat în aplicațiile biomedicale datorită proprietăților sale ușor ajustabile. pHEMA și hidrogelurile pe bază de pHEMA au fost considerate ca fiind materiale ideale pentru utilizarea într-o varietate de aplicații medicale [186, 187, 188]. Hidrogelurile pe bază de pHEMA sunt inerte în contact cu organismul, prezintă rezistență la degradare și la sterilizare, sunt permeabile pentru metaboliți, nu sunt absorbite de organism și pot fi obținute într-o mare varietate de forme. Avantajul major al utilizării matricilor pe bază de collagen și polimeri sintetici ca pansamente pentru arsuri constă în faptul că aceste biomateriale au capacitatea de a rezista la atacul enzimatic și de a conferi un mediu ideal atașării, proliferării și migrației celulare [189].

Față de aceste aspecte, în lucrarea de față se propune obținerea de rețele semi-IPN pe bază de colagene funcționalizate și pHEMA, în prezența unui sistem inițiator (APS, TEMED) și evaluarea caracteristicilor acestor materiale în vederea utilizării lor ca pansamente pentru refacerea arsurilor. Astfel de sisteme nu au mai fost raportate până în prezent, datele bibliografice fiind mărturie în acest sens.

Acest capitol este consacrat studiului obținerii și caracterizării IPN-urilor pe bază de collagen funcționalizat și pHEMA. Scopul urmărit prin studiile efectuate asupra IPN-urilor a fost cel de determinare a influenței anumitor parametri (raportul biopolimer/monomer și concentrația de APS) asupra proprietăților materialelor obținute.

V.1. Chimismul reacției de obținere a rețelelor IPN

În vederea preparării IPN-urilor pe bază de colagene modificate cu HEMA, s-a utilizat un sistem inițiator format din APS și TEMED. Concomitent cu obținerea de lanțuri collagenice funcționalizate și grefate cu pHEMA, are loc formarea de homopolimer și reticularea acestor

lanțuri prin punți de homopolimer, produsul final obținut având caracter de rețea semi-interpenetrată (semi-interpenetrating polymer network – semi-IPN).

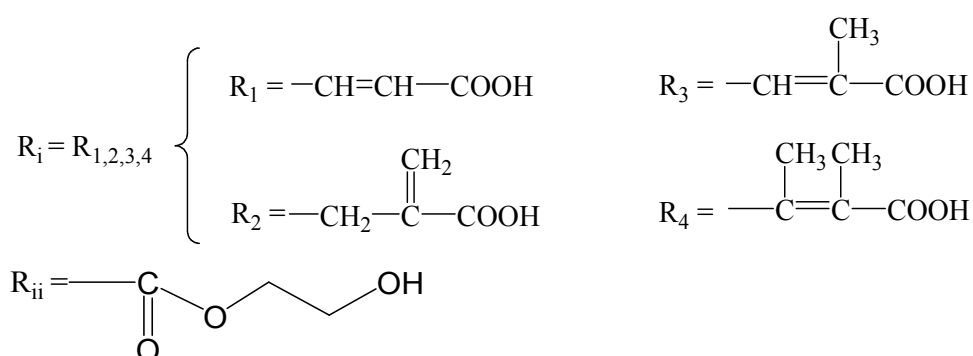
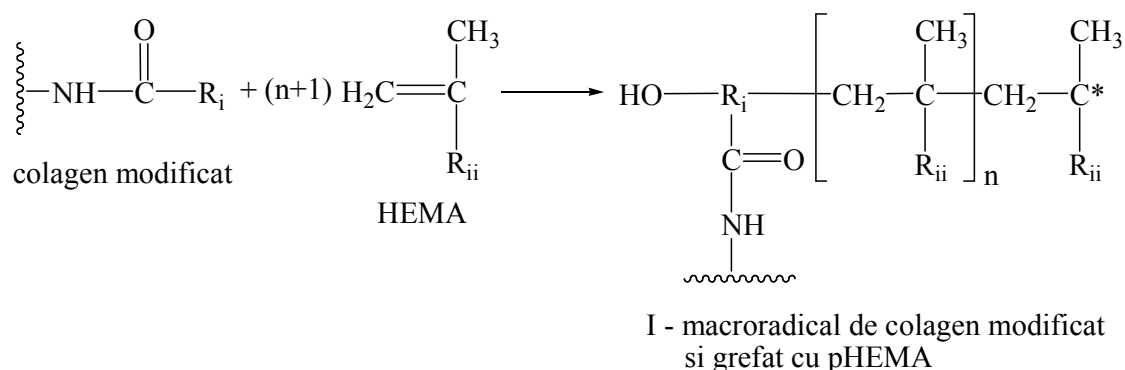


Figura V.1. Schema reacției de formare a macroradicalului de collagen grefat cu pHEMA (I)

În urma acestor reacții s-au obținut semi-IPN-uri (Figura V.4) cu integritate structurală și consistență apreciabilă. Au fost studiate proprietățile fizico-chimice ale acestora și rezultatele obținute sunt prezentate în continuare.

Specific rețelor interpenetrante ce conțin pHEMA în structura lor este faptul că homopolimerul liniar nu poate fi îndepărtat, dat fiind imposibilitatea solubilizării acestuia.

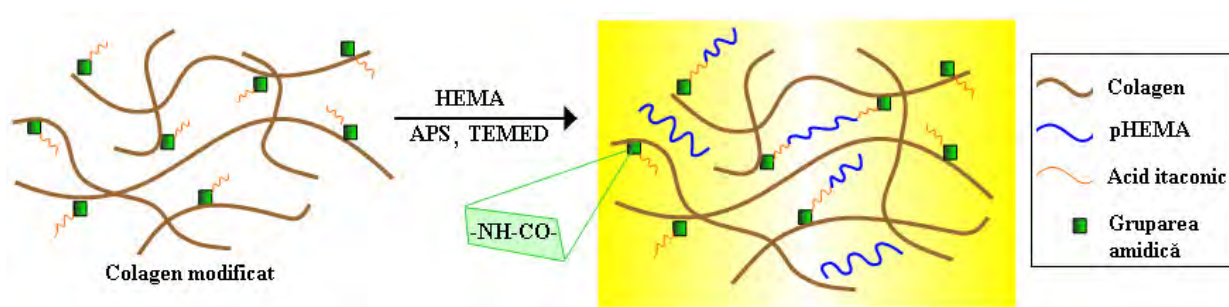


Figura V.4. Reprezentarea schematică a morfologiei unei rețele semi-IPN pe bază de collagen funcționalizat și pHEMA

V.2. IPN-uri pe bază de collagen modificat cu anhidridă maleică (CAM) și pHEMA

În scopul evaluării influenței anumitor parametri ai reacției – raportul biopolimer/monomer, concentrația de inițiator (raportată la monomer) – asupra caracteristicilor IPN-urilor s-a utilizat un program experimental factorial, central, compus, rotabil de ordinul 2, a cărui matrice experimentală este prezentată în Tabelul V.2, împreună cu tipurile de hidrogeluri sintetizate.

S-au preparat hidrogeluri la care diferă raportul biopolimer modificat/HEMA și concentrația de APS raportată la HEMA. Raportul molar APS/TEMED folosit a fost de 1:1 (mol:mol) pentru toate hidrogelurile preparate. Purificarea acestora s-a realizat prin dializă contra apei distilate. Materialele s-au liofilizat ulterior (temperatură de congelare de -62 °C și presiune de 0,03 mbar) în vederea condiționării și studierii proprietăților fizico-chimice și biologice.

Variabila răspuns Y_1 corespunde procentului de collagen (%) din structura hidrogelurilor preparate, Y_2 corespunde gradului de degradare (%) și Y_3 reprezintă capacitatea maximă de retenție a soluțiilor apoase a fiecărei probe. Coeficienții de regresie au fost determinați și sunt reprezentați în Tabelul V.3.

Valorile obținute pentru coeficienții de corelare (între 0,989 și 0,998) indică o bună corespondență între valorile observate și cele modelate [190], obținute prin reprezentarea grafică 3D și prin ecuația matematică:

$$F = a_0 + \sum_{i=1}^m a_i x_i - \sum_{\substack{i=1 \\ j>1}}^{m-1} a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^m a_{ij} x_i^2 - \dots \quad (4)$$

unde a_0 este coeficientul de regresie, x_i și x_j sunt variabilele independente care influențează variabila răspuns F .

Tabelul V.1. Codificarea variabilelor independente

Variabilă independentă	Cod	Variabilă codată				
		-1,414	-1	0	1	1.414
CAM (raportat la HEMA)	X_1	15,86	20	30	40	44.14
APS (% față de HEMA)	X_2	1,293	1,5	2	2,5	2,707

Tabelul V.2. Codificarea IPN-urilor pe bază de CAM și valorile reale obținute pentru conținutul de proteină, gradul de degradare și de retenție al acestora

Cod probă	Variabilă codată		Y_1	Y_2	Y_3
			Colagen, %	Grad degradare, %	Grad retenție, %
	X_1	X_2	Real	Real	Real
20CAM1.5H	-1	-1	11,0	15,3	265
40CAM1.5H	1	-1	13,9	23,0	488
20CAM2.5H	-1	1	12,8	14,7	221
40CAM2.5H	1	1	17,7	23,5	1228
16CAM2H	-1,414	0	9,4	14,1	260
44CAM2H	1,414	0	14,9	24,1	1212
30CAM1.3H	0	-1,414	11,1	19,8	338
30CAM2.7H	0	1,414	13,0	22,9	482
30CAM2H	0	0	12,0	20,6	361
30CAM2H	0	0	12,7	19,8	385
30CAM2H	0	0	12,5	18,4	370
30CAM2H	0	0	12,3	21,0	375
30CAM2H	0	0	12,4	19,0	384

V.2.1. Analiza structurală a rețelelor IPN pe bază de CAM și pHEMA

V.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR

S-au analizat acele hidrogeluri ce au raportul CAM/HEMA constant și la care diferă concentrația de APS raportată la monomer (30CAM1.3H, 30CAM2H, 30CAM2.7H), și respectiv hidrogelurile cu raport diferit CAM/HEMA și concentrație constantă de APS (16CAM2H, 30CAM2H, 44CAM2H). Scopul studiului a fost urmărirea modificărilor structurale cu varierea acestor parametri. Din analiza spectrelor înregistrate se constată o intensificare a benzii de absorbție din jurul valorii 3350 cm^{-1} , corespunzătoare vibrațiilor de valență ale grupărilor OH , odată cu creșterea concentrației de HEMA, respectiv a numărului de grupări COOH în structura hidrogelurilor.

În spectrul 16CAM2H se observă o creștere în intensitate a picului corespunzător amidei B (2920 cm^{-1}) atribuit vibrațiilor de valență ale CH și CH_2 , cel mai probabil datorită concentrației mari de monomer utilizat în procesul de preparare al acestui eșantion. Comparând intensitatea benzii de absorbție corespunzătoare amidei I (1640 cm^{-1}) din spectrele IPN-urilor cu concentrație variabilă de inițiator, dar raport constant CAM/HEMA, se constată o descreștere a acesteia odată cu scăderea concentrației de APS.

Toate eșantioanele analizate prin spectroscopie FTIR-ATR prezintă cel mai intens pic la 1157 cm^{-1} , semnal cauzat de vibrația de alungire a grupării C-O din structura monomerului, iar semnalul de la $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ corespunde întinderii grupării C-O-C [191].

V.2.1.3. Analiza elementală

Compoziția hidrogelurilor a fost stabilită pentru toate hidrogelurile preparate, utilizând în acest scop metoda Kjeldahl. Această metodă a fost aplicată pentru determinarea cantității totale de azot din hidrogeluri, cu mențiunea că acesta poate proveni doar din structura collagenului; prin urmare, s-a putut determina pe această bază procentul de collagen din compoziția finală a IPN-urilor preparate. Variația sa în funcție de parametri considerați este prezentată în Figura V.6, ca suprafață de răspuns în sistem tridimensional.

Datele de analiză elementală ilustrează faptul că odată cu creșterea cantității inițiale de collagen implicat în obținerea hidrogelurilor crește și concentrația de collagen în compoziția finală a acestora, iar varierea concentrației inițiatorului influențează în limite mai restrânse compoziția finală a hidrogelurilor [192, 193]. Se constată totuși o creștere a conținutului final în collagen cu creșterea concentrației de APS, fapt datorat probabil numărului mai mare de molecule de collagen ce participă la reacțiile de grefare-reticulare. Concentrația collagenului în compoziția hidrogelurilor variază între 9,36 % și 17,72 %.

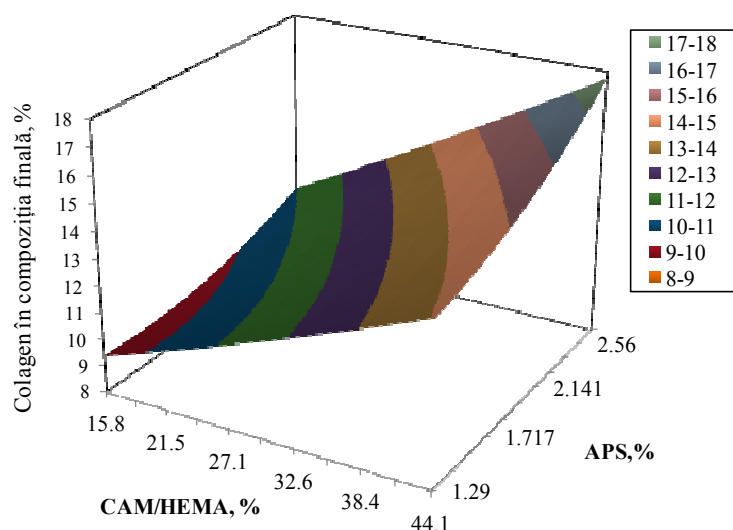


Figura V.6. Cantitatea de collagen în compoziția finală a hidrogelurilor pe bază de collagen CAM și HEMA

V.2.2. Analiza timpului de percolație în funcție de compoziția IPN-urilor pe bază de CAM și pHEMA

Reologia pare să fie tehnica de studiu ce caracterizează complex gelurile covalente, la nivelul fenomenului de percolație, al cineticii de reticulare sau prin estimarea diversilor parametri structurali ai rețelelor (densitatea de reticulare).

Deoarece gelifierea este o tranziție gradată de la un lichid vâscoelastic la un solid vâscoelastic, este foarte importantă cunoașterea proprietăților reologice ale unui astfel de sistem. Forfecarea oscilatorie la amplitudini mici permite investigarea tranziției sol-gel prin probarea modificării monotone a proprietăților vâscoelastice care apar în timpul gelifierii. Inițial,

modulele G' și G'' cresc în funcție de timp, G' rămânând mai mic decât G'' (starea de sol). Ca urmare, există un moment critic în care G' devine mai mare decât G'' . Timpul de percolație (t_{gel}) corespunde, deci, momentului în care $G' = G''$. Sfârșitul procesului de gelifiere are loc odată cu atingerea platoului modulului elastic G' . Valoarea lui G' este independentă de valoarea frecvenței în cazul sistemelor total gelificate, caracterizate prin legături puternice de reticulare.

În scopul monitorizării caracteristicilor vâscoelastice ale sistemelor studiate pe parcursul fenomenului de reticulare, s-au efectuat măsurători ale modulelor G' și G'' în domeniul de frecvențe 0,5 – 5 Hz, la temperatură constantă de 25 °C. Valorile obținute pentru timpul de gel și pentru valoarea de platou a G' pentru IPN-urile cele mai semnificative pe bază de collagen modificat cu AM și HEMA sunt prezentate în Tabelul V.5.

Timpul de reticulare în cazul sistemelor cu concentrație mai mare de collagen modificat este scurt (< 3 minute), motiv pentru care procedeul de studiu nu permite înregistrarea acestei valori. În cazul hidrogelului 16CAM2H timpul de percolație este mai lung, fenomen explicat prin faptul că lanțurile moleculare ale collagenului sunt mai îndepărtate (concentrație scăzută de biopolimer).

Tabel V.5. Timpul de gel pentru IPN-urile pe bază de CAM și HEMA (25 °C) în funcție de compoziția acestora

Cod probă	t_{gel} (min)	G' platou (Pa)
16CAM2H	10	2,6
30CAM1.3H	< 3	23,2
30CAM2H	< 3	9,8
30CAM2.7H	< 3	7,6
44CAM2H	< 3	32,6*

*valoarea lui G' pentru o frecvență de 5 Hz

Din punct de vedere al valorii modulului elastic, aceasta crește cu creșterea concentrației de collagen în structura IPN-urilor. Se poate aprecia faptul că distanța dintre lanțurile polimerice influențează capacitatea de reticulare-grefare, iar cu creșterea concentrației de collagen acest fenomen este mai pronunțat. De asemenea, valoarea lui G' scade cu creșterea concentrației de APS, care sporește capacitatea formării de punți de pHEMA, cu scăderea disponibilității de reticulare-grefare a moleculelor de collagen.

V.2.3. Studiul caracteristicilor de interacțiune cu fluide de interes biologic

Caracteristicile de interacțiune cu soluțiile apoase au fost investigate în soluție tampon fosfat cu pH = 7,4, la 37 °C, și sunt exprimate sub forma cantității maxime de soluție apoasă ce poate fi încorporată în material. Comportamentul este determinat de structura tridimensională a fiecărei probe, cu porozitate proprie, dată de densitatea de reticulare.

Caracteristicile de retenție la echilibru pentru IPN-urile pe bază de CAM și HEMA sunt ilustrate în imaginea din Figura V.9.

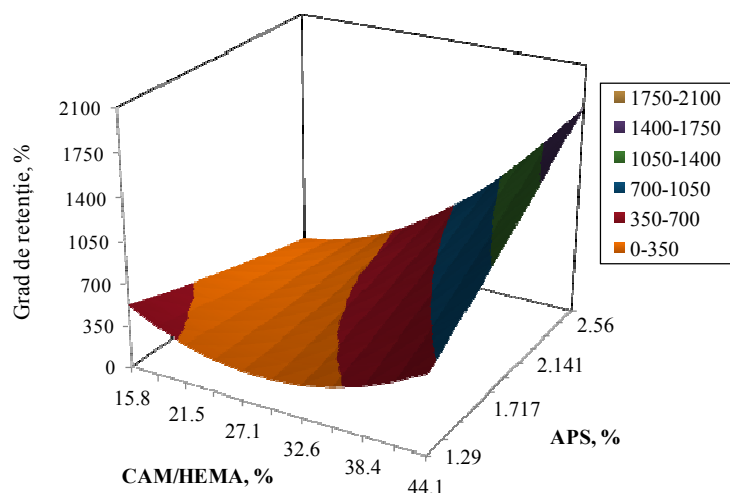


Figura V.9. Gradul retenție al hidrogelurilor sintetizate, în soluție tampon pH=7,4, la 37 °C în funcție de rapoarte diferite CAM/HEMA, respectiv de concentrația de APS

Afinitatea hidrogelurilor pentru absorbția de lichide este atribuită prezenței polimerilor hidrofilii în structura acestora. Astfel, hidrogelurile sunt hidratate diferit, în funcție de caracteristicile de hidrofilie și de morfologie.

Gradul de retenție diminuat al materialelor sintetizate față de gradul de umflare al collagenului nemodificat este determinat de compactizarea produsului intercuplat, prin suplimentarea numărului de funcții aminice participante la reacția chimică interpolimerică. Aceasta face ca o parte din grupele hidrofile să fie implicate în reacția chimică, în timp ce o altă parte devine inaccesibilă prin compactizare. Interacțiunea IPN-urilor cu fluide apoase este dependentă de compoziția acestora: creșterea conținutului de APS și implicit de HEMA prin crearea de situsuri noi de legare la suport, determină o creștere a hidrofiliei hidrogelului.

În general, densitatea mare de reticulare este asociată cu scăderea flexibilității și a elasticității unui hidrogel, acesta pierzând capacitatea de a se extinde și de a îngloba cantități mari de apă. Cu toate acestea, adăția de HEMA conduce la formarea de noi centri hidrofilii (ex. grupări hidroxil) și astfel, un număr mai mare de molecule de apă este legat. Creșterea concentrației de inițiator duce la creșterea hidrofiliei hidrogelurilor [195].

V.2.4. Analiza rezultatelor privind degradarea enzimatică

Degradabilitatea IPN-urilor a fost evaluată prin tratarea acestora cu o enzimă specifică ce degradează collagenul *in vivo*, și anume collagenaza, și prin dozarea cu ninhidrină a grupelor nou formate în urma hidrolizei proteolitice, prin spectrofotometrie UV. Gradul de degradare a fost exprimat ca un procent al numărului de grupări aminice terminale libere provenite din degradarea rețelei, față de numărul de grupări aminice libere ale collagenului pur. Scopul studiului a fost evidențierea contribuției biopolimerului și raportului biopolimer/polimer sintetic asupra degradabilității macro-gelurilor. Din rezultatele obținute se observă că toate hidrogelurile se degradează într-o măsură mai mică decât collagenul și nu se observă o influență semnificativă

a compoziției asupra acestui proces, totuși, hidrogelul cu cea mai mică concentrație de collagen se degradează cel mai puțin.

În Figura V.10 este reprezentată variația gradului de degradare a IPN-urilor pe bază de CAM și HEMA, în funcție de raportul CAM/HEMA și concentrația de inițiator.

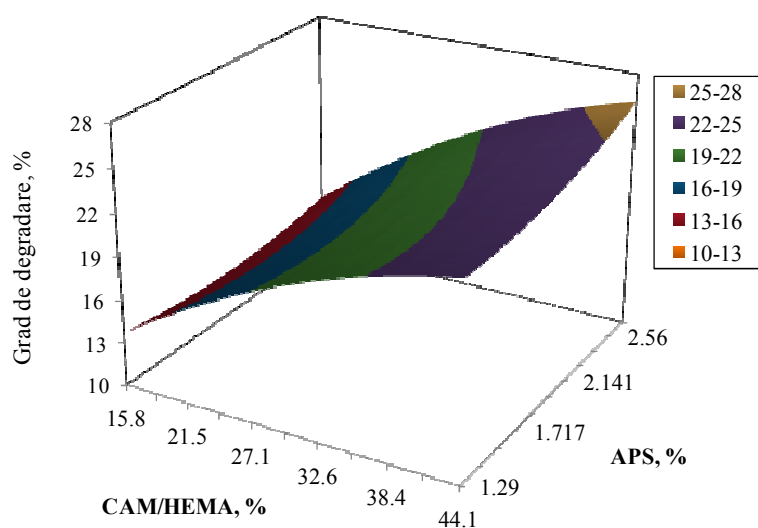


Figura V.10. Gradul de degradare al IPN-urilor pe bază de CAM și HEMA, în prezență de collagenază la pH = 7,4 și 37 °C.

Pe parcursul testelor s-a observat degradarea completă a collagenului pur în maxim 48 de ore, în timp ce rețelele obținute cu pHEMA și-au păstrat integritatea structurală și mecanică pe o perioadă mai lungă de timp, procesul de degradare fiind întârziat.

Curbele cinetice ale gradului de degradare, în prezență de collagenază, sunt ilustrate în Figura V.12.

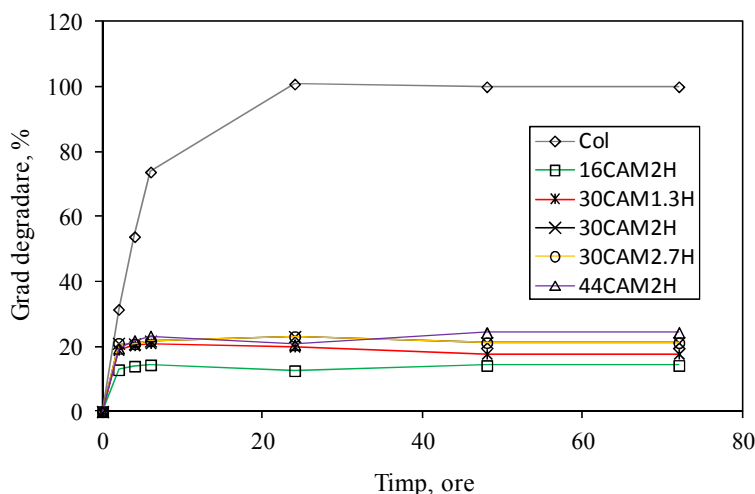


Figura V.12. Curbele cinetice de degradare pentru collagen pur și IPN-urile cu raport constant CAM/HEMA și concentrații variabile de APS

Reducerea semnificativă a ratei de degradare enzimatică a collagenului modificat cu anhidridă maleică (Col:AM, 1:1 g g⁻¹) la 17,5 % în 48 ore este atribuită modificării chimice a biopolimerului. Numeroasele studii asupra metodelor de reticulare a collagenelor, raportate în literatură, indică îmbunătățirea biostabilității materialelor pe bază de collagen folosind această tehnică [197, 198]. În cazul studiului de față, s-a evidențiat faptul că IPN-urile obținute au rezistență sporită la acțiunea enzimelor și acest fenomen ar putea fi datorat structurii reticulate a

acestora. Gradul de degradare este în concordanță cu concentrația în proteină a hidrogelurilor obținute.

Degradarea enzimatică a materialelor pe bază de colagene produce modificări morfologice asupra acestora. În figura V.13 sunt ilustrate imaginile SEM ale hidrogelului 16CAM2H înregistrate înainte și după degradare. Din imaginile înregistrate se observă evoluția morfologiei hidrogelului de la o structură poroasă, cu pori uniformi, intercomunicabili, către o structură compactă, densă.

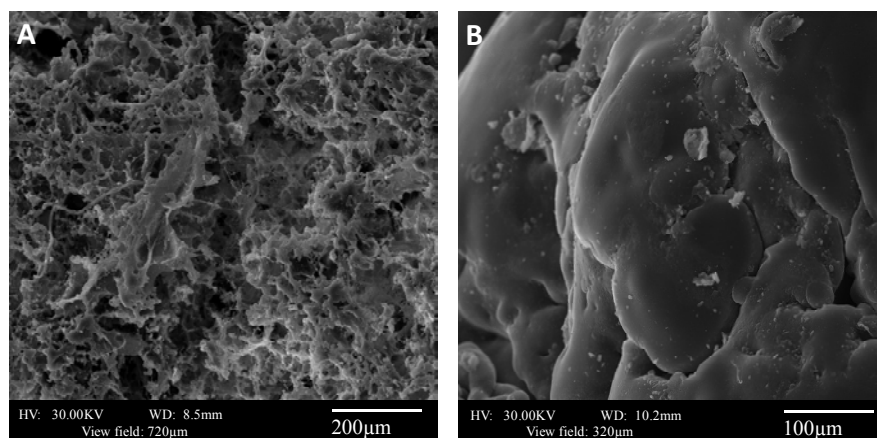


Figura V.13. Imagini SEM ale hidrogelului 16CAM2H înainte (A) și după (B) degradare

V.2.5. Analiza termogravimetrică

Termogravimetria măsoară variația masei unei probe când aceasta este expusă unui regim de temperatură. Pentru caracterizarea stabilității termice se determină temperatura la care începe degradarea termică a polimerului (T_{onset}).

Analiza termogravimetrică a fost evaluată prin analiză dinamică termogravimetrică, în atmosferă de N_2 , la o viteză de încălzire de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Figura V.14 ilustrează curbele ATG și DTG înregistrate pentru hidrogelurile 16CAM2H și 44CAM2H și indică existența a trei etape de degradare termică, acompaniate de efecte endo- sau exotermice.

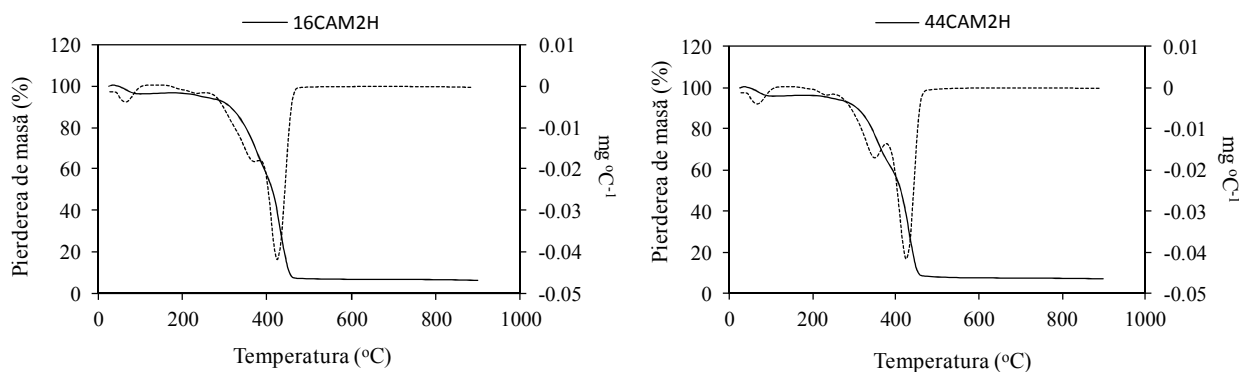


Figura V.14. Termogramele înregistrate pentru hidrogelurile 16CAM2H și 44CAM2H

În prima etapă pierderile procentuale de masă sunt mai mici de 5 % și sunt datorate evaporării apei din structura hidrogelurilor, în timp ce în următoarele faze pierderea de masă ajunge la ~ 90 % și corespunde degradării termice a polimerilor constituenți.

Din rezultatele obținute se poate observa că hidrogelurile sintetizate au o stabilitate termică mai mare decât collagenul pur sau cel funcționalizat. Deplasarea temperaturii de degradare spre valori mai mari indică un efect de aditivitate a caracteristicii termice urmărite, în raport cu polimerul sintetic. Această diferență este datorată interacțiunii între lanțurile proteice și matricea formată prin polimerizarea monomerului sintetic.

Odată începută degradarea termică, materialele polimerice încep să sufere pierderi de masă, fapt ce poate fi pus pe seama diferitelor reacții de degradare ce au loc la temperaturi ridicate, cum ar fi: scindări în lanțul principal (depolimerizare), scindări ale grupelor laterale, ciclizări, reticulări.

Ultima etapă de degradare furnizează o valoare a temperaturii ce corespunde maximului de degradare (T_{Peak}) al IPN-urilor studiate. Prima etapă de degradare are loc cu pierderea apei structurale din hidrogeluri (25 – 114 °C), a doua etapă este atribuită degradării termice a lanțurilor polimerice ale collagenului și ale pHEMA (200 – 400 °C) și a treia etapă (400 – 900 °C) se datorează carbonizării polimerilor [175].

Parametrii care descriu comportamentul termogravimetric al hidrogelurilor analizate sunt reprezentați de: temperatura de degradare termică (T_{onset}) și procentul de pierdere de masă ($W\%$) la 489 °C, în atmosferă de N_2 . Principalele caracteristici termogravimetrice sunt prezentate în Tabelul V.6.

Tabel V.6. Principalele caracteristici termogravimetrice înregistrate pentru IPN-urile 16CAM2H și 44CAM2H

Proba	Stadii ale degradării termice	$T_{Onset}(^{\circ}C)$	$T_{Peak}(^{\circ}C)$	$T_{Endset}(^{\circ}C)$	W%	$M_{Resid}(\%)$
16CAM2H	I	53	67	85	4,0	5,5
	II	297	366	393	43,8	
	III	407	427	452	46,7	
44CAM2H	I	52	67	91	4,5	6,8
	II	291	367	391	41,0	
	III	400	426	447	47,7	

Analizând datele din Tabelul V.6, se observă că ambele hidrogeluri ating maximul de degradare la ~ 366 °C, temperatura inițială de degradare ajungând 297 °C în cazul 16CAM2H, respective la 291 °C în cazul 44CAM2H. Pierderea de masă cauzată de tratamentul termic ($M_{Resid}, \%$) la 452 °C a fost de 94,5 % pentru 16CAM2H și de 93,2 % pentru 44CAM2H, valori superioare celor obținute pentru collagenul nemodificat (81 %).

Utilizând ca și criteriu de evaluare a stabilității termice temperatura de debut (T_{onset}) în etapa II de degradare, s-a stabilit următoarea ordine a rezistenței la degradare termică:

$\text{Col} < \text{Col-AM} < 44\text{CAM2H} < 16\text{CAM2H}$.

Stabilitatea termică a hidrogelurilor analizate a crescut cu aproximativ 30-40 °C în comparație cu stabilitatea termică a collagenului pur sau modificat cu AM. De asemenea, hidrogelul cu cea mai mare concentrație de monomer (16CAM2H) este cel mai stabil.

V.2.6. Analiza morfologică

Datele de microscopie electronică de baleiaj (SEM) s-au analizat în vederea caracterizării morfologice în secțiune a hidrogelurilor obținute, în stare uscată. Porozitatea materialelor este importantă deoarece este strâns legată de înglobarea principiilor active în structura lor și de difuzia acestora în mediul biologic, precum și de capacitatea de atașare și proliferare celulară. Imaginile SEM obținute pentru hidrogelurile 16CAM2H și 44CAM2H sunt prezentate în Figura V.15.

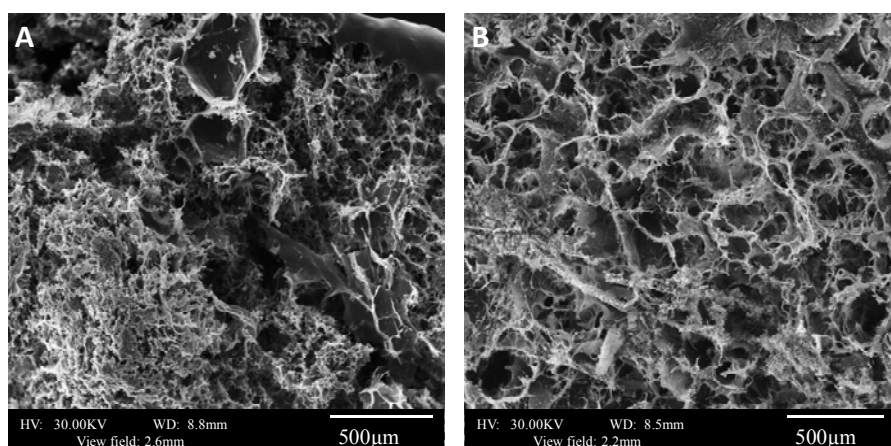


Figura V.15. Imagini SEM ale IPN-urilor 16CAM2H (A) și 44CAM2H (B)

Dimensiunea porilor a fost calculată din prelucrarea imaginilor SEM. Astfel, diametrul porilor se încadrează între 100 - 250 μm în cazul rețelei 44CAM2H și între 20 - 200 μm pentru eșantionul 16CAM2H. Davidenko și colab. [198] au raportat obținerea unor matrici pe bază de collagen și acid hialuronic, cu dimensiuni similare ale porilor (100 - 220 μm) și microstructuri heterogene.

Porii din structura hidrogelurilor se formează prin sublimarea apei în timpul procesului de liofilizare și prin reticularea pHEMA și stabilizarea rețelei tridimensionale cu creșterea omogenității materialului. Este vizibilă scăderea dimensiunii porilor cu creșterea procentului de pHEMA în structura materialului. Acest efect poate fi cauzat de hidrofilia scăzută a polimerului sintetic, comparativ cu hidrofilia collagenului nativ, ceea ce reduce cantitatea de apă absorbită, fie de gradul mare de reticulare.

V.2.7. Analiza *in vitro* a capacității de adeziune

Bioadeziunea reprezintă capacitatea unei material polimeric natural sau sintetic de a adera la o suprafață biologică epitelială. Factorii ce influențează capacitatea de adeziune a unui polimer sunt flexibilitatea, capacitatea de a forma legături de hidrogen, densitatea de reticulare, hidratarea și condițiile de mediu [200].

Testele *in vitro* de evaluare a caracteristicilor de adeziune s-au realizat utilizând ca suport de testare membrane celulozice, acestea având capacitatea de a simula într-o măsură satisfăcătoare membranele biologice [201, 202]. Măsurătorile de adeziune s-au efectuat în soluție tampon fosfat (pH = 7,4) și la 37 °C.

Datele obținute s-au prelucrat în direcția evaluării forței de detașare a materialelor de pe suprafața suport (maximum detachment force, MDF) și a lucrului mecanic de adeziune (total work of adhesion, TWA), care reprezintă produsul între forța de detașare și distanță. Ca referință s-a utilizat collagenul pur și cel modificat cu AM (Col-AM, 1:1 g g⁻¹). Rezultatele experimentale sunt prezentate în Figura V.16.

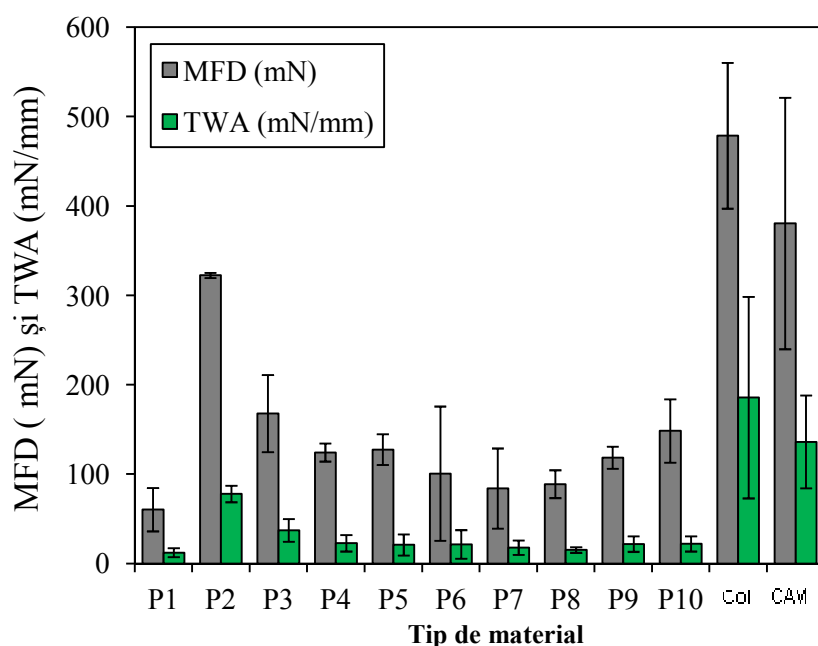


Figura V.16. Valorile medii MFD (mN) și TWA (mN/mm) pentru hidrogeluri, collagen și CAM; (barele reprezintă deviația standard, n = 4)

Este acceptat faptul că forța de adeziune crește cu mărirea conținutului de agent adeziv din compoziția unui material (grupările carboxil, hidroxil, amină) și cu viteza de absorbție a soluțiilor apoase [203]. Din Figura V.16 se poate observa faptul că hidrogelurile prezintă valori mai scăzute atât pentru forța maximă de detașare (MFD) cât și pentru lucrul mecanic de adeziune (TWA) față de valorile obținute pentru collagenul pur și pentru collagenul funcționalizat cu AM, valorile situându-se însă în domeniul recomandat pentru hidrogeluri cu aplicații în ingineria tisulară. Funcționalizarea collagenului prin reacție cu anhidrida maleică determină, de asemenea, o scădere ușoară a celor doi parametri care cuantifică adezivitatea materialului.

V.2.8. Analiza rezultatelor privind încărcarea/eliberarea de Ibuprofen

Mecanismul de încorporare a Ibuprofenului în hidrogelurile pe bază de collagen modificat cu AM sau AIT și HEMA a fost unul fizic. Astfel, includerea principiului activ a constat în suspendarea hidrogelului în soluția de medicament și difuzia medicamentului în ochiurile rețelei dar și în porii acesteia. IPN-urile încărcate au fost condiționate prin liofilizare. Pentru studiul eliberării principiului activ, hidrogelurile încărcate au fost suspendate în soluție tampon fosfat cu pH 7,4, la 37 °C. Mecanismul de eliberare a constat în primul rând, în penetrarea soluției apoase în interiorul hidrogelului, urmată de difuzia medicamentului în mediu.

IPN-urile au fost încărcate cu Ibuprofen, gradul de încărcare fiind de 100 %. Curbele cinetice de eliberare au fost exprimate ca raport între masa de Ibuprofen eliberată (mg) și masa eșantionului testat (g), în funcție de timp.

Curbele cinetice de eliberare a medicamentului sunt prezentate în Figurile V.19 și V.20.

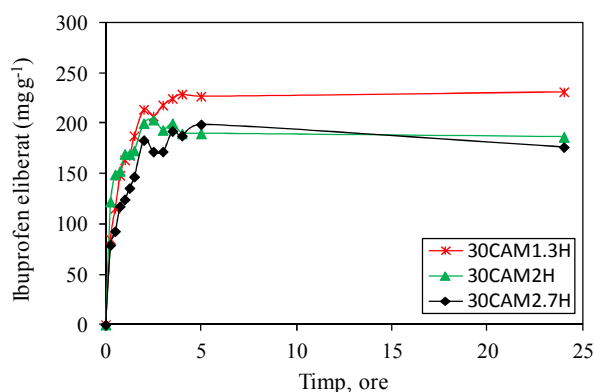


Figura V.19. Curbele cinetice de eliberare a Ibuprofenului pentru IPN-urile cu raport constant CAM/HEMA

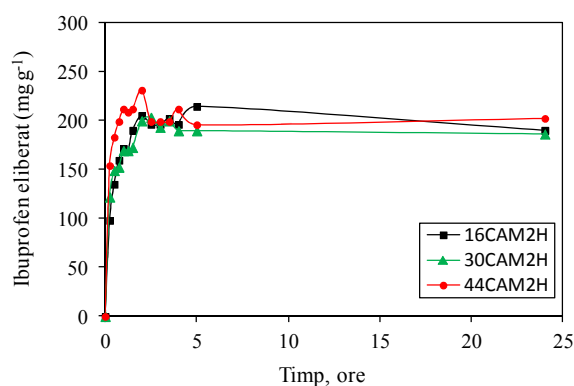


Figura V.20. Curbele cinetice de eliberare a Ibuprofenului pentru IPN-urile cu concentrație constantă de APS

Din curbele cinetice obținute se constată că are loc o eliberare rapidă a Ibuprofenului în primul interval de timp (~ 5 ore) pentru toate hidrogelurile, fenomen cunoscut sub numele de "burst effect" și care este specific tuturor mecanismelor difuzionale. Acest comportament este urmat de o eliberare mai lentă în următorul interval de timp (5 – 25 ore), numai în cazul hidrogelului 30CAM1.3H, probabil datorită concentrației mai mici de APS, respectiv a densității mici de reticulare [204]. Nu se poate face o corelare între conținutul de collagen al IPN-urilor și cinetica de eliberare a Ibuprofenului. Cantitatea de medicament eliberată a fost în concordanță cu cea înglobată (250 mg Ibuprofen/g probă).

V.3. IPN-uri pe bază de collagen modificat cu anhidridă itaconică (CAIT) și HEMA

În Tabelul V.7 este prezentată terminologia IPN-urilor pe bază de CAIT și HEMA, precum și rezultatele obținute în cadrul studiilor de analiză elementală, biodegradare și retenție a soluțiilor apoase.

Tabelul V.7. Codificarea IPN-urilor pe bază de CAIT și valorile reale obținute pentru conținutul de proteină, gradul de degradare și de retenție al acestora

Cod probă	Variabilă codată		Y_1	Y_2	Y_3
			Colagen, %	Grad degradare, %	Grad retenție, %
	X_1	X_2	Real	Real	Real
20CAIT1.5H	-1	-1	8,4	13,3	446
40CAIT1.5H	1	-1	11,6	17,1	517
20CAIT2.5H	-1	1	8,6	12,6	416
40CAIT2.5H	1	1	11,7	17,3	625
16CAIT2H	-1,414	0	6,8	11,6	352
44CAIT2H	1,414	0	11,4	18,6	500
30CAIT1.3H	0	-1,414	9,4	15,9	407
30CAIT2.7H	0	1,414	10,1	16,4	462
30CAIT2H	0	0	10,4	15,1	486
30CAIT2H	0	0	9,7	14,4	503
30CAIT2H	0	0	9,5	15,0	496
30CAIT2H	0	0	10,3	14,8	505
30CAIT2H	0	0	10,4	14,6	498

Tabelul V.8. Codificarea variabilelor independente

Variabilă independentă	Cod	Variabilă codată				
		-1,414	-1	0	1	1,414
CAIT (raportat la HEMA)	X_1	15,86	20	30	40	44,14
APS (% față de HEMA)	X_2	1,293	1,5	2	2,5	2,707

Utilizând programul experimental s-au obținut hidrogeluri diferite prin raportul collagen modificat/HEMA și concentrația de APS raportată la HEMA. Raportul molar APS/TEMED folosit a fost de 1:1 (mol:mol).

Valorile obținute pentru coeficienții de corelare (între 0,94 și 0,99) indică o bună corespondență între valorile observate și cele modelate.

V.3.1. Analiza structurală a rețelelor IPN pe bază de colagene modificate cu anhidridă itaconică

V.3.1.1. Spectroscopia FTIR

Absorbțiile caracteristice collagenului sunt prezente și în spectrele hidrogelurilor: la 3360 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , un "umăr" la 1630 cm^{-1} și un semnal de intensitate redusă la 1520 cm^{-1} și 1240 cm^{-1} . Pe lângă acestea au mai fost înregistrate semnale noi, cauzate de prezența monomerului în structura IPN-urilor: semnalul de la 1720 cm^{-1} este atribuit legăturii esterice $\text{C}=\text{O}$ între collagen și AIT, dar intensitatea mare a picului este dată de grupările carboxil din structura HEMA.

Grupările metil și metilen din HEMA produc semnale la 2920 cm^{-1} și vibrația de întindere a grupării $\text{C}-\text{O}$ este reprezentată de banda de absorbție de la 1160 cm^{-1} . Comparând spectrele hidrogelurilor, se observă o descreștere a intensității amidelor I (1630 cm^{-1}) și II (1520 cm^{-1}), cu creșterea concentrației de monomer în structura acestora.

V.3.1.3. Analiza elementală

Variația procentului de collagen din compoziția finală a IPN-urilor preparate în funcție de parametrii considerați (raportul CAM/HEMA și concentrația de APS) este prezentată în Figura V.22, ca suprafață de răspuns în sistem tridimensional.

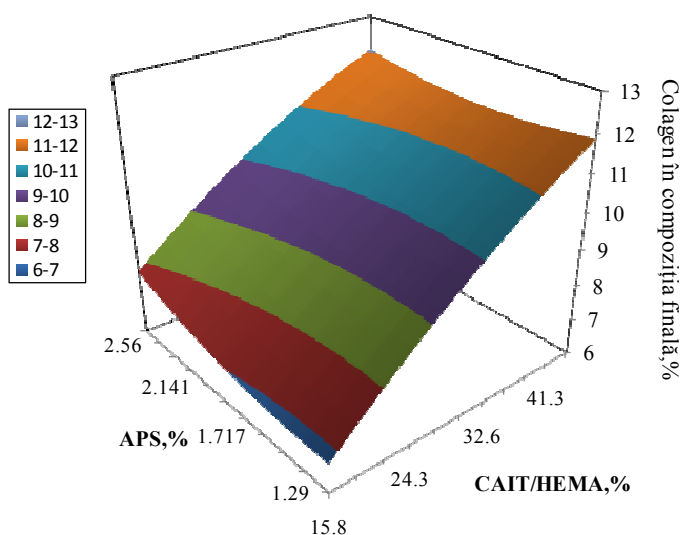


Figura V.22. Variația cantității de collagen în compoziția finală a IPN-urilor pe bază de CAIT și HEMA în funcție de raportul CAIT/HEMA și concentrația de APS

Diagrama obținută ilustrează faptul că, asemenea IPN-urilor constituite din CAM și HEMA, concentrația de collagen în compoziția finală a acestora crește odată cu creșterea cantității inițiale de collagen implicat în obținerea hidrogelurilor. Concentrația de inițiator nu influențează semnificativ compoziția finală a hidrogelurilor (Figura V.23), însă se poate remarca o ușoară creștere a procentului de collagen final cu creșterea concentrației inițiale de APS, ca

urmare a implicării unui număr mai mare de molecule de collagen în reacțiile de grefare-reticulare.

V.3.2. Analiza timpului de percolație în funcție de compoziția IPN-urilor pe bază de CAIT și pHEMA

Valorile obținute pentru timpul de percolație (t_{gel}) și pentru valoarea de platou a G' pentru IPN-urile pe bază de collagen modificat cu AIT și pHEMA cele mai semnificative sunt prezentate în Tabelul V.11.

Tabel V.11. Timpul de gel pentru IPN-urile pe bază de CAIT și HEMA (25 °C) în funcție de compoziția acestora

Cod probă	t_{gel} (min)	G' platou (Pa)
16CAIT2H	< 3	2,5
30CAIT1.3H	< 3	54,8
30CAIT2H	< 3	35,5
30CAIT2.7H	< 3	29,0
44CAIT2H	< 3	80,0*

*valoarea lui G' pentru o frecvență de 5 Hz

Timpul de percolație este mai mic de 3 minute pentru toate IPN-urile studiate, inclusiv pentru cel cu cea mai mică concentrație de collagen, datorită gradului de substituție ridicat al polimerului. Din analiza rezultatelor obținute se constată o creștere a valorii de platou a modulului G' cu creșterea concentrației de collagen și o descreștere a acesteia cu creșterea concentrației de inițiator, similar IPN-urilor pe bază de CAM. Se constată însă o creștere a densității de reticulare (valorile G' sunt în general superioare) față de sistemul studiat anterior, fenomen datorat excesului de legături duble capabile să co-polimerizeze cu HEMA (Col:AIT, 1:3 g g⁻¹).

V.3.3. Studiul caracteristicilor de interacțiune cu fluide de interes biologic

Gradul de retenție volumetric la echilibru (GR_{max}) s-a determinat cu ajutorul relației:

$$(\%)GR_{max} = \frac{v_t}{m_0} \times 100 \quad (21)$$

în care v_t este volumul de solvent absorbit la timpul t și m_0 este masa inițială a probei.

Din diagrama obținută (Figura V.24) se poate remarca o creștere a gradului de retenție cu creșterea raportului CAIT/HEMA și o scădere a gradului de retenție cu creșterea concentrației de

inițiator, fapt ce poate fi explicat prin creșterea densității de reticulare, ce duce la scăderea dimensiunii porilor și scăderea cantității de apă înglobată în structura hidrogelurilor.

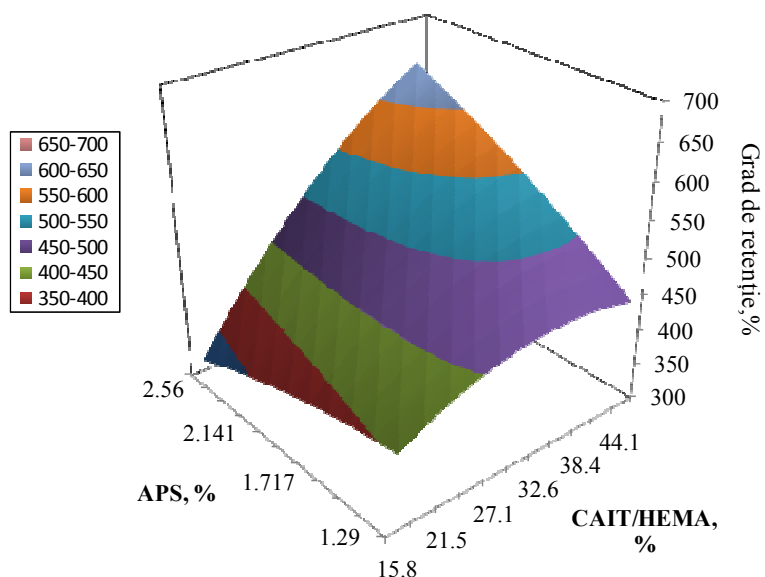


Figura V.24. Gradul de retenție a PBS (%) pentru hidrogelurile pe bază de CAIT și pHEMA

V.3.4. Analiza rezultatelor privind degradarea enzimatică

Testele de biodegradabilitate *in vitro* s-au realizat și rezultatele s-au exprimat în aceleași condiții ca și în cazul sistemului anterior. Datele obținute sunt ilustrate în Figura V.25.

Din diagrama rezultatelor obținute se observă că toate hidrogelurile se degradează, dar într-o măsură mai mică decât collagenul pur și nu se observă o influență semnificativă a compoziției asupra acestui proces; totuși, hidrogelul cu cea mai mică concentrație de collagen (16CAIT2H) se degradează cel mai puțin.

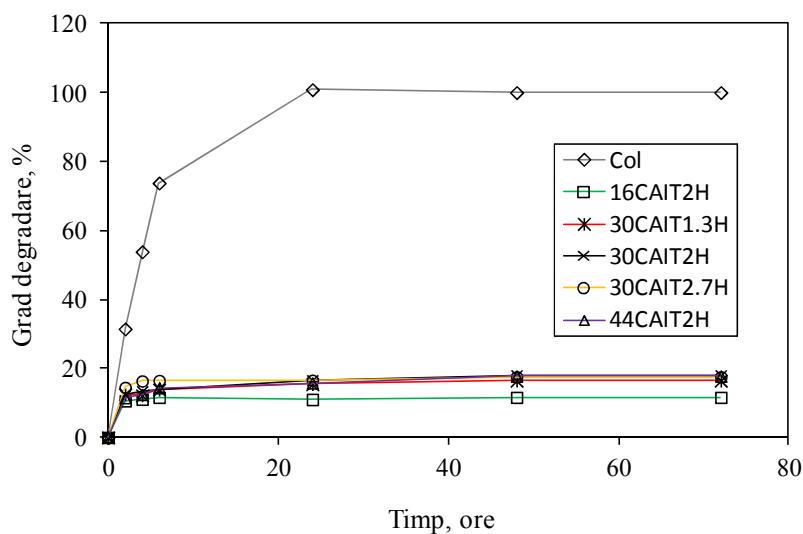


Figura V.25. Curbele cinetice de degradare pentru collagenul pur și hidrogelurile pe bază de CAIT și pHEMA

V.3.5. Analiza termogravimetrică

Figura V.26 ilustrează termogramele înregistrate pentru hidrogelurile 16CAIT2H și 44CAIT2H și indică existența a trei etape de degradare termică, precum și în cazul IPN-urilor pe bază de CAM și pHEMA.

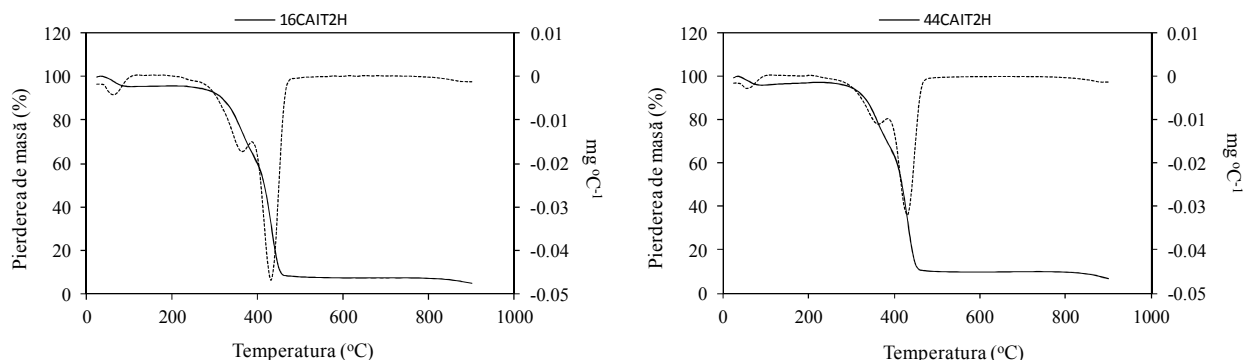


Figura V.26. Termogramele înregistrate pentru hidrogelurile 16CAIT2H și 44CAIT2H

Hidrogelurile constituite din CAIT și pHEMA au o stabilitate termică mai mare decât collagenul pur (259 °C) sau funcționalizat cu AIT (280 °C), efect datorat prezenței polimerului sintetic în structura IPN-urilor. Temperatura de degradare termică crește până la 313 °C în cazul hidrogelului cu cea mai mare concentrație de pHEMA (16CAIT2H) și până la 296 °C în cazul hidrogelului 44CAIT2H. Temperatura maximă de degradare (T_{peak}) pentru ambele IPN-uri analizate este de aproximativ 360 °C.

Principalele caracteristici termogravimetrice observate în termogramele înregistrate pentru hidrogelurile 16CAIT2H și 44CAIT2H sunt prezentate în Tabelul V.12.

Tabel V.12. Principalii parametri termogravimetrice înregistrați pentru IPN-urile 16CAIT2H și 44CAIT2H

Proba	Stadii ale degradării termice	T_{Onset} (°C)	T_{Peak} (°C)	T_{Endset} (°C)	W (%)	M_{Resid} (%)
16CAIT2H	I	51	64	88	5,0	6,8
	II	313	360	399	37,5	
	III	399	427	447	50,7	
44CAIT2H	I	42	60	76	4,1	8,1
	II	296	356	399	34,3	
	III	400	424	448	53,5	

Pierderile procentuale de masă datorate tratamentului termic (M_{Resid} , %) la 448 °C au fost de 93,2 % pentru 16CAIT2H și de 91,9 % pentru 44CAIT2H, valori superioare celor obținute pentru collagenul nemodificat, dar inferioare celor înregistrate pentru hidrogelurile pe bază de CAM. Ordinea stabilității termice în funcție de T_{onset} este următoarea:

Col < Col-AIT < 44CAIT2H < 16CAIT2H.

Hidrogelul cu cel mai mare conținut în polimer sintetic (16CAIT2H) este cu 17 °C mai stabil la termodegradare decât hidrogelul 44CAM2H, fenomen explicat prin gradul mare de substituție obținut în cazul modificării collagenului cu AIT, numărul de grupe funcționale ce pot participa la reacții de grefare-reticulare cu HEMA fiind superior.

V.3.6. Analiza morfologică

Morfologia secțiunii hidrogelului 30CAIT2H a fost studiată și imaginile SEM înregistrate pot fi vizualizate în Figura V.27.

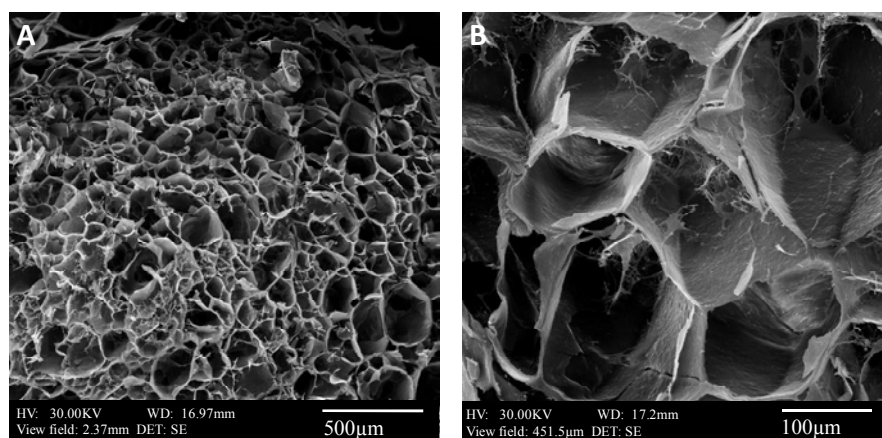


Figura V.27. Imagini SEM pentru hidrogelul 30CAIT2H la diferite magnitudini de vizualizare: 500 μm (A) și 100 μm (B)

Structura poroasă a collagenului modificat cu AIT a fost menținută după reacția de copolimerizare cu pHEMA. Microstructura hidrogelurilor a suferit însă modificări. Diametrul porilor este cuprins între 50 – 200 μm, iar distribuția și forma acestora este mai uniformă. Dimensiunea adecvată a porilor unei matrici utilizate în ingineria tisulară este cuprinsă între 100-200 μm [205], aceste dimensiuni facilitând proliferarea celulară în interiorul spațiilor interstițiale.

Având în vedere acest aspect, putem considera hidogelurile obținute ca fiind recomandate pentru utilizarea în ingineria tisulară.

V.3.7. Analiza *in vitro* a capacității de adeziune

Rezultatele experimentale obținute pentru măsurarea lucrului mecanic de adeziune și al forței maxime de detașare pentru hidrogelurile pe bază de CAIT și HEMA, precum și pentru collagenul pur și modificat (Col-AIT, 1:3 g g⁻¹) sunt prezentate în Figura V.28.

Valorile obținute în urma testului de evaluare a adeziunii arată o creștere semnificativă a acestora în cazul collagenului modificat (Col:AIT, 1:3 g g⁻¹) față de collagenul pur, probabil datorită grupărilor carboxilice nou apărute. Ambele eșantioane au aderat cu ușurință la suprafața

test datorită gradului mare de retenție de soluție apoasă și a grupărilor funcționale ce pot forma legături de hidrogen cu substratul.

Un alt aspect important de remarcat este faptul că pHEMA are o influență directă asupra caracteristicilor principale ce definesc proprietățile adezive ale IPN-urilor obținute, însă nu se constată o corelare între raportul collagen/HEMA și valorile medii pentru lucrul mecanic și forța maximă de detașare. Valorile determinate pentru MDF și TWA scad în prezența polimerului sintetic [206, 207] și se încadrează în limitele recomandate pentru materialele utilizate ca pansamente pentru vindecarea rănilor.

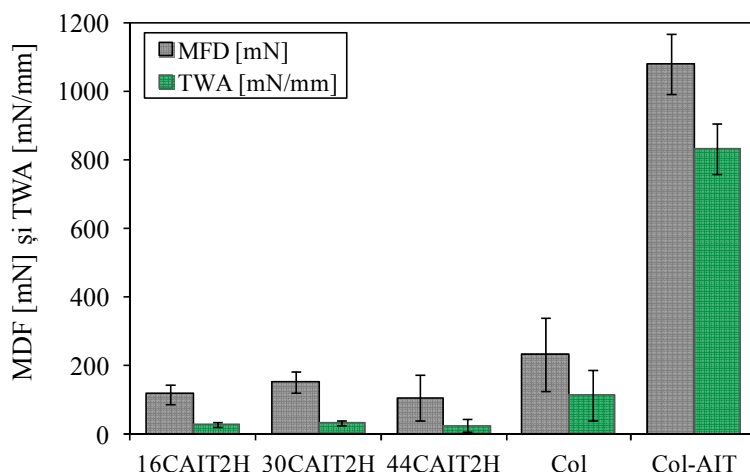


Figura V.28. Valorile medii MDF [mN] și TWA [mN/mm] pentru hidrogelurile pe bază de CAIT și HEMA, collagen și Col-AIT; (barele reprezintă deviația standard, n = 4)

V.3.8. Analiza rezultatelor privind încărcarea/eliberarea de Ibuprofen

În vederea evaluării funcției de suport pentru înglobare și eliberare de principii active a IPN-urilor pe bază de CAIT și HEMA s-a utilizat același procedeu de încărcare/eliberare precum și același tip de principiu activ. Curbele cinetice ale eliberării medicamentului sunt reprezentate în Figurile V.29 și V.30.

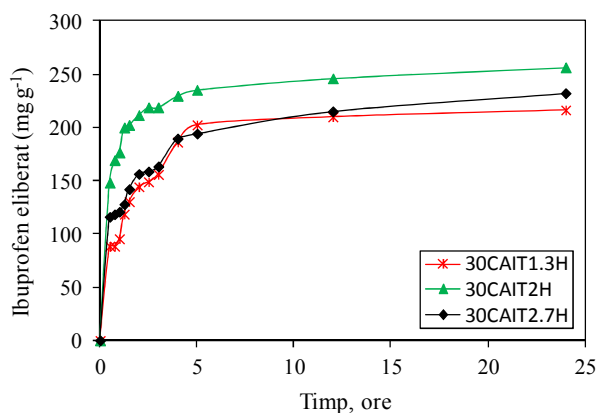


Figura V.29. Curbele cinetice de eliberare a Ibuprofenului pentru IPN-urile cu raport constant CAIT/HEMA

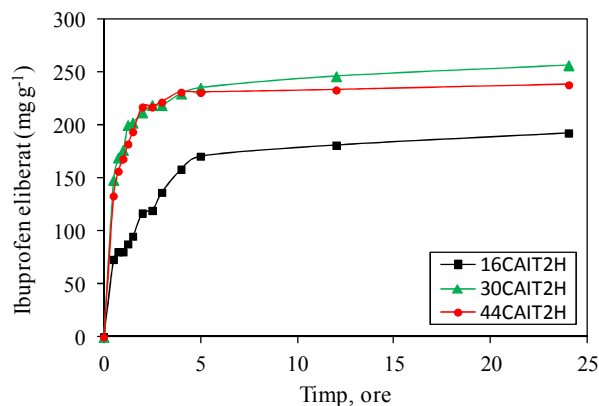


Figura V.30. Curbele cinetice de eliberare a Ibuprofenului pentru IPN-urile cu concentrație constantă de APS

Analizând curbele cinetice de eliberare s-a constatat că în primul interval de timp (aproximativ 5 ore) s-a înregistrat o creștere rapidă a cantității de medicament eliberat. În următorul interval de timp s-a înregistrat o eliberare mai lentă. Acest fenomen este explicat prin faptul că medicamentul difuzează într-o primă fază din straturile superficiale ale materialului, respectiv din porii acestuia, iar mai apoi, din ochiurile rețelei interpenetrare.

Cantitatea de medicament eliberată este în concordanță cu gradul de retenție al IPN-urilor (Tabelul V.7); astfel hidrogelurile 44CAIT2H, respectiv 30CAIT2H eliberează cele mai mari cantități de Ibuprofen în interval de 25 ore.

V.4. IPN-uri pe bază de collagen modificat cu ACIT sau ADMA și pHEMA

V.4.1. Analiza *in vitro* a adezivității

În scopul investigării influenței anumitor parametri, precum agentul de funcționalizare și pH-ul reacției de funcționalizare, asupra caracteristicilor de adeziune a materialelor collagenice modificate și a IPN-urilor, s-au luat în considerare următoarele aspecte:

- utilizarea anhidridei citraconice și anhidridei dimetilmaleice ca agenți de funcționalizare; raportul collagen/anhidridă a fost 1:3 g g⁻¹.
- ajustarea pH-ului reacției de funcționalizare la 8, respectiv 9.
- studierea IPN-urilor cu raport similar collagen/HEMA (% Col/HEMA, 30/70) și concentrație asemănătoare de APS (2 %).

În Tabelul V.13. este ilustrată terminologia materialelor obținute pentru acest studiu, precum și condițiile de obținere.

Tabelul V.13. Terminologia materialelor obținute și condițiile de preparare

Collagen modificat			IPN-uri				
Terminologie	Agent funcționalizare	pH	Terminologie	Agent funcționalizare	pH	Col/HEMA	APS (%)
CACIT8	ACIT	8	CACITH8	ACIT	8	30/70	2
CACIT9	ACIT	9	CACITH9	ACIT	9	30/70	2
CADM8	ADMA	8	CADMH8	ADMA	8	30/70	2
CADM9	ADMA	9	CADMH9	ADMA	9	30/70	2

Rezultatele experimentale privind deformația elastică a IPN-urilor pe bază de collagen modificat (la pH = 8 și 9) cu ACIT și ADMA, în comparație cu collagenul modificat cu ACIT și ADMA la pH = 8 și 9 sunt prezentate în Figura V.31.

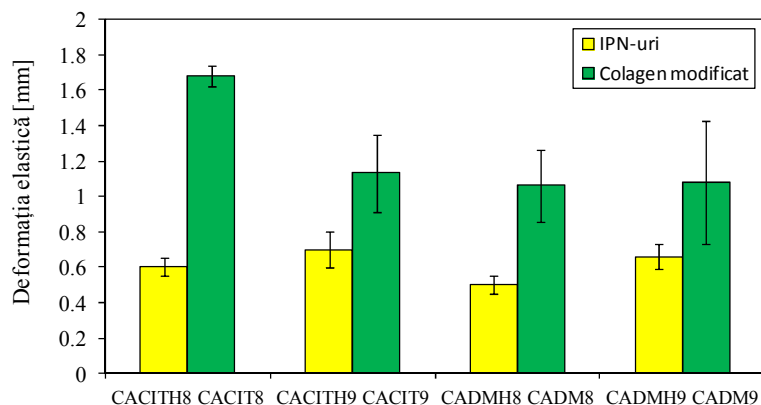


Figura V.31. Valorile medii ale deformației elastice pentru IPN-urile pe bază de collagen modificat cu ACIT și ADMA (pH = 8 – 9) în comparație cu collagenul modificat cu ACIT și ADMA (pH = 8 – 9)

În general, hidrogelurile prezintă o deformație elastică mai redusă față de a collagenelor modificate din care au derivat, efect pus pe seama morfologiei rețelei IPN și contribuției componentei sintetice la stabilizarea structurii tridimensionale. Rezultatele testelor au arătat că deformația elastică a IPN-urilor este dependentă de cantitatea de agent de funcționalizare fixată (reglată prin valoarea pH-ului reacției de funcționalizare a collagenului) și mai puțin influențată de tipul agentului de funcționalizare. Astfel, IPN-urile CACITH9 și CADMH9 se deformează într-o măsură mai mare decât cele obținute din collagen funcționalizat la pH 8.

În Figura V.32. sunt prezentate valorile medii ale forței maxime de detașare necesară ruperii contactului dintre suprafața test și hidrogelurile, respectiv colagenele studiate.

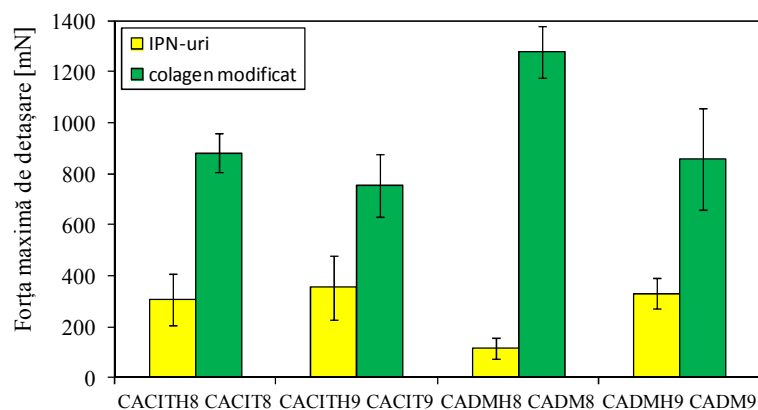


Figura V.32. Valorile medii ale forței maxime de detașare pentru IPN-urile pe bază de collagen modificat cu ACIT și ADMA (pH = 8 – 9) în comparație cu collagenul modificat cu ACIT și ADMA (pH = 8 – 9)

Din datele obținute se observă că utilizarea ADMA ca agent de funcționalizare conduce la creșterea capacității de adeziune a collagenului modificat, față de utilizarea ACIT. Acest fapt este corelat cu gradul de substituție, în cazul modificării cu ADMA (Col:ADMA, 1:3 g g⁻¹) fiind de 3,8 %, iar în cazul modificării cu ACIT (Col:ACIT, 1:3 g g⁻¹) fiind de 2,5 %. Cu creșterea gradului de substituție se formează situsuri noi de legare a lanțurilor de pHEMA, ceea ce conduce la IPN-uri cu densitate de reticulare mai mare, respectiv cu capacitate de retenție scăzută. Aceasta ar putea fi explicația pentru capacitatea redusă de adeziune a hidrogelurilor CADMH8 și CADMH9. De asemenea, la pH de funcționalizare 8 forța maximă de detașare este mai mică în comparație cu forța de detașare necesară IPN-urilor pe bază de collagen funcționalizat la pH 9.

În graficul din Figura V.33 sunt prezentate valorile medii ale lucrului mecanic de adeziune al collagenelor și IPN-urilor studiate.

Rezultatele testelor au arătat că adeziunea rețelelor IPN este dependentă de pH-ul reacției de funcționalizare a collagenului, de forța aplicată și de timpul de contact între hidrogel și substratul de testare. În urma analizei datelor rezultate s-a constatat că forța maximă de detașare, lucrul mecanic și deformația elastică prezintă valori superioare în cazul collagenului modificat, față de hidrogeluri, indiferent de agentul de funcționalizare sau de pH-ul reacției de funcționalizare. Acest lucru este explicat prin numărul de grupări COOH nou formate.

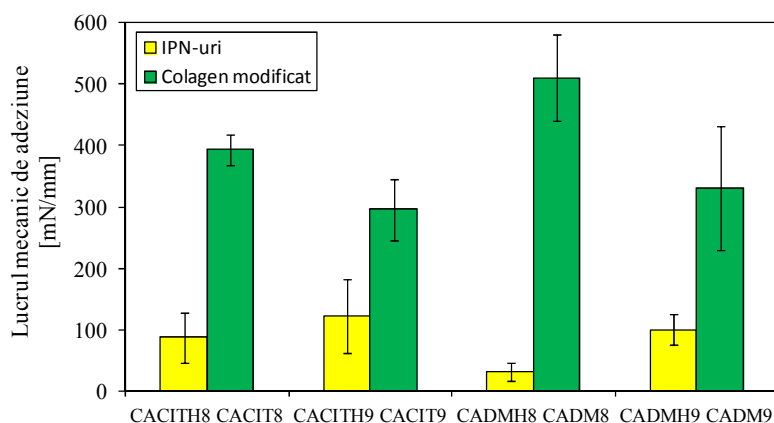


Figura V.33. Valorile medii ale lucrului mecanic de adeziune pentru IPN-urile pe bază de collagen modificat cu ACIT și ADMA (pH = 8 – 9) în comparație cu collagenul modificat cu ACIT și ADMA (pH = 8 – 9)

V.5. Studii de biocompatibilitate asupra IPN-urilor pe bază de collagen modificat și pHEMA

Biocompatibilitatea este unul din factorii care controlează performanța generală a unui produs utilizat în ingineria tisulară. Cea mai importantă caracteristică ce face diferența dintre un biomaterial și orice alt material este capacitatea acestuia de a coexista în contact cu organismul viu, fără a provoca nici o reacție adversă.

În cazul suporturilor tridimensionale utilizate în ingineria tisulară, biocompatibilitatea reprezintă capacitatea acestora de a se comporta ca un substrat, cu proprietăți optime pentru activitatea celulară, cu scopul de a favoriza regenerarea tisulară fără a provoca răspuns advers din partea țesutului gazdă.

Evaluarea citotoxicității și a viabilității celulare joacă un rol fundamental în studiile de biocompatibilitate, în unele cazuri fiind scopul principal al experimentelor.

Testele *in vitro* de determinare a citotoxicității unui material din culturi celulare se efectuează de obicei pe o perioadă de incubație predefinită. Datorită sensibilității ridicate a celulelor utilizate în aceste studii rezultatele obținute pot furniza informații cu privire la eliberarea unor compuși citotoxici din structura materialului analizat, compuși ce pot influența negativ atașarea și proliferarea celulară.

Viabilitatea celulară este deseori echivalentă cu numărul de celule sănătoase, viabile din culturile efectuate pe materialul de analiză. Adeseori, aceeași metodă de determinare a

viabilității celulare este repetată pe o perioadă de timp pre-determinată, cu rolul de a investiga proliferarea celulară din cadrul unei populații. Cea mai utilizată metodă de determinare a viabilității celulare este testul MTS ((3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazoliu), MTS).

V.5.1. Studii *in vitro* în culturi celulare – evaluarea citotoxicității

Având o perspectivă de ansamblu a proprietăților fizico-chimice asupra IPN-urilor obținute, s-a considerat esențial studiul biocompatibilității acestora. În acest scop, s-a evaluat în primul rând citotoxicitatea hidrogelurilor pe bază de collagen modificat cu AM sau AIT și pHEMA printr-o metodă indirectă. Astfel, hidrogelurile au fost sterilizate în amestec apă-etanol (30:70) pentru 30 secunde și spălate în mediu de cultură complet timp de 4 zile, timp în care acesta a fost schimbat de 3 ori pe zi. Probele au fost apoi imersate în mediul de cultură peste care s-au adăugat celule endoteliale prelevate din derm uman (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, HDMEC). La diferite intervale de timp (24, 48, 72, 168 ore), probele au fost îndepărtate, celulele din supernatant s-au marcat cu calceină AM și au fost vizualizate prin intermediul microscopului cu lampă fluorescentă.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile V.34 - V.35. Ca referință s-au utilizat suporturi standard pentru culturi celulare, în care s-au cultivat și marcat celule în mod similar. Testul reprezintă o metodă de investigare a structurii și morfologiei celulelor puse în contact cu mediul în care se află materialele preparate.

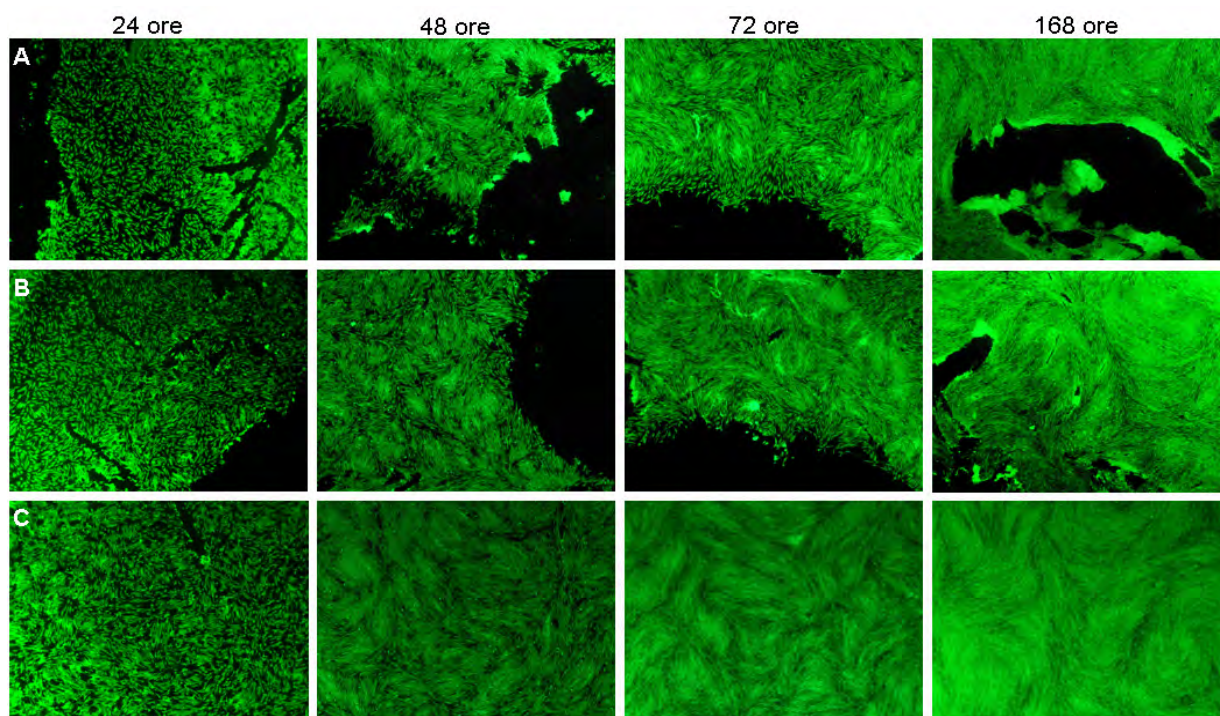


Figura V.34. Imagini de microscopie de fluorescență ale celulelor marcate cu calceină AM, în supernatant colectat de la hidrogelurile 16CAM2H (A), 44CAM2H (B) și de la control (C) la diferite intervale de timp de cultivare

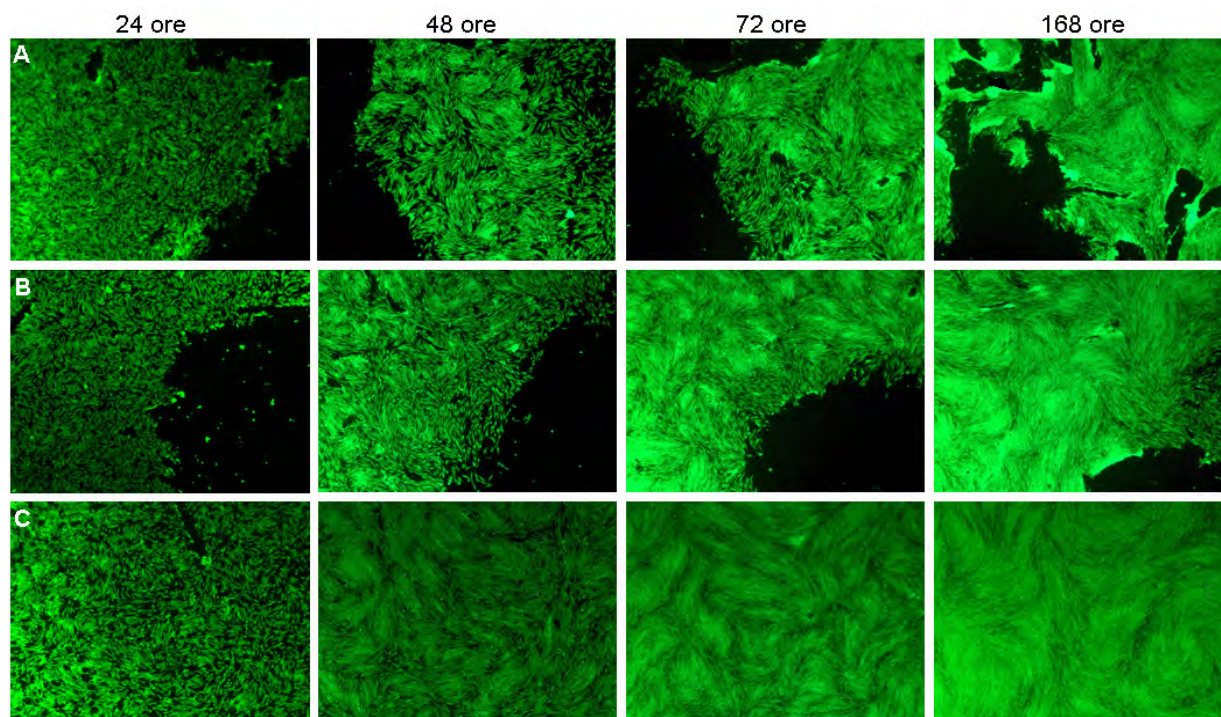


Figura V.35. Imagini de microscopie de fluorescență ale celulelor marcate cu calceină AM, în supernatant colectat de la hidrogelurile 16CAIT2H (A), 44CAIT2H (B) și de la control (C) la diferite intervale de timp de cultivare

Rezultatele obținute oferă informații cu privire la posibila difuzie a unor compuși toxici din probă în mediul de cultură. Testele efectuate din punct de vedere al interacțiunii cu mediul biologic au arătat faptul că hidrogelurile constituite pe bază de collagen funcționalizat cu AM sau AIT și pHEMA nu manifestă efecte citotoxice, celulele fiind stimulate să prolifereze în prezența acestor materiale, cu precădere în cazul IPN-urilor cu concentrația cea mai mare de collagen (Figura V.34B și Figura V.35B).

V.5.2. Analiza rezultatelor privind viabilitatea celulară în contact cu IPN-urile obținute

Următorul pas după investigarea citotoxicității a fost cuantificarea viabilității celulare. Testul de viabilitate celulară a constat în evaluarea stării funcționale și a capacității de proliferare a celulelor aflate în contact direct cu IPN-urile. Pentru acest test s-au utilizat celule HDMEC și ca reactiv, sarea de tetrazoliu (MTS). Aceasta este redusă de către celulele viabile, prin intermediul mitocondriilor, la un produs colorat numit formazan, care este solubil în mediul de cultură. Cantitatea de formazan produsă este măsurată spectofotometric la 492 nm, iar concentrația de formazan este direct proporțională cu numărul de celule viabile din culturile de celule. Ca referință s-a utilizat un control pentru fiecare interval de timp. Pentru control celulele au fost cultivate în godeuri goale în condiții similare cu probele studiate.

În Figura V.36 sunt prezentate imaginile înregistrate prin microscopie de fluorescență pentru hidrogelurile 44CAIT2H și 30CAIT2H în prezența HDMEC, la diferite intervale de timp.

Din analiza imaginilor obținute se constată că celulele aderă și proliferază în interiorul probelor, iar morfologia acestora nu suferă modificări.

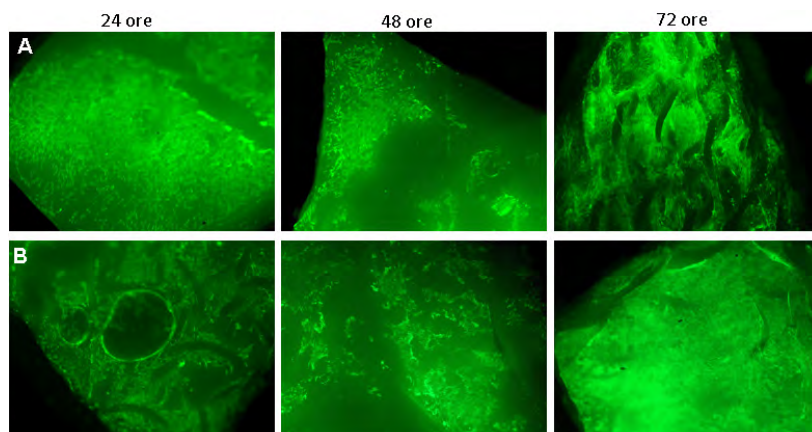


Figura V.36. Imagini de microscopie de fluorescență ale IPN-urilor 44CAIT2H (A) și 30CAIT2H (B) la 24, 48 și 72 de ore după cultivarea HDMEC

În Figura V.37 este prezentată histograma privind densitatea optică, la 492 nm, a mediului rezultat ca urmare a interacțiunii celulelor cu hidrogelurile pe bază de collagen modificat cu AIT și pHEMA, comparativ cu controlul.

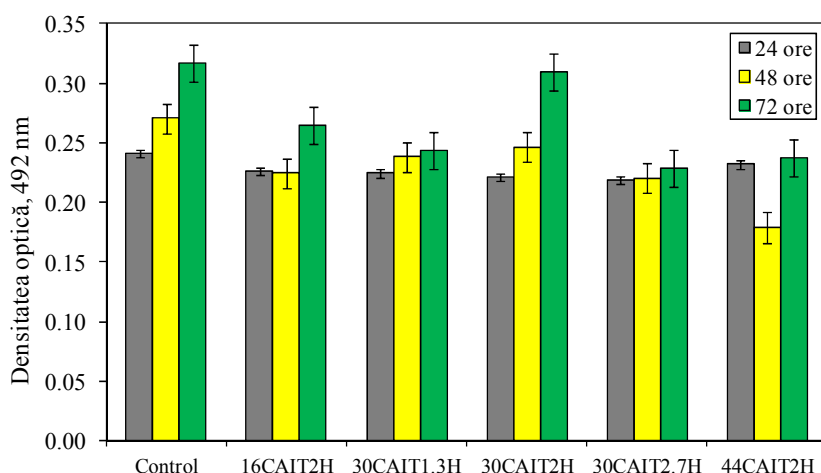


Figura V.37. Viabilitatea celulară a hidrogelurilor pe bază de CAIT și pHEMA

Din analiza rezultatelor obținute se remarcă un prim aspect important, acela că față de proba control se constată aproximativ aceeași viabilitate celulară (76 – 97 %), deci IPN-urile nu sunt toxice. O a doua observație este că, în general, crește viabilitatea celulară în timp, ceea ce semnifică faptul că celulele aderă și proliferază în interiorul materialului.

V.5.3. Vizualizarea celulelor viabile prin Microscopie confocală cu baleiaj laser

Pentru vizualizarea celulelor viabile prin microscopie confocală s-au utilizat anticorpi și markeri fluorescenți ce produc o colorație verde a citoscheletului celular, o colorație roșie a filamentelor de actină, în timp ce nucleii prezintă o colorație albastră. Imaginile de microscopie

confocală pentru hidrogelurile 44CAIT2H, 30CAIT2.7H și 16CAIT2H după 168 ore de cultură cu HDMEC sunt prezentate în Figura V.38.

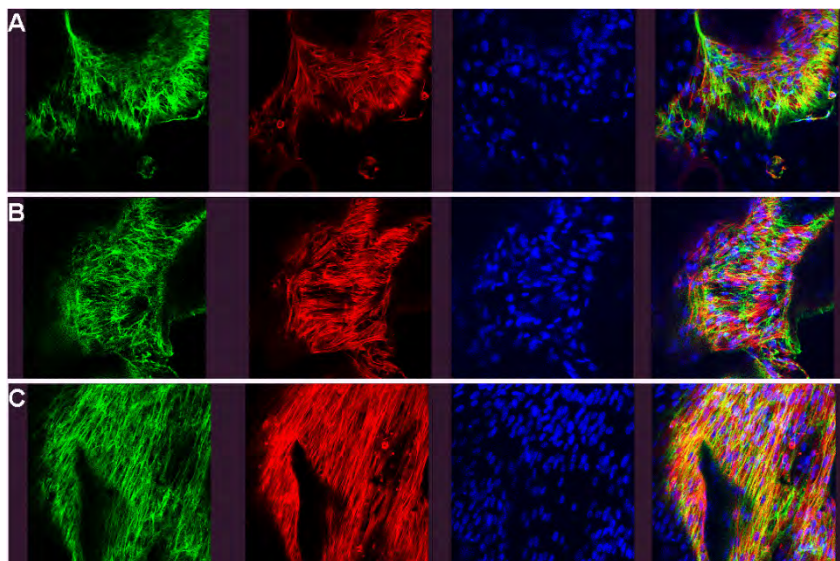


Figura V.38. Imagini de microscopie confocală pentru IPN-urile 16CAIT2H (A), 30CAIT2.7H (B) și 44CAIT2H (C) la 168 ore de la cultivarea celulelor HDMEC

Pe lângă faptul că viabilitatea celulară este mare, se poate observa din imaginile obținute că nucleii celulelor HDMEC au o formă rotundă, nealterată, iar citoscheletul și filamentele de actină s-au dezvoltat aproape uniform în matricea IPN-urilor. Acest lucru semnifică faptul că materialele obținute au capacitatea de a susține și de a favoriza aderarea și proliferarea celulelor.

Prin prisma conceptelor de biocompatibilitate se poate afirma despre IPN-urile sintetizate că sunt biocompatibile [210] și nu vor determina fenomene de respingere de către organism.

V.6. Concluzii

1. S-au obținut rețele semi-IPN pornind de la collagenul modificat cu anhidride și polimerizarea grupei funcționale duble atașate la biopolimer cu HEMA, în prezența unui sistem inițiator (APS, TEMED). Pentru optimizarea compoziției s-a utilizat un program experimental în care au fost variați doi parametri – raportul precursor collagenic/HEMA, respectiv concentrația de inițiator radicalic. Funcția scop urmărită a constituit-o compoziția în collagen a rețelelor obținute, gradul lor de degradare în prezența collagenazei precum și comportamentul față de soluții apoase (exprimat ca grad de reținere a apei).

2. Spectroscopia FTIR-ATR a relevat realizarea grefării collagenului cu pHEMA. Creșterea concentrației de monomer în structura hidrogelurilor este corelată cu scăderea intensității picurilor corespunzătoare amidelor I și II.

3. S-a studiat timpul de percolație pe parcursul fenomenului de co-polimerizare a collagenului modificat și HEMA. S-a constatat că t_{gel} apare, în general, în mai puțin de 3 minute pentru IPN-urile analizate și acest parametru este influențat de distanța dintre lanțurile

moleculare ale collagenului. Valoarea de platou a modulului G' crește cu creșterea concentrației de biopolimer în compoziția IPN-urilor și scade cu creșterea concentrației de inițiator.

4. Analiza elementală a evidențiat creșterea conținutului de collagen în structura IPN-urilor, odată cu creșterea raportului collagen modificat/HEMA. Concentrația inițiatorului modifică doar în limite restrânse compoziția rețelei semi-IPN obținute.

5. Gradul de degradare al IPN-urilor în prezența collagenazei este semnificativ redus și este influențat de concentrația de collagen din compoziția acestora. Hidrogelurile nu sunt complet degradate de către enzime, iar morfologia lor evoluează către o structură compactă, densă.

6. IPN-urile preparate au capacitatea de a reține cantități mari de soluții apoase în condiții fiziologice. Interacțiunea IPN-urilor cu fluide apoase este dependentă de compoziția acestora: creșterea conținutului de APS și implicit de HEMA prin crearea de situsuri noi de legare la suport determină o creștere a hidrofiliei hidrogelului.

7. Analiza termică confirmă creșterea stabilității termice a IPN-urilor cu aproximativ 30-40 °C în comparație cu caracteristicile termice ale collagenului pur și modificat. De asemenea, hidrogelurile cu concentrația cea mai mare de pHEMA sunt cele mai stabile la degradare termică.

8. Mecanismul de încorporare a Ibuprofenului în matricile obținute a fost unul fizic. Cinetica de eliberare a medicamentului este controlată de difuzia soluției tampon în structura IPN-urilor. Cantitatea cea mai mare de medicament se eliberează în aproximativ 5 ore, în următorul interval de timp eliberarea fiind mai lentă, fenomen explicat prin faptul că medicamentul difuzează într-o primă fază din straturile superficiale ale materialului, iar mai apoi din ochiurile rețelei.

9. Din punct de vedere morfologic, IPN-urile au o structură tip macrogel, cu pori intercomunicabili și cu dimensiuni mai mici decât în cazul collagenului pur.

10. Proprietăților de adezivitate ale IPN-urilor sunt mai scăzute comparativ cu cele ale collagenului modificat, ca urmare a prezenței polimerului sintetic în structura acestora. S-au efectuat studii de încărcare și eliberare de principii active (Ibuprofen) în și din hidrogelurile preparate. Eliberarea Ibuprofenului înglobat în structura hidrogelurilor se face într-un interval de până la 25 ore și cinetica de eliberare este controlată de difuzia soluției tampon în structura IPN-urilor.

11. Testele de citotoxicitate și studiile de viabilitate celulară au evidențiat faptul că materialele obținute nu sunt citotoxice și, mai mult decât atât, au capacitatea de a susține și de a favoriza aderarea și proliferarea celulelor HDMEC. Imaginile de microscopie confocală au relevat faptul că celulele se dezvoltă în interiorul materialelor fără a suferi modificări morfologice și structurale.

CONCLUZII GENERALE

Încadrându-se în preocupările privind valorificarea superioară a proprietăților polimerilor naturali, cercetarea întreprinsă și-a propus să aducă contribuții în domeniul realizării de noi biomateriale cu componentă collagenică (colagen, gelatină) cu aplicații în tratamentul arsurilor cutanate, studiile efectuate permițând sistematizarea următoarelor concluzii generale:

1. Datorită biocompatibilității și biodegradabilității excelente, a structurii bine definite, a caracteristicilor fizico-chimice și biologice unice, collagenul reprezintă unul dintre cele mai utilizate biomateriale. Collagenul este un biopolimer cu caracteristici favorabile pentru utilizarea în regenerarea rapidă a pielii și pentru accelerarea vindecării rănilor. Principalele dezavantaje ale utilizării collagenelor în aplicații biomedicale sunt reprezentate de gradul mare de biodegradabilitate și stabilitatea mecanică scăzută. Aceste neajunsuri pot fi depășite prin multiple metode de procesare raportate în literatura de specialitate, cum sunt: reticularea fizică și chimică, amestecarea cu alți polimeri naturali sau sintetici sau prin încorporarea unor compuși exogeni.

2. Hidrogelurile cu caracter de IPN pot fi utilizate cu succes ca pansamente pentru vindecarea rănilor datorită faptului că sunt flexibile, durabile, antigenice, permeabile pentru vaporii de apă și metaboliți, bioadezive și asigură o acoperire bună a răni, în vederea prevenirii infecțiilor. Hidrogelurile pe bază de polimeri naturali sunt biocompatibile, biodegradabile și asigură suportul pentru activitatea celulară, însă au proprietăți mecanice slabe. Caracteristicile IPN-urilor cu componentă naturală și sintetică se apropie cel mai mult de cerințele aplicațiilor în ingineria tisulară: biocompatibilitate, suport pentru atașarea, creșterea și maturarea celulelor regeneratoare, proprietăți mecanice adecvate, lipsa iritabilității și a reacțiilor adverse, cât și posibilitatea încorporării, transportului și eliberării unor compuși bioactivi.

3. În cadrul lucrării de față s-a studiat funcționalizarea materialelor collagenice cu anhidride ciclice (anhidrida maleică, anhidrida itaconică, anhidrida citraconică și anhidrida dimetilmaleică), reacții care au avut ca efect activarea collagenelor cu compuși cu duble legături, în vederea participării ulterioare la reacții de reticulare-grefare cu monomeri solubili în apă, pentru obținerea de rețele semi-IPN. Funcționalizarea collagenelor s-a realizat prin transformare polimer-analoagă, în sistem omogen, mecanismul de reacție fiind unul de substituție nucleofilă, care decurge prin adiție – eliminare.

4. Modificarea chimică a collagenelor a fost confirmată prin analize spectroscopice (FTIR-ATR și ^1H -RMN) și elementale (cuplaj COT/NOT). Gradul de substituție al collagenelor este determinat de raportul masic biopolimer/anhidridă, precum și de tipul de anhidridă. Gradul de substituție crește cu creșterea raportului masic collagen:anhidridă. În plus, dintre agenții de

acilare utilizați, anhidrida maleică este cea mai reactivă.

5. S-a evaluat comportamentul asociativ al macromoleculelor de collagen pur și modificat prin studii reologice. În soluții diluate ($0,25 - 3 \text{ g L}^{-1}$ în soluție $10^{-1} \text{ M CH}_3\text{COOH}$) s-a constatat creșterea valorii C^* ca urmare a modificării chimice a collagenului. Studiul reologic al soluțiilor concentrate de collagen modificat (10 g L^{-1}) ilustrează un comportament pseudoplastic dominant. Pe domeniul de frecvență ($0,01 - 10 \text{ Hz}$), soluțiile collagenice manifestă un comportamentul predominant elastic. Modificarea chimică a collagenelor cu anhidridă maleică și itaconică a afectat proprietățile mecanice ale proteinei, valorile G' și G'' fiind superioare celor înregistrate pentru collagenul pur. Temperatura de tranziție conformațională este deplasată spre valori mai mari pentru collagenele modificate ca urmare a legăturilor de hidrogen nou formate între moleculele biopolimerului.

6. Stabilitatea termică a collagenului modificat cu anhidridă itaconică este similară cu cea a polimerului pur, în schimb modificarea cu anhidridă maleică conduce la o valoare superioară a temperaturii de degradare (80°C). Temperaturile de denaturare (determinate prin μDSC) corespunzătoare collagenelor modificate cu AM și AIT au fost deplasate în general spre valori mai mari, în timp ce entalpia de denaturare a rămas neschimbată.

7. Morfologia materialelor collagenice obținute a suferit modificări interesante. În toate cazurile, porozitatea materialului liofilizat a crescut, materialul evoluând către un macrogel, dar cu pori deschiși, intercomunicabili. Gelatina modificată prezintă aceleași caracteristici morfologice, cu deosebirea că porii sunt colapsați.

8. S-au obținut hidrogeluri pornind de la collagenul modificat cu anhidride, prin polimerizarea grupei funcționale duble atașate la biopolimer cu HEMA, în prezența unui sistem inițiator (APS, TEMED). Produsul final obținut are un caracter de rețea semi-interpenetrată datorită formării de homopolimer concomitent cu obținerea de lanțuri collagenice reticulate și grefate cu pHEMA.

9. S-a utilizat un program experimental în care au fost variați doi parametri – raportul precursor collagenic/HEMA, respectiv concentrația de inițiator radicalic. Spectroscopia FTIR a relevat realizarea grefării cu p(HEMA). Analiza elementală efectuată asupra rețelelor IPN obținute, a evidențiat creșterea conținutului de collagen în structura IPN-urilor, odată cu creșterea raportului collagen modificat/HEMA. Concentrația inițiatorului nu modifică în mod semnificativ compoziția finală a hidrogelurilor.

10. Gradul de degradare al IPN-urilor în prezența collagenazei este semnificativ redus față de degradarea collagenului pur, iar procesul este ușor influențat de raportul biopolimer/HEMA.

Prezența polimerului sintetic în structura matricilor conduce la creșterea rezistenței acestora la atacul enzimatic. IPN-urile obținute și-au păstrat integritatea structurală și mecanică pe o perioadă mai lungă de timp, procesul de degradare fiind întârziat. Morfologia matricilor evoluează pe parcursul procesului de degradare către o structură compactă și densă.

11. Gradul de retenție a soluțiilor tampon fosfat este dependent de compoziția IPN-urilor: creșterea conținutului de APS și implicit de HEMA prin crearea de situsuri noi de legare la suport determină o creștere a hidrofiliei hidrogelului. Stabilitatea termică a IPN-urilor obținute crește cu aproximativ 30-40 °C față de stabilitatea collagenului pur sau modificat. Prezența pHEMA în structura hidrogelurilor influențează în mod pozitiv rezistența la degradare termică a acestora.

12. S-a studiat capacitatea de înglobare și eliberare a unui medicament antiinflamator (Ibuprofenul) în/din structura hidrogelurilor. Mecanismul de încorporare a fost unul fizic. Eliberarea Ibuprofenului s-a realizat într-un interval de 25 ore, cinetica de eliberare fiind controlată de difuzia soluției tampon în structura IPN-urilor.

13. S-a evaluat *in vitro* capacitatea de adeziune a collagenelor modificate și a IPN-urilor obținute. Prezența polimerului sintetic în structura IPN-urilor conduce la valori mai scăzute ale parametrilor care cuantifică capacitatea de adeziune față de valorile obținute pentru collagenul pur și pentru collagenul funcționalizat. Nu s-a constatat o corelare între raportul collagen/HEMA și valorile medii pentru lucrul mecanic și forța maximă de detașare. Toate eșantioanele au aderat cu ușurință la suprafața test datorită gradului mare de retenție de soluție apoasă și a grupărilor funcționale ce pot forma legături de hidrogen cu substratul.

14. În ceea ce privește deformarea elastică a IPN-urilor obținute, aceasta este mai redusă față de deformarea collagenelor modificate din care au derivat, efect pus pe seama morfologiei rețelei IPN și contribuției componentei sintetice la stabilizarea structurii tridimensionale. Deformarea elastică a IPN-urilor este dependentă de cantitatea de agent de funcționalizare fixată și mai puțin influențată de tipul agentului de funcționalizare.

15. Testele de citotoxicitate și studiile de viabilitate celulară au evidențiat faptul că materialele obținute nu sunt citotoxice și, mai mult decât atât, au capacitatea de a susține și de a favoriza aderarea, proliferarea și maturarea celulelor HDMEC. Rezultatele obținute relevă faptul că celulele se dezvoltă în interiorul materialelor fără a suferi modificări morfologice și structurale. În concluzie, cercetările efectuate au condus la rezultate ce permit afirmarea faptului că hidrogelurile obținute pe bază de collagene funcționalizate cu anhidride ciclice și pHEMA au potențial de utilizare în aplicații biomedicale.

Bibliografie selectivă

- [168] T.F. Spande, B. Witkop. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 24, 1970, Academic Press, New York.
- [169] C. Tangsathakun, et al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds, *J Biomater Sci Polym*, 18:147-163, 2007.
- [170] D.M. Hashim, Y.B. Che Man, R. Norakasha, M. Shuhaimi, Y. Salmah, Z.A. Syahariz. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. *Food Chemistry* 118:856–860, 2010.
- [171] W.W. Graessley. The entanglement concept in polymer rheology. În *Advances in Polymer Science*, 1974, Heidelberg, Springer Berlin.
- [172] **S. Potorac**, M. Popa, D. Le Cerf, L. Picton, V. Dulong, L. Vereștiuc, Conformational changes in collagen modified with maleic and itaconic anhydride, *Biopolymers* (2011) - trimisă spre publicare.
- [173] J.F. Nicoletti, V.R.N. Telis. Viscoelastic and thermal properties of collagen–xanthan gum and collagen–maltodextrin suspensions during heating and cooling. *Food Biophysics*, 4:135–146, 2009.
- [174] S.M. Tosh, A.G. Marangoni. Determination of the maximum gelation temperature in gelatin gels, *Appl Phys Lett*, 84:4242–4244, 2004.
- [175] M.M. Horn, V.C. Amaro Martins, A.M. de Guzzi Plepis. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics, *Carb. Polym.*, 77:239–243, 2009.
- [176] K. Pietrucha. Changes in denaturation and rheological properties of collagen– hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependences. *Int J Biol Macromol*, 36:299–304, 2005.
- [177] A. Pourjavadi, M. Kurdtabar. Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: Synthesis and characteristics. *Eur Polym J.*, 43:877–889, 2007.
- [178] T. Mitra, et al. Preparation and characterization of a thermostable and biodegradable biopolymers using natural cross-linker. *Int J Biol Macromol*. 48:276–285, 2011.
- [179] L. Knott, C.C. Whitehead, R.H. Fleming, A.J. Bailey. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone, *Biochem J.*, 310:1045–1051, 1995.
- [180] I. Idziak, D. Avoce, D. Lessard, D. Gravel, X.X. Zhu. Thermosensitivity of aqueous solutions of poly(N,N-diethylacrylamide). *Macromol.*, 32:1260–3, 1999.
- [181] F. Flandin, C. Buffevant, D. Herbage. A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. *Biochim Biophys Acta*, 791:205–11, 1984.
- [182] L. Benchea, **S. Potorac**, L. Vereștiuc, M. Popa, Hidrogeluri pe bază de gelatină și anhidridă maleică cu potențiale aplicații în tratamentul arsurilor, A XIV - a Conferință Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, 19-22 mai 2011, Iași, România, pg. 207-212, ISBN : 978-606-13-0390-8.
- [183] L. Vereștiuc, M.D. Bucevski, M. State, L. Cismaru, M. Ciobanu, Studii privind realizarea unor materiale compozite pe baza de poliuretan, copolimer stiren-anhidrida maleică și hidrolizate de collagen, sub forma de membrane, *Zilele Academice Iesene*, Editia a XV-a, 2000.
- [184] C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee. Biomedical applications of collagen, *Int J Pharm.*, 221:1-22, 2001.
- [185] **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, D. Le Cerf. New semi-IPN scaffolds based on HEMA and collagen modified with itaconic anhydride, *Mater Lett*, 67(1):95-98, 2012.
- [186] Q. Tang, J-R. Yu, L. Chen, J. Zhu, Z-M. Hu. Preparation and properties of morphology controlled poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/poly(N-vinyl pyrrolidone) double networks for biomedical use. *Curr Appl Phys.*, 10:766–770, 2010.
- [187] D. Horák, H. Hlídová, J. Hradil, M. Lapčiková, M. Šlouf. Superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based scaffolds: Preparation and characterization. *Polymer*. 49:2046–2054, 2008.

- [188] E. Brynda, et al. Surface modification of hydrogels based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) with extracellular matrix proteins. *J Mater Sci: Mater Med.*, 20:909–915, 2009.
- [189] C.J. Doillon, Porous collagen sponge wound dressings in vivo and in vitro studies. *J Biomater Appl.*, 2:562-78, 1988.
- [190] **S. Potorac**, M. Popa, V. Maier, G.Lisa, L. Vereștiuc, New hydrogels based on maleilated collagen with potential applications in tissue engineering, *Materials Science and Engineering, C* – in press - 10.1016/j.msec.2011.10.024.
- [191] T.S. Perova, J.K. Vij, H. Xu. Fourier transform infrared study of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) PHEMA. *Colloid & Polymer Science*, 275(4):323-332, 1997.
- [192] **S. Potorac**, M. Popa, V. Maier, L. Vereștiuc, *New Scaffolds Based on Maleic Anhydride Modified Collagen with Potential Applications in Tissue Engineering*, A 4-a Conferința Internațională “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices”, 23-25 Septembrie 2010, ISSN 2069 – 0193, Sinaia, România.
- [193] **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Natural polymer-based hydrogel prepared by graft-copolymerization of collagen*, A 23-a Conferință Europeană de Biomateriale (ESB 2010), 11-15 Septembrie 2010, Tampere, Finlanda.
- [195] **S. Potorac**, M. Popa, D. Le Cerf, V. Maier, G. Lisa, L. Verestiuc, *Réseaux interpénétrés à base de collagène fonctionnalisés avec des anhydrides cycliques - Etude comparative*, Xème Colloque Franco - Roumain sur les Polymères, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța. pg. 207-210.
- [197] L. Zhang, K. Li, L. Zheng, Y. Xiao, H. Fan, X. Zhang, *Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro*. *Carb. Polym.* 84:118–125, 2011.
- [198] Q. Lu, K. Ganesan, D.T. Simionescu, N.R. Vyavahare, *Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering*. *Biomaterials*, 25:5227–5237, 2004.
- [199] N. Davidenko, J.J. Campbell, E.S. Thian, C.J. Watson, R.E. Cameron, *Collagen–hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering*. *Acta Biomater.*, 6:3957–3968, 2010.
- [200] N. Salamat-Miller, M. Chittchang, T.P. Johnston. *The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery*. *Adv Drug Deliver Rev.*, 57:1666– 1691, 2005.
- [201] J.W. Lee, J.H. Park, J.R. Robinson. Bioadhesive based dosage forms: the next generation, *J Pharm Sci.*, 89:850-866, 2000.
- [202] M.I. Ugwoke, N. Verbeke, R. Kinget. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery, *J Pharm Pharmacol.*, 53:3-22, 2001.
- [203] C. Tang, C. Yin, Y. Pei, M. Zhang, L. Wu. *New superporous hydrogels composites based on aqueous Carbopol® solution (SPHCs): synthesis, characterization and in vitro bioadhesive force studies*. *Eur Polym J.*, 41:557–562, 2005.
- [204] **S. Potorac**, M. Popa, D. Le Cerf, V. Maier, G. Lisa, L. Verestiuc, *Réseaux interpénétrés à base de collagène fonctionnalisés avec des anhydrides cycliques - Etude comparative*, Xème Colloque Franco - Roumain sur les Polymères, 6-8 Septembrie 2011, Douai, Franța.
- [205] T.M. Freyman, I.V. Yannas, L.J. Gibson. *Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering*. *Progr Mater Sci.*, 46:273–82, 2001.
- [206] **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Porous Hydrogels Based on Itaconic Anhydride Modified Collagen/HEMA for Skin Tissue Engineering*, IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB 2011), 24-26 Noiembrie, 2011, Iași, România – in press.
- [207] **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Porous Hydrogels Based on Itaconic Anhydride Modified Collagen/HEMA for Skin Tissue Engineering*, International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB 2011), 24-26 Noiembrie, 2011, Iași, România.
- [210] S.T. Li, S.J. Archibald, C. Krarup. *Biotechnology and Polymers*. Plenum Press, New York, 1991.

Diseminarea rezultatelor obținute

Lucrări acceptate sau trimise spre publicare la reviste cu factor de impact:

1. **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, D. Le Cerf, *New semi-IPN scaffolds based on HEMA and collagen modified with itaconic anhydride*, Materials Letters, 67(1):95-98, 2012.
2. **S. Potorac**, M. Popa, V. Maier, G.Lisa, L. Vereștiuc, *New hydrogels based on maleilated collagen with potential applications in tissue engineering*, Materials Science and Engineering, C, *in press* - 10.1016/j.msec.2011.10.024.
3. **S. Potorac**, M. Popa, D. Le Cerf, L. Picton, V. Dulong, L. Vereștiuc, *Conformational changes in collagen modified with maleic and itaconic anhydride*, Biopolymers (2011) - trimisă spre publicare.

Lucrări acceptate spre publicare în volume ale conferințelor indexate ISI:

1. **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Porous Hydrogels Based on Itaconic Anhydride Modified Collagen/HEMA for Skin Tissue Engineering*, IEEE International Conference on E-health and Bioengineering (EHB 2011), 24-26 noiembrie 2011, Iași, România – *in press*.

Lucrări publicate în volume ale altor conferințe:

1. L. Benchea, **S. Potorac**, L. Vereștiuc, M. Popa, *Hidrogeluri pe bază de gelatină și anhidridă maleică cu potențiale aplicații în tratamentul arsurilor*, A XIV - a Conferință Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, 19-22 mai 2011, Iași, România, pg. 207-212, ISBN : 978-606-13-0390-8.
2. **S. Potorac**, M. Popa, D. Le Cerf, V. Maier, G. Lisa, L. Verestiuc, *Réseaux interpénétrés à base de collagène fonctionnalisés avec des anhydrides cycliques - Etude comparative*, X-ème Colloque Franco - Roumain sur les Polymères, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța, pg. 207-210.

Lucrări comunicate la Manifestări Științifice Internaționale:

1. **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Synthesis and Characterization of Natural-Based Hydrogel Prepared by Graft Co-polymerization of Collagen*, A XVI-a Editie a "Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering" (RICCCE XVI), 9-12 septembrie 2009, Sinaia, România.
2. **S. Potorac**, M. Popa, V. Maier, L. Vereștiuc, *New Scaffolds Based on Maleic Anhydride Modified Collagen with Potential Applications in Tissue Engineering*, A 4-a Conferința Internațională "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices" (BiomMedD'2010), 23-25 septembrie 2010, Sinaia, România, ISSN 2069 – 0193.
3. **S. Potorac**, M. Popa, L. Verestiuc, *Natural polymer-based hydrogel prepared by graft co-polymerization of collagen*, A 23-a Conferința Europeană de Biomateriale, (ESB 2010), 11-15 septembrie 2010, Tampere, Finlanda.

4. **S. Potorac**, M. Popa, D. Le Cerf, V. Maier, G. Lisa, L. Vereștiuc, *Réseaux interpénétrés à base de collagène fonctionnalisés avec des anhydrides cycliques - Etude comparative*, Xème Colloque Franco - Roumain sur les Polymères, 6-8 septembrie 2011, Douai, Franța.

5. **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Porous Hydrogels Based on Itaconic Anhydride Modified Collagen/HEMA for Skin Tissue Engineering*, IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB 2011), 24-26 noiembrie, 2011, Iași, România – acceptată pentru prezentare.

Lucrări comunicate la Manifestări Științifice Naționale:

1. **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Synthesis and Characterization of a New Hydrogel Prepared by Graft Copolymerization of Collagen*, A XXII-a Sesiune de Comunicări Științifice "Progrese în știința compușilor organici și macromoleculari", Zilele Academice Iesene, 8-10 octombrie 2009, Iași, România.

2. **S. Potorac**, M. Popa, L. Vereștiuc, *Hidrogeluri pe Baza de Colagen Funcționalizat cu Acid Acrilic și poli(HEMA) cu Aplicații Biomedicale*, A VII-a Ediție a Simpozionului Național de Biomateriale "Biomateriale și Aplicații Medico-Chirurgicale", 21-22 octombrie 2009, București, România.

3. L. Benchea, **S. Potorac**, L. Vereștiuc, M. Popa, *Hidrogeluri pe bază de gelatină și anhidridă maleică cu potențiale aplicații în tratamentul arsurilor*, A XIV - a Conferință Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, 19-22 mai 2011, Iași, România.

Premii obținute la Manifestări Științifice:

1. Premiul „Rudolfs Cimdins Travel award” obținut la a 23-a Conferința Europeană de Biomateriale, (ESB 2010), 11-15 septembrie 2010, Tampere, Finlanda.

2. Premiul II la secțiunea *Postere* pentru lucrarea *Hidrogeluri pe bază de gelatină și anhidridă maleică cu potențiale aplicații în tratamentul arsurilor*, prezentată la Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, 19-22 mai 2011, Iași, România.

Membru în echipe ale contractelor de cercetare:

1. CNCSIS Project ID - 995: Researches in the Field of Polymeric Matrices Design for Sensitive Structures, Ministerul Educației și Cercetării, Romania, PN-II-ID-PCE-2008-2009-2011.