



Polymères
Biopolymères
Surfaces
UMR 6270

UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” IAȘI

Școala doctorală a Facultății de Inginerie chimică și Protecția Mediului

UNIVERSITEA ROUEN, FRANȚA

~Teză în cotutelă~

HIDROGELURI PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A PIELII

- TEZĂ DE DOCTORAT -

Coordonatori științifici:

Prof.univ.dr.ing.dr.h.c. Marcel POPA

Prof.dr. Luc PICTON

Doctorand: Bioinginer Raluca VULPE

IAȘI, 2016

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de **3 iunie 2016** la ora **11:00** în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecție a Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

"HIDROGELURI PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A PIELII"

elaborată de domnișoara **bionginer Raluca Vulpe** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof.dr.ing. Măluțan Teodor, Universitatea tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | președinte |
| 2. Prof.em.dr.ing.dr.h.c. Popa Marcel, Universitatea tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof.dr.ing. Picton Luc, Université de Rouen, Franța | referent oficial |
| 4. Prof.dr.ing. Desbrieres Jacques, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța | referent oficial |
| 5. Prof.dr.ing. Delaite Christelle, Université de Haute Alsace de Mulhouse, Franța | referent oficial |
| 6. Prof.dr.ing. Vereștiuc Liliana, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grrigore T. Popa” din Iași | referent oficial |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.


RECTOR,
Prof.univ.dr.ing. **DAN CAȘCAVAL**

Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagiț

Doresc să-mi exprim mulțumirea și recunoștința față de coordonatorul științific dl. Prof. Marcel Popa pentru susținerea morală și toate sfaturile științifice acordate, pentru încrederea și disponibilitatea de a-mi oferi ajutor, oricând am avut nevoie, și pentru toată contribuția adusă pe parcursul anilor de doctorat!

Aș dori să-mi exprim recunoștința și aprecierea față de coordonatorul științific dl. Prof. Luc Picton pentru răbdarea, disponibilitatea, sugestiile prețioase, sfaturile acordate și experiența foarte frumoasă trăită pe parcursul stagiului în cadrul Universității Rouen! Am avut parte de un timp foarte prețios, ceea ce a fost o onoare pentru mine!

Doresc să-mi exprim recunoștința față de dna Prof. Liliana Vereștiuc pentru timpul acordat, înțelegerea și sfaturile științifice, precum și pentru oportunitatea de a învăța ceea ce definește cercetarea, pentru formarea mea ca cercetător și, de asemenea, pentru posibilitatea de a-mi efectua toate experimentele în laboratorul dumneavoastră!

Permiteți-mi de a-mi aduce mulțumirea și față de dl. Prof. Didier Le Cerf, dna. Virginie Dulong și dl. Christophe Rihouey pentru formarea pe partea de caracterizare reologică, μ DSC și SEC, precum și pentru încurajările și sfaturile științifice oferite mereu pe parcursul stagiului la Rouen!

De asemenea, doresc să mulțumesc dnei Vera Bălan, dna Prof. Maria Butnaru, dra Chahrazed Gheffar și trei Alina Gabriela Rusu pentru susținerea morală și științifică acordată fără rețineri!

Acum, la sfârșit, doresc să-mi exprim sentimentele mele sincere și toate gândurile bune familiei mele, prietenilor mei și tuturor persoanelor care au fost alături de mine și m-au susținut prin disponibilitate și timp, de fiecare dată când am avut nevoie.

Vă mulțumesc pentru implicarea voastră și rog să primiți mulțumirea distinsă că ați fost alături de mine și m-ați încurajat să termin această muncă!

Raluca VULPE

CUPRINS

PARTEA A. STUDIU BIBLIOGRAFIC.....	8
INTRODUCERE	8
1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN DOMENIUL INGINERIEI TISULARE CUTANATE.....	10
1.1. Caracteristicile și morfologia pielii.....	10
1.2. Vindecarea țesutului pielii. Mecanisme și molecule biologice.....	11
1.3. Caracteristicile hidrogelurilor cu aplicații în ingineria tisulară a pielii.....	15
1.4. Suporturi utilizate în ingineria tisulară a pielii.	18
2. BIOPOLIMERI DE INTERES ÎN INGINERIA ȚESUTULUI CUTANAT.....	20
2.1. Polimeri naturali utilizați în ingineria tisulară.....	20
2.1.1. Colagenul	22
2.1.2. Gelatina	23
2.1.3. Hialuronatul de sodiu.....	24
2.1.4. Sericina	25
2.2. Tendințe în ingineria țesutului cutanat.	26
3. HIDROGELURI: OBȚINERE, CARACTERISTICI DE BIOMATERIAL.....	27
3.1. Metode de obținere a hidrogelurilor.....	27
3.2. Noțiuni generale despre reologia biomaterialelor.....	30
3.2.1. Mișcarea de forfecare	31
3.2.2. Vâscozitatea	33
3.2.3. Reogramele.....	33
3.2.4. Fluidele newtoniene.....	34
3.2.5. Fluidele neneutroniene.....	35
3.3. Aplicațiile măsurătorilor reologice	37
3.4. Design-ul materialelor	38
3.5. Caracteristicile de biomaterial	40
3.5.1. Porozitatea	40
3.5.2. Hidrofilia și hidrofobia.....	42
3.5.3. Biocompatibilitatea	42
3.6. Hidrogeluri, aplicații și perspective în ingineria tisulară a pielii.....	49

PARTEA B. REZULTATELE ORIGINALE	55
PARTEA EXPERIMENTALĂ	58
4. MATERIALE ȘI METODE DE OBTINERE A HIDROGELURILOR	58
4.1. Materiale	58
4.2. Transformarea hialuronatului de sodiu în acid hialuronic	58
4.3. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu EDAC/NHS în imersie etanol/apă	59
4.3.1. Hidrogeluri pe bază de collagen, acid hialuronic și sericină	59
4.3.2. Hidrogeluri pe bază de collagen și gelatină	61
4.4. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu EDAC/NHS în apă	62
4.5. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu aldehidă glutarică	63
4.6. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu riboflavină	64
5. METODE DE ANALIZĂ ȘI CARACTERIZARE A HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI	66
5.1. Dozarea grupărilor carboxilice	66
5.2. Rezonanța Magnetică Nucleară (RMN)	66
5.3. Spectroscopia în Infraroșu (FT-IR).....	67
5.4. Analiza SEC / MALS / vîscozimetru	68
5.5. Microcalorimetrie (Micro-DSC).....	68
5.6. Analiza termo-gravimetrică (TG-DTG).....	69
5.7. Microscopia Electronică de Baleiaj (SEM)	69
5.8. Măsurători de reologie	70
5.9. Studii de determinare a gradului de retenție a apei.....	71
5.10. Studii de biodegradare	71
5.11. Studii de încărcare/eliberare de medicamente	72
5.12. Teste de citotoxicitate (MTT)	73
REZULTATE ȘI DISCUȚII	75
6. HIDROGELURI OBTINUTE PRIN RETICULAREA CU EDAC/NHS ÎN IMERSIE APĂ/ETANOL	75
6.1. HIDROGELURI PE BAZĂ DE COLAGEN, ACID HIALURONIC ȘI SERICINĂ: OBTINERE, CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII	75
6.1.1. Analiza H-RMN a polimerilor	75
6.1.2. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR.....	78
6.1.3. Caracterizarea prin Micro-DSC	79

6.1.4. Analiza termogravimetrică (TG-DTG).....	80
6.1.5. Caracterizarea morfologică a hidrogelurilor prin SEM	84
6.1.6. Determinarea gradului de retenție a apei	85
6.1.7. Studii de biodegradare	86
6.1.8. Studii de încărcare/eliberare de medicamente	87
6.1.9. Studii de citotoxicitate (MTT)	88
6.1.10. Concluzii	89
 6.2. HIDROGELURI PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI GELATINĂ: OBȚINERE, CARACTERIZARE, APLICAȚII.....	90
6.2.1. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR	90
6.2.2. Caracterizarea morfologică prin SEM	90
6.2.3. Determinarea gradului de retenție a apei	91
6.2.4. Studii de biodegradare	92
6.2.5. Studii de încărcare/eliberare de medicamente	93
6.2.6. Concluzii	94
 7. HIDROGELURI OBȚINUTE PRIN RETICULARE CU EDAC/NHS ÎN APĂ: OBȚINERE, CARACTERIZARE, ANALIZĂ REOLOGICĂ ȘI APLICAȚII	95
7.1. Analiza SEC / MALS / vâscozimetru.....	95
7.2. Caracterizarea reologică a soluțiilor polimerice	101
7.2. Spectrul de frecvență al amestecurilor polimerice	118
7.3. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR	132
7.4. Analiză termogravimetrică (TG-DTG).....	134
7.5. Caracterizarea morfologică a hidrogelurilor prin SEM.....	135
7.6. Caracterizarea reologică a hidrogelurilor pe bază de biopolimeri	136
7.7. Determinarea gradului de retenție a apei.....	140
7.8. Studii de biodegradare	141
7.9. Studii de încărcare/eliberare de medicamente.....	144
7.10. Studii de citotoxicitate (MTT)	145
7.11. Concluzii	145
 8. HIDROGELURI OBȚINUTE PRIN RETICULARE CU ALDEHIDĂ GLUTARICĂ: OBȚINERE, CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII.....	147
8.1. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR	147
8.2. Analiză termogravimetrică (TG-DTG).....	148
8.3. Caracterizare morfologică prin SEM	149
8.4. Determinarea gradului de retenție a apei.....	150
8.5. Studii de biodegradare	151
8.6. Studii de încărcare/eliberare de medicamente.....	153
8.7. Concluzii	154

9. HIDROGELURI OBTINUTE PRIN RETICULAREA CU RIBOFLAVINĂ: OBTINERE, CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII	155
9.1. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR	155
9.2. Analiză termogravimetrică (TG-DTG).....	156
9.3. Caracterizarea morfologică prin SEM	158
9.4. Determinarea gradului de retenție a apei.....	159
9.5. Studii de biodegradare	159
9.6. Studii de încărcare/eliberare de medicamente.....	162
9.7. Studii de citotoxicitate (MTT)	163
9.8. Concluzii	164
10. CONCLUZII GENERALE.....	165
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	167
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ	181
ANEXE.....	183

Abreviații

Col – Collagen

HA – Acid hialuronic

HAna – Hialuronat de sodiu

Ser – Sericină

Gel – Gelatină

EDAC – 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă

NHS – N-Hidroxisuccinimidă

GA – Glutaraldehydă

Rb – Riboflavină

IU – Indice de umflare

DD – Grad de degradare

SEC – Cromatografia de excludere a masei moleculare

¹H-RMN – Rezonanța magnetică nucleară

FTIR-ATR – Spectroscopia în Infraroșu

MEB – Microscopie electronică cu baleiaj

MicroDSC – Microcalorimetrie diferențială cu baleiaj

TG-DTG – Analiză termogravimetrică

NHDF – Celule fibroaste dermice normale

DMEM – Mediu de cultură DMEM

FBS – Ser Fetal Bovin

MTT - Bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazoliu

INTRODUCERE

Biomaterialele polimerice constituie o categorie de materiale ce se înscrie într-un domeniu ce are peste jumătate de secol de dezvoltare și inovare. Polimerii naturali care reprezintă sursa dominantă de obținere a lor, provin din resurse regenerabile ce se găsesc sub mai multe forme în natură (plante, animale și microorganisme). Aceste materiale cu o structură destul de complexă prezintă mai multe tipuri de funcții fiziologice. Biomaterialele polimere pot fi utilizate pentru mai multe aplicații în domeniul ingineriei tisulare, datorită proprietăților lor cu potențial aplicativ în domenii medicale diferite.

Biomaterialele polimere se caracterizează printr-o biocompatibilitate excelentă datorită proprietăților biologice de susținere a proliferării și pot acoperi o arie largă de proprietăți fizice, ceea ce le oferă un spectru funcțional mai larg. Prin optimizarea la nivel molecular a interfețelor între proteinele structurale și cele ale materialelor compozite, se pot obține biomateriale sub diferite geometrii și caracteristici, care oferă mai multe opțiuni de utilizare decât polimerii sintetici, și au o utilizare diversificată în aceste domenii în bioaplicații datorită proprietăților mecanice, degradabilității, biocompatibilității și funcționalizării pentru eliberarea medicamentelor și regenerarea țesuturilor.

În prezenta teză de doctorat, utilizarea sericinei reprezintă una din **contribuțiile originale**. Sericina, ce provine din viermele de mătase *Bombyx Mori*, are un potențial ridicat pentru utilizarea și aplicarea sa în domeniul biomedical. Până în prezent, încă nu a fost utilizată sericina la formarea sistemelor binare sau ternare cu caracter de hidrogel pe bază de collagen, acid hialuronic prin reticularea cu EDAC/NHS. Realizarea unor astfel de sisteme va contribui la identificarea condițiilor necesare obținerii materialelor cu proprietăți specifice aplicațiilor în ingineria tisulară a pielii.

Obiectivul acestui studiu l-a constituit dezvoltarea de noi materiale pe bază de polimeri naturali, ce corespund criteriilor impuse sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv, cercetările au fost direcționate către obținerea sistemelor binare și ternare prin reticularea directă de polimeri naturali, prin metode de lucru originale implicând

reticulanți mai puțin utilizați în acest scop (EDAC/NHS, riboflavină). De asemenea, în această teză de doctorat s-au obținut hidrogeluri pe bază de polimeri naturali (colagen, hialuronat de sodiu, sericină, gelatină) prin reticularea cu glutaraldehidă. Obținerea acestor materiale a fost realizată cu scopul de a efectua comparații între materiale și caracterizarea acestora în termeni de structură, morfologie, studii de retenție a apei, biodegradabilitate și, de asemenea, proprietăți reologice și de biocompatibilitate.

Teza de doctorat este compusă din două părți: prima parte este reprezentată de **studiul bibliografic** iar cea de a doua conține **rezultatele originale**. **Studiul bibliografic** este structurat în trei capitole, bazându-se pe consultarea a 182 de referințe bibliografice și dezvoltând probleme de interes pentru rezolvarea părții experimentale. **Partea practică** este organizată în 7 capitole: primele două sunt dedicate materialelor și metodelor de obținere a hidrogelurilor, iar celelalte cinci capitole raportează rezultatele și caracteristicile hidrogelurilor obținute.

În cadrul **capitolelor 1-3** este prezentat stadiul actual al cercetărilor din domeniul ingineriei tisulare, polimerii de interes și caracteristicile generale ale hidrogelurilor. În cadrul **capitolului 4** sunt prezentate materialele și metodele particularizate de obținere a materialelor.

Capitolul 5 prezintă metodele de analiză pentru caracterizarea hidrogelurilor obținute, în termeni de structură chimică, fizico-chimică (morfologie, retenția de fluide), biodegradare, degradare termică, proprietăți reologice, proprietăți de eliberare controlată a medicamentelor și proprietăți de biocompatibilitate.

În cadrul **capitolelor 6 – 9** se regăsesc toate hidrogelurile obținute, precum și evaluarea proprietăților acestora, rezultate în urma metodelor de caracterizare. În cadrul capitolului 10 sunt prezentate concluziile generale și toate rezultatele originale.

Rezultatele obținute au permis publicarea a 3 articole (două în reviste cu factor de impact) și prezentarea a 6 comunicări orale sau postere în cadrul unor conferințe naționale și internaționale.

În cadrul acestui rezumat a fost inclusă partea de rezultate originale, cu metodele de sinteză utilizate la obținerea hidrogelurilor, precum și capitolele 6.1, 7 și 9, concretizând astfel rezultatele cele mai importante.

PARTEA B. REZULTATELE ORIGINALE

Teza de doctorat intitulată „*Hidrogeluri pe bază de biopolimeri cu aplicații în ingineria tisulară a pielii*” vizează obținerea unor hidrogeluri pe bază de polimeri naturali, constituind biomateriale promițătoare cu aplicații medicale în ingineria tisulară a pielii. Ideea acestui proiect a pornit de la neajunsurile existente în acest domeniu, și anume obținerea unui substituent cutanat cu proprietăți și caracteristici cât mai apropiate de țesutul vizat. Obținerea unui astfel de biomaterial biocompatibil este posibilă prin utilizarea polimerilor naturali (colagen, elastină, albumină, sericină, etc.) și a polizaharidelor (acidul hialuronic), datorită potențialului regenerativ ce îl exercită fiecare dintre aceștia separat și potențialului de obținere a unor efecte sinergetice prin combinarea lor.

Principalul obiectiv al acestui proiect îl reprezintă obținerea de biomateriale biocompatibile pe bază de polimeri naturali, cu potențial regenerativ în ingineria tisulară a pielii. Obținerea unui astfel de biomaterial va fi de folos ingineriei tisulare a pielii, unde crearea unui hidrogel cu caracteristici cât mai apropiate față de cele regăsite în structura naturală a pielii este o nevoie reală pentru pacienții cu defecte cutanate profunde.

Obținerea hidrogelurilor cu aplicații în ingineria tisulară a pielii se va realiza prin procedee directe și indirecte de reticulare a biopolimerilor, astfel metodele de reticulare ce vor fi utilizate includ utilizarea carbodiimididelor (EDAC/NHS), glutaraldehidei și a riboflavinei (vitamina B₂). Pentru sinteza hidrogelurilor se vor utiliza diferite rapoarte ale următorilor polimeri: acidul hialuronic, colagen și sericină. Colagenul, proteină structurală importantă, are aplicații în aproape tot domeniul biomedical, datorită antigenicității, biodegradabilității și proprietăților bune mecanice, hemostatice, precum și datorită proprietăților de adeziune celulară. Utilizarea glicozaminoglicanilor oferă oportunitatea de a utiliza caracteristicile polizaharidelor, iar colagenului de a-i valorifica caracteristicile de biomaterial și a rolului important în adeziune, migrare, proliferare și diferențiere celulară.

După obținerea hidrogelurilor dorite, acestea vor fi caracterizate din următoarele puncte de vedere:

- studii de determinare a compoziției hidrogelurilor;
- analiza structurii, proprietăților fizico-chimice și morfologice ale hidrogelurilor;

- studii reologice asupra soluțiilor de polimeri, amestecurilor acestora, și asupra procesului de gelificare;
- studii de interacțiune cu lichide biologice simulate (studii de umflare);
- studiul degradării *in vitro* (în prezență de collagenază, hialuronidază/lizozim);
- studiul citotoxicității materialelor.

Acest proiect poate contribui la obținerea unui nou biomaterial, pe bază de biopolimeri (proteine, polizaharide), prin metode de sinteză și caracterizare a hidrogelurilor cu aplicații potențiale în ingineria tisulară a pielii.

Contribuțiile în domeniu ale acestui proiect cuprind:

- ✓ Obținerea de rețele interpenetrante (IPN) cu caracter de hidrogel pe bază de collagen, acid hialuronic și sericină, cu potențiale aplicații în ingineria tisulară a pielii;
- ✓ Corelarea proprietăților hidrogelului obținut cu parametrii procesului de obținere, pentru cunoașterea condițiilor în care se pot realiza biomateriale cu proprietăți impuse;
- ✓ Studiul factorilor implicați în procesul de formare a rețelelor IPN.
- ✓ Stabilirea dependenței dintre raportul între polimeri, pH și temperatură (obținerea datelor asupra compatibilității amestecului).
- ✓ Obținerea de informații privind influența caracteristicilor fizico-chimice, morfologice și reologice ale hidrogelurilor obținute asupra proprietăților mecanice și a proprietăților de degradare, precum și interacțiunea acestora cu fluidele de interes biologic.
- ✓ Realizarea testelor *in vitro* de degradare enzimatică.
- ✓ Influența compoziției asupra caracteristicilor de biodegradare *in vitro* a hidrogelurilor obținute.
- ✓ Corelarea compoziției și morfologiei hidrogelurilor cu proprietățile de biodegradabilitate și biocompatibilitate.

Noutatea acestui proiect constă în bioconjugarea polimerilor naturali (colagen, acid hialuronic și sericină) prin intermediul reacției cu EDAC/NHS. În literatură există hidrogeluri pe bază de colagen și acid hialuronic reticulate cu EDAC/NHS, însă nu și cu cel de al treilea polimer, sericina. Această proteină aduce un plus prin proprietățile de proliferare celulară, proprietățile de hidratare și posibilitatea de utilizare în tratamentul arsurilor. Astfel, biomateriale pe bază de colagen, acid hialuronic și sericină creează o perspectivă nouă în ingineria tisulară a pielii, având potențiale aplicații în tratamentul arsurilor.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

4. MATERIALE ȘI METODE DE OBTINERE A HIDROGELURILOR

4.1. Materiale

Colagen solubil în apă (de tip I+III), în 1% soluție apoasă de acid (HCl), a fost furnizat de Lohmann & Rauscher GmbH, Germany. Hialuronatul de sodiu din *Streptococcus equi*, polizaharidă glicozaminoglicană de origine bacteriană solubilă în apă și sericină din *Bombyx Mori* (viermele de mătase) au fost furnizate de către Sigma-Aldrich. Hialuronatul de sodiu a fost transformat în forma sa acidă, pe baza protocolului utilizat în laboratorul nostru de către Vasi *et.al* [21]. Ceilalți reactivi: N-clorhidrat (3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă (EDAC, Sigma-Aldrich), N-hidroxisuccinimidă (NHS, Sigma-Aldrich), ninhidrină, collagenază (tip I, activitate ≥ 125 unități/mg, US Biological), hialuronidază (de origine bovină, tip I-S, 400-1000 unități/mg solid, Sigma-Aldrich), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, cu 4500 mg/mL glucose, 110 mg/L sodium piruvat și 0.584 mg/L L-glutamină, Sigma-Aldrich), FBS (ser fetal bovin, filtrat-steril, potrivit pentru culturi celulare, Sigma-Aldrich), P/S/N (soluție de penicilină/streptomycină/neomicină cu 5000 unités de penicilină, 5 mg streptomycină și 10 mg neomicină/mL, sterilizată prin filtrare, potrivită pentru culturi celulare), PBS (soluție salină tampon fosfat, sterilizată, potrivită pentru culturi celulare) și MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliu) au fost utilizați așa cum au fost furnizați.

4.2. Transformarea hialuronatului de sodiu în acid hialuronic

Hialuronatul de sodiu a fost transformat în acid hialuronic prin trecerea printr-o coloană schimbătoare de ioni (H^+ Amberlite™ IR 120, Figura 4.1.). Coloana Amberlite IR 120™ a fost mai întâi activată cu o soluție de HCL 2N, timp de 30 minute. Aceasta a fost apoi spălată cu apă distilată, până când pH-ul apei de spălare a ajuns să fie același cu cel al apei distilate (pH=6.5). Prin coloana astfel activată, s-a circulat o soluție de hialuronat de sodiu 0.1% (w/w), care apoi a fost menținută timp de 24 h, sub agitare magnetică. Acidul hialuronic format a fost filtrat, centrifugat, și apoi liofilizat [91].

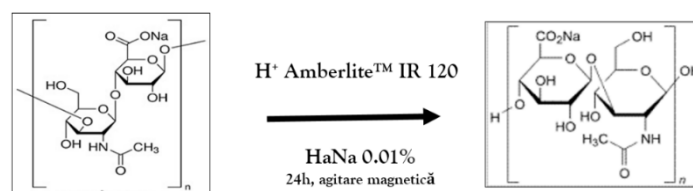


Fig.4.1. – Reprezentarea schematică a transformării hialuronatului de sodiu în acid hialuronic

4.3. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu EDAC/NHS în imersie etanol/apă

4.3.1. Hidrogeluri pe bază de collagen, acid hialuronic și sericină

Hidrogelurile au fost obținute prin reticularea covalentă a collagenului, acidului hialuronic și sericinei în prezență de EDAC/NHS (Figura 4.2.). Hidrogelurile au fost codificate de la HASC_I la HASC_{VI} (vezi Tabel 4.1.). Amestecurile apoase au fost mai întâi liofilizate iar apoi imersate într-o soluție de etanol/apă (40%), care conținea 50mM de EDAC/NHS cu un raport molar de EDAC:NHS=1:1 (etanolul a fost utilizat drept co-solvent pentru a evita hidroliza EDAC-ului, așa cum a fost descrisă de către Kwangoo *et.al.* [92]). Reacția a fost efectuată la temperatura ambiantă ($\approx 25^{\circ}\text{C}$). După 24h, hidrogelurile au fost purificate, conform unei metode de purificare din literatură [93], prin dializă cu 0,1 M Na₂HPO₄ • 2H₂O, 1 M de NaCl și, respectiv, 2M NaCl, iar apoi spălate cu apă distilată (trei zile), și apoi liofilizate. Randamentul reacției (y) a fost calculat cu formula (1), unde C_p reprezintă cantitatea practică (g) iar C_t cantitatea teoretică de polimeri (g):

$$y = \frac{C_p}{C_t} \times 100 (\%) \quad (1)$$

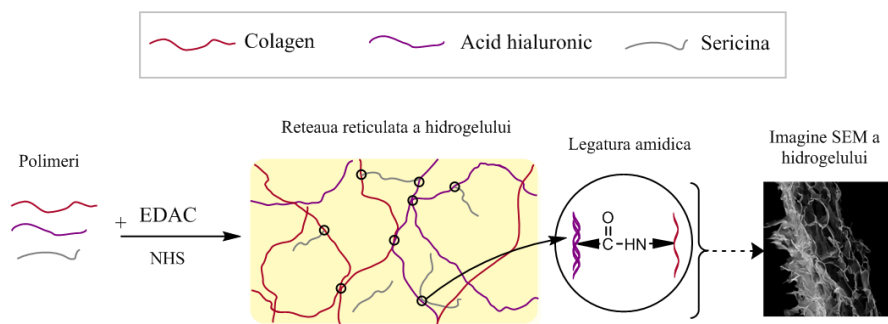


Fig.4.2. – Reprezentare schematică a reacției de reticulare a hidrogelurilor

Tabel 4.1. Compoziția hidrogelurilor și caracteristicile acestora.

	SERICINĂ (%)	COLAGEN (%)	ACID HYALURONIC (%)	Randament (y, %)	Grad de retenție a apei la echilbru (g/g)±SD ¹	Grad de degradare (%)±SD ¹
Masa molară(g.mol ⁻¹) [*]	M _n =6.986x10 ³ M _w =8.375x10 ³	M _n =2.042x10 ⁵ M _w =2.903x10 ⁵	M _n =1.151x10 ⁶ M _w =1.525x10 ⁶			
Vâscozitatea (mL.g ⁻¹) ^{**}	η _n =8.112 η _w =8.89	η _n =171.073 η _w =250.59	η _n =1588.548 η _w =1873.60			
HYDROGELURI	HASC _I	100	-	95	47±2	23±1
	HASC _{II}	80	20	74	30±1	28±1
	HASC _{III}	60	20	41	28±1	29±2
	HASC _{IV}	40	20	32	35±1	30±2
	HASC _V	50	-	41	34±1	33±2
	HASC _{VI}	20	20	17	33±1	42±1

¹ rezultatele raportate reprezintă valoarea medie a trei măsurători cu o ± deviație standard (SD); ^{*} M_n, M_w (date în g.mol⁻¹) et ^{**} η_n, η_w (date în mL.g⁻¹) au fost determinate prin analiza SEC/MALS/Vâscosimetru

4.3.2. Hidrogeluri pe bază de colagen și gelatină

Hidrogelurile au fost obținute prin reticularea covalentă a colagenului și gelatinei în prezență de EDAC/NHS (Figura 4.3.). Hidrogelurile au fost codificate de la CG1 la CG12 (compoziția de polimeri a rămas mereu aceeași – 50% colagen și 50% gelatină). Amestecurile apoase au fost mai întâi liofilizate iar apoi imersate într-o soluție de etanol/apă (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%). Etanolul a fost utilizat drept co-solvent pentru a evita hidroliza EDAC-ului, așa cum a fost descrisă de către Kwangoo et.al. [92]). Soluția de etanol/apă a fost diferită pentru fiecare hidrogel în parte, cu scopul de a găsi concentrația optimă la care gelatina se leagă cel mai mult. Reacția a avut loc la temperatura ambiantă (≈25°C). După 24h hidrogelurile au fost purificate, utilizând aceeași metodă descrisă în cadrul secțiunii 2.2.2.1, iar apoi, liofilizate.

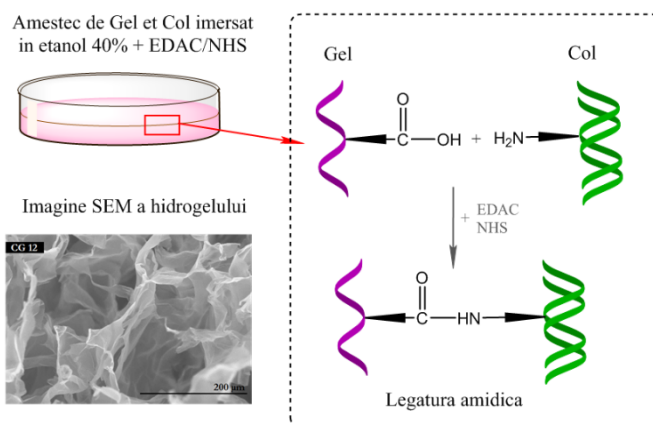


Fig.4.3. – Reprezentare schematică a reacției de reticulare a hidrogelurilor

4.4. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu EDAC/NHS în apă

Hidrogelurile au fost obținute în soluție apoasă, prin prepararea mai întâi de amestecuri cu concentrații diferite de polimeri: collagen, hialuronat de sodiu și sericină. Amestecurile au fost lăsate pe o placă de agitare magnetică timp de 24h, iar apoi s-a adăugat EDAC/NHS, folosind următorul raport molar $\text{COOH}:\text{EDAC}:\text{NHS}=1:10:2$ (Figura 4.4.). Numărul grupărilor carboxilice a fost calculat așa cum a fost precizat de către Olde Damink *et.al* [94]. Hidrogelurile au fost codificate CHS, conform Tabelului 4.2. Numărul grupărilor carboxilice ale acidului hialuronic a fost calculat și raportat la fiecare unitate monomerică. Procesul de reticulare a fost monitorizat prin măsurători reologice. După sinteză, hidrogelurile au fost purificate în apă Mili-Q timp de o săptămână (până când apa în care se afla hidrogelul avea aceeași conductivitate electrică precum a apei Mili-Q), apoi liofilizate. Randamentul reacției (γ) a fost calculat utilizând aceeași metodă precum la secțiunea 4.3.1.

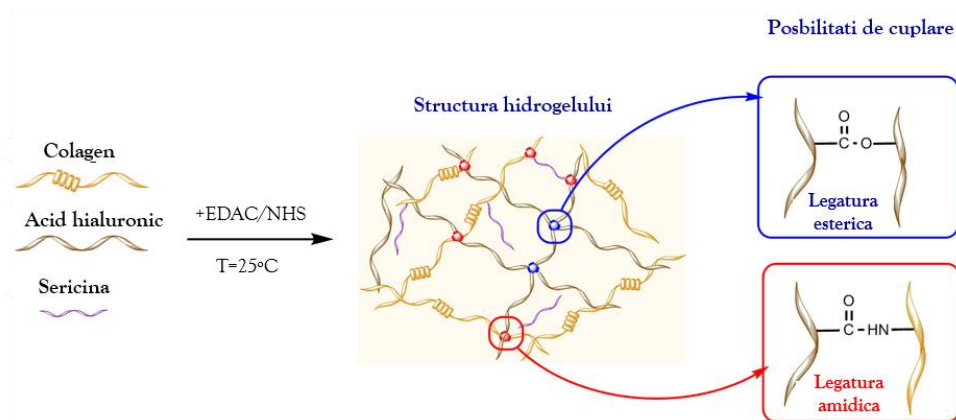


Fig.4.4. – Reprezentare schematică a reacției de reticulare a hidrogelurilor

Tabel 4.2. – Compoziția hidrogelurilor și evoluția G' and G'' înainte și după reticulare

		COLAGEN (%)	HIALURONAN (%)	SERICINĂ (%)	Y (%) ¹	ÎNAINTE DE RETICULARE*		DUPĂ RETICULARE**	
						G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)
CODIFICAREA HIDROGELURILOR	CHS ₁	0.25	1	-	95	34.03	30.61	315.36	6.50
	CHS ₂	0.5	0.5	-	97	21.83	17.68	556.636	8.11
	CHS ₃	0.5	0.5	1	92	0.87	2.24	436.25	11.01
	CHS ₄	0.5	1	-	98	60.45	43.82	1103.67	13.01
	CHS ₅	0.5	1	1	87	9.09	15.51	1000.79	23.94
	CHS ₆	0.75	1	-	92	55.14	45.61	2622.59	39.72
	CHS ₇	1	0.25	-	94	11.01	8.19	1815.13	51.19
	CHS ₈	1	0.5	-	94	42.64	22.77	1097.83	113.80
	CHS ₉	1	0.5	1	82	26.41	14.79	1793.01	88.83
	CHS ₁₀	1	0.75	-	95	45.19	34.38	3334.33	87.49
	CHS ₁₁	1	-	-	78	13.75	2.40	562.45	35.40
	CHS ₁₂	1	-	1	56	18.88	5.62	666.68	32.59
	CHS ₁₃	-	1	-	93	30.70	26.51	419.28	0.83
	CHS ₁₄	-	1	1	95	24.35	23.21	954.21	4.96

¹randamentul reacției; *, ** - rezultatele au fost obținute prin măsurători relogice la frecvența 1Hz

4.5. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu aldehydă glutarică

Hidrogelurile au fost obținute prin reticularea covalentă a collagenului, hialuronatului de sodiu și sericinei în prezență de glutaraldehidă (Figura 4.5.). S-au preparat amestecuri de polimeri (în soluție apoasă), iar apoi a fost adăugată glutaraldehida (după ce amestecul a fost ajustat la pH=8). Hidrogelurile au la bază următoarea compoziție: G1 (colagen), G3(colagen și hialuronat de sodiu), G3 (colagen și sericină) și G4 (colagen, hialuronat de sodiu și sericină). Acestea au fost clasificate în două sisteme astfel: G1A-G4A (reticulate cu 5% GA) și G1B-G4B (reticulate cu 10% GA). Reacția a fost adusă la temperatura ambiantă (≈25°C). După 24h, hidrogelurile au fost purificate utilizând aceeași metodă ca în secțiunea 4.3.1., iar apoi liofilizate.

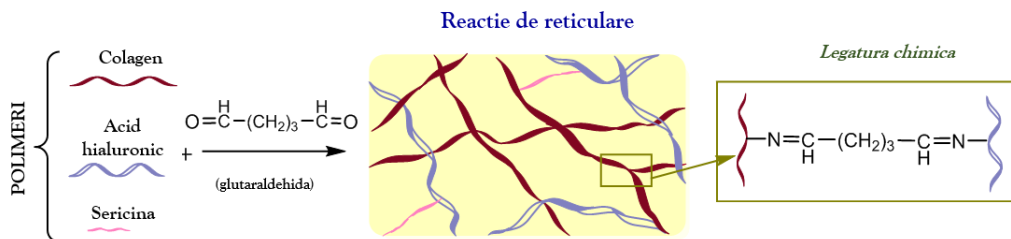


Fig.4.5. – Reprezentare schematică a reacției de reticulare a hidrogelurilor

4.6. Obținerea de hidrogeluri prin reticularea cu riboflavină

Hidrogelurile au fost obținute prin reticularea collagenului, hialuronatului de sodiu și sericinei în prezență de riboflavină (vitamina B₂). S-au efectuat amestecuri de collagen, hialuronat de sodiu și sericină. Riboflavina devine activă la 200-500 nm lungime de undă, de aceea hidrogelurile au fost reticulate sub acțiunea luminii din spectrul vizibil 380-750 nm. Reacția a avut loc la temperatura ambiantă ($\approx 25^\circ\text{C}$) prin adăugarea riboflavinei (de concentrație 0.01%) sub acțiunea razelor din spectrul vizibil, timp de 24h. Hidrogelurile au fost codificate CRb (colagen - 1%), CSRb (colagen - 1%; sericină - 1%) și CHSRb (colagen - 1%; hialuronat de sodiu - 0.5%; sericină - 1%). După 24h, hidrogelurile au fost purificate în apă distilată (timp de o săptămână) și apoi liofilizate.

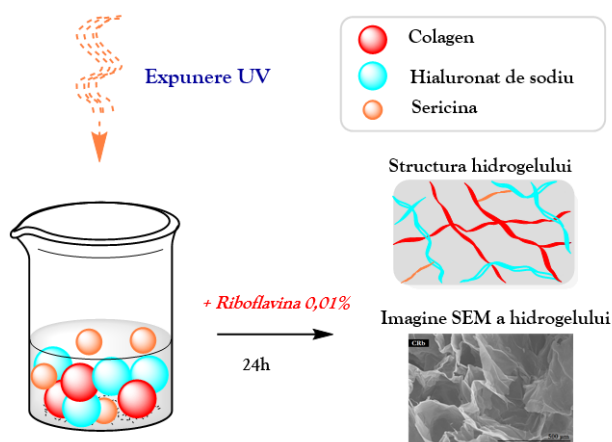


Fig.4.6. – Reprezentare schematică a reacției de reticulare a hidrogelurilor

REZULTATE ȘI DISCUȚII

6. HIDROGELURI OBTINUTE PRIN RETICULAREA CU EDAC/NHS ÎN IMERSIE APĂ/ETANOL

6.1. HIDROGELURI PE BAZĂ DE COLAGEN, ACID HIALURONIC ȘI SERICINĂ: OBTINERE, CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII

6.1.2. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR

Spectroscopia FTIR a fost efectuată pentru a confirma structura hidrogelurilor obținute. Spectrul FT-IR al hidrogelului HASCIV a fost analizat prin comparație cu spectrele polimerilor nereticulați. Astfel, în Figura 6.5. spectrele FT-IR pentru colagen și sericină prezintă benzi caracteristice amidice: amida I (1660 cm^{-1}), amida II (1550 cm^{-1}) și amida III (1240 cm^{-1}); pentru gruparea NH benzile se suprapun cu vibrațiile grupării OH din regiunea $3300 - 3400\text{ cm}^{-1}$ [105, 143]. Spectrul FT-IR al acidului hialuronic prezintă o bandă la 1034 cm^{-1} , reprezentată de unitatea zaharidică; o bandă largă centrată la regiunea 3346 cm^{-1} corespunde întinderii grupărilor N-H și O-H; banda de 2900 cm^{-1} , poate fi atribuită întinderii asimetrice a grupărilor CH_2 ; banda ce apare în regiunea 1732 cm^{-1} reprezintă întinderea grupărilor carboxilice CO_2 libere [144].

Hidrogelurile sintetizate sunt structuri tridimensionale obținute cu agenți de reticulare de lungime zero, și prin urmare, nici noi grupe funcționale nu pot fi detectate prin spectroscopie FT-IR. Așa cum era de așteptat, hidrogelurile au arătat benzi amidice caracteristice, fiind materiale pe bază de proteine. Cu toate acestea, există posibilitatea de a forma legături esterice în timpul procesului de reticulare, dar intensitatea benzii este mică ($1000-1300\text{ cm}^{-1}$) [145]. În același timp, spectrul FT-IR al hidrogelurilor nu a arătat nici o schimbare semnificativă produsă în structura polimerului în timpul procesului de reticulare; așadar, prin această analiză a fost confirmată prezența celor trei polimeri în matricea obținută (unitate zaharidă HA și legături amidice specifice conținutului proteic).

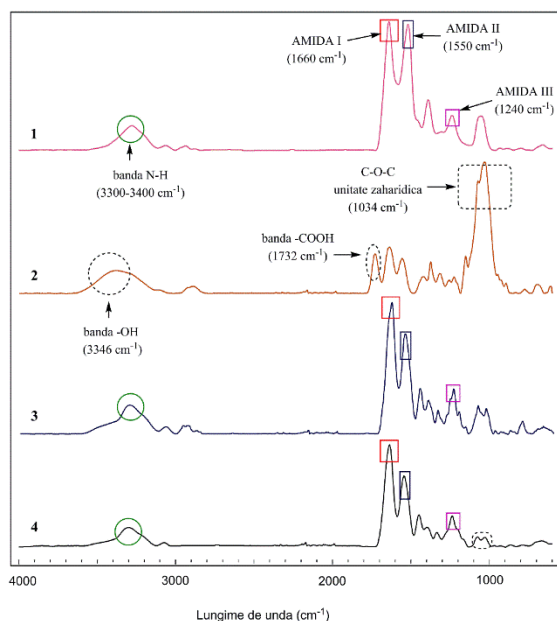


Fig.6.5. Spectrele FT-IR pentru: 1-Sericină, 2-Acid hialuronic, 3-Colagen și 4-HASC_{IV}.

6.1.3. Caracterizarea prin Micro-DSC

Studiile de microcalorimetrie au fost efectuate pentru a evalua tranziția collagenului pe parcursul procesului de încălzire/răcire, pe intervalul de temperatură 0-80°C. Termogramele (microDSC) ale soluțiilor fiecărui polimer utilizat nereticulat (sericină, collagen și acid hialuronic), precum și ale hidrogelurilor (HASCI, HASCII, HASCIII, HASCIV, HASCV) sunt prezentate în Figura 6.6. Termogramele sericinei și acidului hialuronic nu au prezentat nici o schimbare în intervalul de temperatură între 5°C și 80°C, deoarece acești polimeri nu prezintă tranziție la această temperatură. În schimb, pentru collagenul nereticulat a apărut un pic endotermic la $T = 46^{\circ}\text{C}$, așa cum este descris în literatura de specialitate [156, 157]. Pentru hidrogelurile HASCI, HASCV se poate observa că vârful endotermic a fost deplasat la $T = 72^{\circ}\text{C}$, respectiv, la $T = 67^{\circ}\text{C}$ ceea ce indică faptul că hidrogelurile în stare umflată sunt, din punct de vedere termic, mult mai stabile decât soluția de collagen nereticulată. Astfel, se poate concluziona că hidrogelurile au fost obținute cu succes prin procesul de reticulare chimică de tip EDAC/NHS.

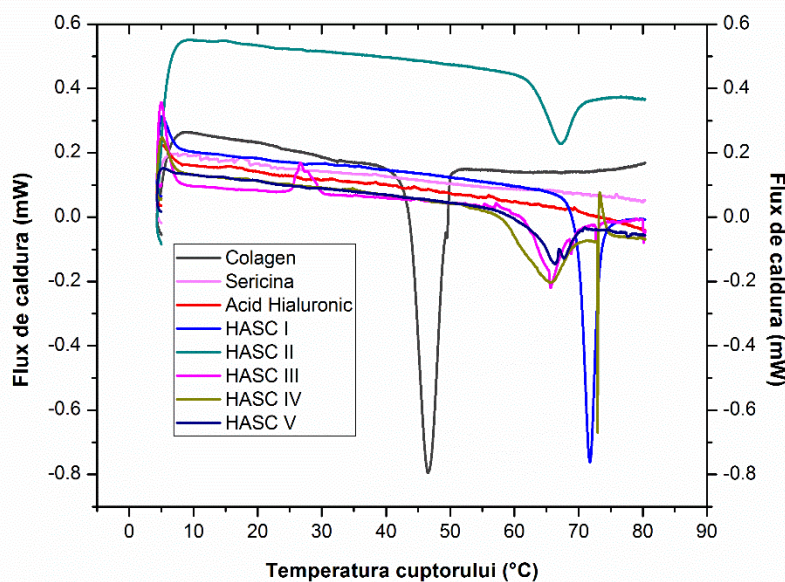


Fig.6.6. Termograme microDSC ale soluțiilor de polimeri nereticulați, precum și a hidrogelurilor HASCI, HASCII, HASCIII, HASCIV și HASCV.

6.1.5. Caracterizarea morfologică a hidrogelurilor prin SEM

Morfologia hidrogelurilor obținute a fost analizată prin SEM (Figura 6.11.). Secțiunile transversale ale hidrogelurilor preparate pornind de la diferite rapoarte de polimeri (Figura 6.11.) arată formarea structurilor macroporoase. Valoarea diametrului porilor ce sunt polidisperși se situează între 100-200 microni; diferențele observate asupra mărimii porilor depinde de raportul de polimer utilizat, astfel că proba doar pe bază de collagen (Figura 6.11.A) prezintă o structură diferită (pori alungiți, cu diametru mai mare $\approx 200\mu\text{m}$) față de cea în care s-au utilizat toți cei trei polimeri (pori mai compacți și diametru mai mic $\approx 100\mu\text{m}$, Figura 6.11.C). Structura interconectată a hidrogelurilor HASC oferă acestora proprietățile specifice: abilitatea de a nu se dizolva într-un solvent și capacitatea de a reține fluide. Hidrogelurile astfel obținute dețin morfologii similare, dar cu pori alungiți, dispuși uniform în structură.

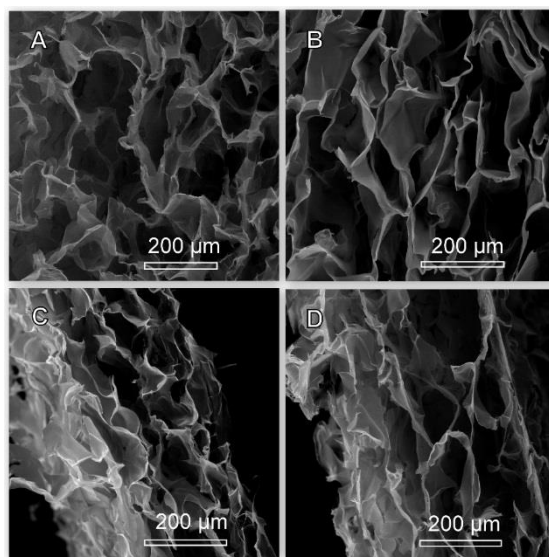


Fig.6.11. Imaginile morfologiei SEM pentru: A-HASC_I, B-HASC_{II}; C-HASC_{IV}; D-HASC_V.

6.1.7. Studii de biodegradare

Degradarea biologică reprezintă o condiție esențială pentru utilizarea cu succes a unui material sau a unui dispozitiv în cadrul aplicațiilor din domeniul biologic. Studiile de degradare *in vitro* a hidrogelurilor obținute și a collagenului nereticulat (utilizat ca martor) a implicat faptul că acestea au tendința de a pierde integritatea lor structurală în soluția de degradare (0,1 M, pH = 7,4, 0,01% collagenaza). După cum se poate observa în Tabelul 4.1. (secțiunea 6.1.) și Figura 6.13., hidrogelul HASCI s-a dovedit mai stabil datorită conținutului de collagen, după cum și Powel. ș.a. a constatat [114], reticularea EDAC îmbunătățește rezistența și stabilitatea biomaterialelor pe bază de collagen. În comparație cu proba de collagen nereticulat (ce a fost complet degradată în 72 de ore), gradul maxim de degradare (42%) a fost înregistrat pentru hidrogelul HASCVI. Rezultatele indică faptul că degradarea hidrogelurilor a fost dependentă de adăugarea sericinei. Prin creșterea conținutului în sericină, stabilitatea rețelei este diminuată, ceea ce duce la o degradare mai rapidă a hidrogelurilor. Proba HASCVI este predispusă de a-și pierde integritatea structurală deoarece rețeaua sa este slăbită (sericina a schimbat dinamica moleculară și hidrogelul prezintă o structură poroasă mare). Rezultatele studiilor de biodegradare enzimatică *in vitro* au confirmat capacitatea hidrogelurilor de a fi degradate în corpul uman, acest lucru fiind posibil deoarece collagenaza este prezentă în diferite țesuturi și fluide biologice.

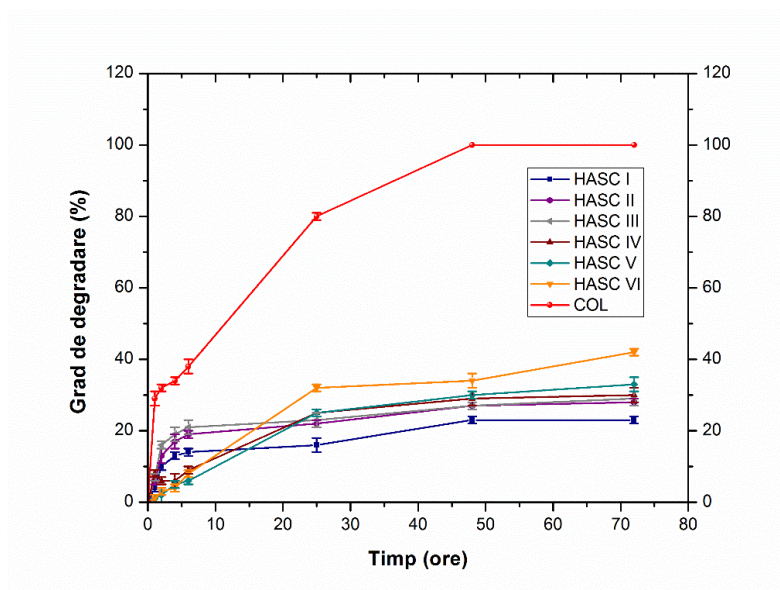


Fig.6.13. Cinetica studiilor de degradare *in vitro*, comparativ cu degradarea collagenului nereticulat.

6.1.9. Studii de citotoxicitate (MTT)

În ceea ce privește biocompatibilitatea, o mare atenție trebuie acordată dispozitivelor și materialelor concepute pentru viitoarele aplicații biomedicale. Prin urmare, testul MTT de evaluarea a viabilității celulare a fost efectuat cu scopul de a evalua citotoxicitatea hidrogelurilor obținute. Studiile de biocompatibilitate au demonstrat un procent al viabilității celulare în concordanță standardele actuale, astfel că în contact cu fibroblastele (Figura 6.15.) la 48 și 72 de ore de cultură, probele au prezentat valori ale viabilității celulare aproape de control pentru hidrogelurile HASCII, respectiv, HASCVI, datorită prezenței sericinei (* $p < 0,02$, ** $p < 0,002$ în raport față de martor); pentru hidrogelul HASCIII s-a înregistrat o ușoară scădere (** $p < 0,002$ în raport față de martor). Rezultatele au indicat faptul că hidrogelurile nu sunt citotoxice, valorile viabilității celulare fiind aproape de proba de control.

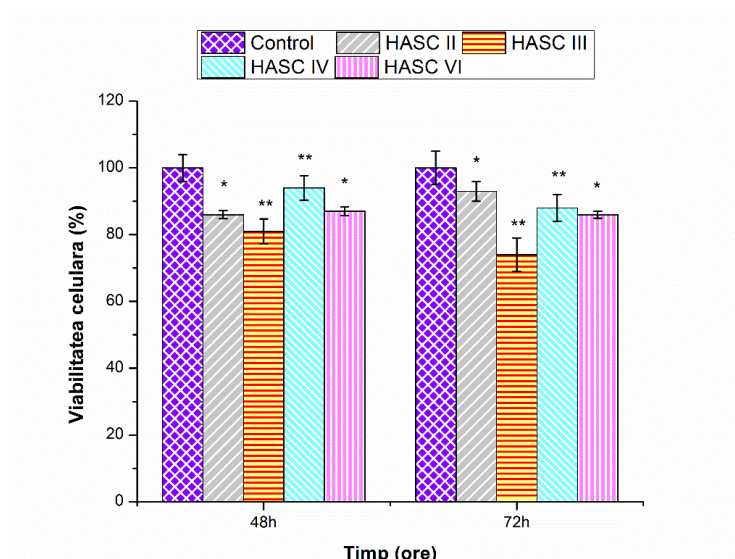


Fig.6.15. Valorile testului de viabilitate celulară MTT (* $p < 0.02$, ** $p < 0.002$ în raport față de control).

6.1.10. Concluzii

Au fost obținute noi hidrogeluri pe bază de collagen, acid hialuronic și sericină prin procesul de reticulare covalentă directă cu carbodiimide. Au fost evaluate caracteristicile fizico-chimice ale hidrogelurilor în ceea ce privește structura, morfologia, gradul de retenție a apei, gradul de degradare, procesul de degradare termică și de încărcare/eliberare de ibuprofen. Studiile MicroDSC au confirmat structura hidrogelurilor obținute cu succes prin reticularea cu EDAC/NHS. Biomaterialele obținute prezintă o structură tridimensională macroporoasă, cu pori alungiți, distribuiți uniform în structură, ce prezintă o capacitate de retenție ridicată a apei și o bună sensibilitate la caracteristicile importante de biodegradare enzimatică, pentru viitoarele aplicații biomedicale în domeniul ingineriei tisulare. Deși adăugarea sericinei a schimbat dinamica moleculară și a redus randamentul reacției, hidrogelurile obținute au prezentat proprietăți bune de biocompatibilitate, valorile testului MTT aflându-se aproape de control.

În viitor, studiile *in vivo* pe animale ar putea fi efectuate pe modele de leziune/arsură, pentru a se evalua adevăratul potențialul al acestor hidrogeluri în ingineria tisulară a pielii.

7. HIDROGELURI OBTINUTE PRIN RETICULARE CU EDAC/NHS ÎN APĂ: OBTINERE, CARACTERIZARE, ANALIZĂ REOLOGICĂ ȘI APLICAȚII

Anterior efectuării reticulării, toți polimerii de plecare au fost caracterizați din punct de vedere al reacției moleculare prin analiza SEC/MALS/VÂSCOZIMETRU.

7.1. Analiza SEC / MALS / vâscozimetru

Rezultatele analizei cromatografice SEC sunt prezentate în figurile 7.1. – 7.11. Astfel, sericina prezintă valori ale masei moleculare (g.mol^{-1}) de: $M_n=6.986 \times 10^3$, $M_w=8.375 \times 10^3$ și respectiv ale vâscozității intrinsece (mL.g^{-1}) de: $\eta_n=8.112$, $\eta_w=8.89$. Hialuronatul de sodiu prezintă valori ale masei moleculare (g.mol^{-1}) de: $M_n=1.151 \times 10^6$, $M_w=1.525 \times 10^6$ și respectiv ale vâscozității intrinsece (mL.g^{-1}) de: $\eta_n=1588.548$, $\eta_w=1873.60$. Pentru collagen s-au determinat valorile (g.mol^{-1}) de: $M_n=2.042 \times 10^5$, $M_w=2.903 \times 10^5$ și respectiv vâscozitatea intrinsecă (mL.g^{-1}) de: $\eta_n=171.073$, $\eta_w=250.59$. Coeficienții Mark-Houwink-Sakurada, a și k , depind de sistemul polimer-solvent. O valoare $a=0.5$ indică un solvent teta. O valoare $a=0.8$ este o valoare specifică solvenților buni. Pentru polimerii flexibili, valoarea a este situată în intervalul $0.5 \leq a \leq 0.8$, iar pentru polimerii semi-flexibili valoarea a este $a \geq 0.8$. Pentru polimerii absolut rigizi, precum virusul mosaic de tutun $a=2.0$.

7.2. Caracterizarea reologică a soluțiilor polimerice

Testul de determinare a vâscozității soluțiilor polimerice a fost efectuat la temperatura de 25°C , cu varierea concentrațiilor de polimeri. Pentru collagen și hialuronan concentrația a fost variată de la 0.25% la 1%, iar pentru sericină aceasta a rămas constantă, 1%.

Viscoelasticitatea soluțiilor de polimeri este o proprietate a materialelor importantă, care oferă informații asupra unor caracteristici privind elasticitatea și vâscoelasticitatea, atunci când soluția este supusă procesului de deformare. Materialele vâscoelastice sunt acele materiale pentru care relația dintre tensiune și deformare sunt dependente de timp sau, de frecvență. Această proprietate este importantă pentru a avea o imagine de ansamblu asupra structurii materialelor.

Din figura 7.12 se poate observa caracterul de fluid nenenewtonian al collagenului. Acest caracter se păstrează la toate soluțiile analizate a căror concentrație a variat în domeniul 0.25 – 1%. Figura 7.16 probează caracterul de fluid nenenewtonian și tixotrop al hialuronanului (t_c reprezintă timpul critic, timpul necesar soluției pentru a curge). De asemenea, se poate observa că varierea concentrațiilor de polimeri conduce la modificarea vâscozității, atât pentru collagen cât și pentru hialuronan (scăderea concentrației conduce la scăderea vâscozității). În acest caz, respectiv al fluidelor nenenewtoniene, vâscozitatea nu este constantă. Există o valoare diferită a vâscozității pentru fiecare viteză (rată) de forfecare. Interpretarea la scară microscopică a collagenului și hialuronanului se referă la faptul că moleculele lor, ca răspuns la viteza de forfecare, tind să se alinieze treptat de-a lungul stratului (ceea ce sporește curgerea lor relativă), aceasta reflectându-se în scăderea vâscozității.

Din figura 7.20. se poate observa că sericina este un fluid ce are o curgere newtoniană. Fiind un fluid newtonian, vâscozitatea sericinei va avea aceeași valoare indiferent de viteza (rata) de forfecare.

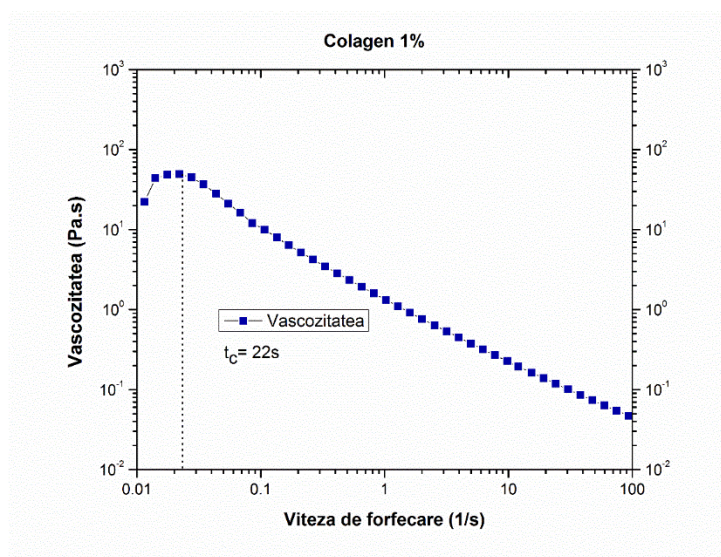


Fig.7.12. Vâscozitatea soluției de collagen, la o concentrație de 1%

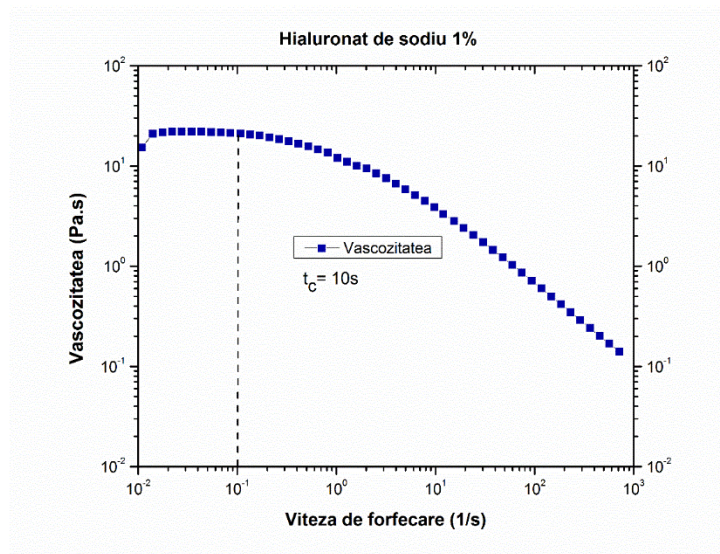


Fig.7.16. Vâscozitatea soluției de hialuronan, la o concentrație de 1%

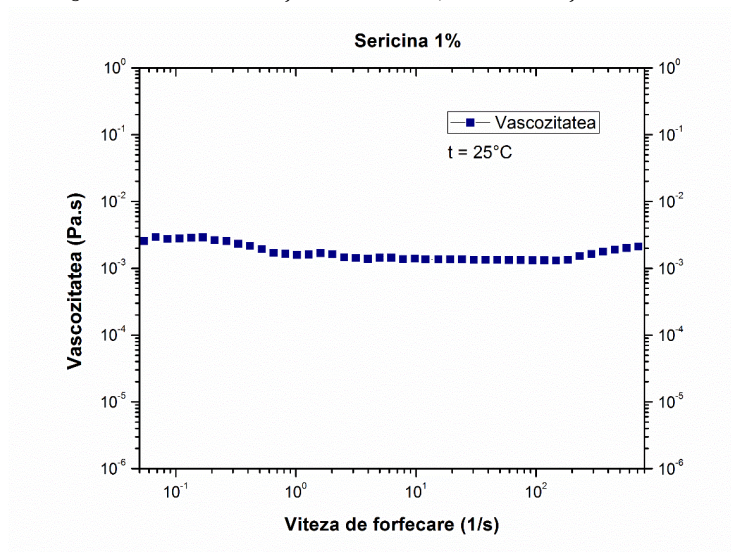


Fig.7.20. Vâscozitatea soluției de sericină, la o concentrație de 1%

Spectrul de frecvență al soluțiilor de polimeri a fost înregistrat în intervalul 0.01-100 Hz, la temperatura de 25°C. Comportarea reologică a soluțiilor depinde de timpul și frecvența la care acestea sunt supuse. Astfel că, această analiză oferă o imagine de ansamblu asupra soluțiilor omogene sau neomogene. La frecvențe mici, o soluție omogenă de polimeri este caracterizată de $G' < G''$ (moleculele au timp să se orienteze iar modulul de vâscozitate este mai mare decât cel de elasticitate). La frecvențe ridicate $G' > G''$, moleculele nu au timp să se orienteze iar modulul de elasticitate este mai mare decât cel de vâscozitate. Astfel, o soluție omogenă de polimeri deține un spectru de

frecvență în care intersecția celor două module oferă frecvența critică (f_c -frecvența la care modulul de elasticitate este mai mare decât cel de vâscozitate).

7.6. Caracterizarea reologică a hidrogelurilor pe bază de biopolimeri

⌘ Monitorizarea reologică a procesului de reticulare

Procesul de reticulare a fost monitorizat prin măsurători reologice. Figura 7.70. a arătat că modulul de elasticitate (G') este aproape întotdeauna mai mare decât modulul de vâscozitate (G''), ceea ce înseamnă că gelifierea începe atunci când EDAC/NHS a intrat în contact cu amestecul.

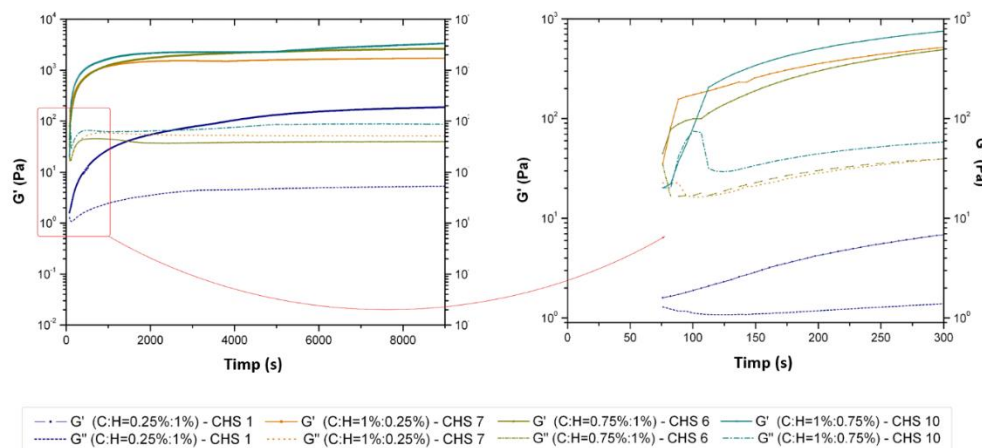


Fig.7.70. Cinetica de gelifiere monitorizată prin evoluția modulelor G' și G'' , pentru hidrogelurile CHS1, CHS7, CHS6 și CHS10.

Cinetica de gelifiere (Figura 7.70.) a arătat că prin creșterea conținutului de collagen crește și timpul de gelifiere. Reticularea începe la intervale de timp variază între 10 secunde și 30 de minute, în funcție de compoziția amestecului de polimeri supus reacției.

Platoul G' și G'' pot fi observat pentru toate hidrogelurile, fapt ce confirmă formarea structurii de rețea a hidrogelurilor. Figura 7.71. reprezintă valorile lui G' și G'' înainte și după reticulare, ceea ce a confirmat formarea hidrogelurilor prin valorile constante ale modulelor de vâscoelasticitate G' și G'' , înainte și după procesul de reticulare.

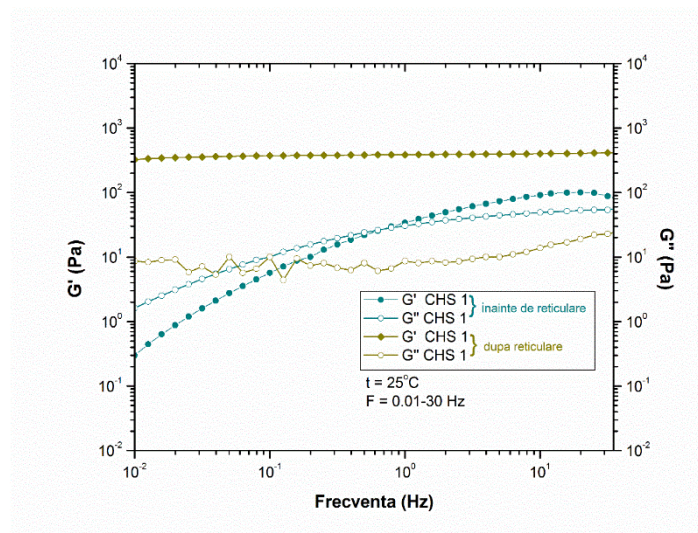


Fig.7.71. Spectrul de frecvență a hidrogelului CHS₁ înainte și după reticulare

Comparând cinetica procesului de reticulare (Figura 7.73.) se poate afirma că procesul de realizare a legăturilor amidice (CHS₁₁) decurge cu viteză diferită de cea a formării legăturii esterice (CHS₁₃). Acest lucru sugerează, de asemenea, că legăturile amidice sunt formate pentru toate hidrogelurile (cu excepția CHS₁₃). Adăugarea sericinei a schimbat dinamica moleculară (de ex. CHS₁₃ și CHS₁₄), cu modificarea modurilor G' și G'' , ceea ce semnifică faptul că proteina fost încorporată în rețeaua de hidrogel. Cea mai mare schimbare în G' și G'' s-a produs prin adăugarea hialuronatului de sodiu, confirmând contribuția sa esențială la formarea rețelei, precum și la legarea sericinei și a collagenului.

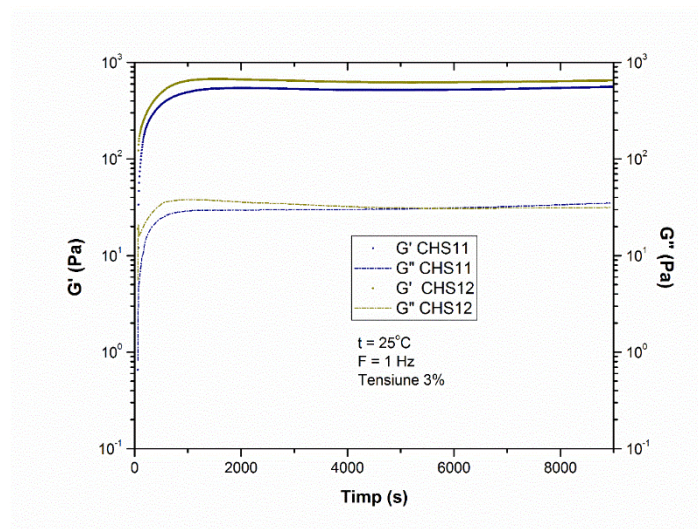


Fig.7.73. Comparăție între cinetica de reticulare cu formarea hidrogelurilor CHS₁₁ și CHS₁₂

7.7. Determinarea gradului de retenție a apei

Determinarea gradului de retenție a apei a confirmat caracterul de hidrogel al materialelor obținute prin capacitatea acestuia de a reține fluide. Așa cum se poate observa în Figura 7.74., gradul maxim de umflare a fost înregistrat pentru CHS₁₃ (ce conține doar legături esterice). Se poate observa că odată cu creșterea concentrației de hialuronat de sodiu, a crescut și capacitatea de umflare pentru hidrogelurile CHS₁, CHS₄, CHS₁₃ și CHS₁₄. Adăugarea de sericină (CHS₃, CHS₉, CHS₁₂) a dus la o ușoară creștere a gradului de umflare (atunci când concentrația collagenului a fost mai mare decât a hialuronatului de sodiu), dar și la o scădere a gradului de umflare pentru hidrogelurile CHS₅ și CHS₁₄ (ce dețin o concentrație mică de collagen raportat la hialuronat de sodiu). Diferența dintre valoarea gradului de umflare pentru CHS₁₃ și CHS₁₄ se datorează apariției legăturilor amidice pentru CHS₁₄, sugerând integrarea sericinei în rețeaua hidrogelului. Aceste experimente de determinare a gradului de absorbție a apei au confirmat structura de hidrogel, proprietate caracteristică importantă pentru perspectivele medicale, precum și importanța concentrației de hialuronat de sodiu din fiecare probă.

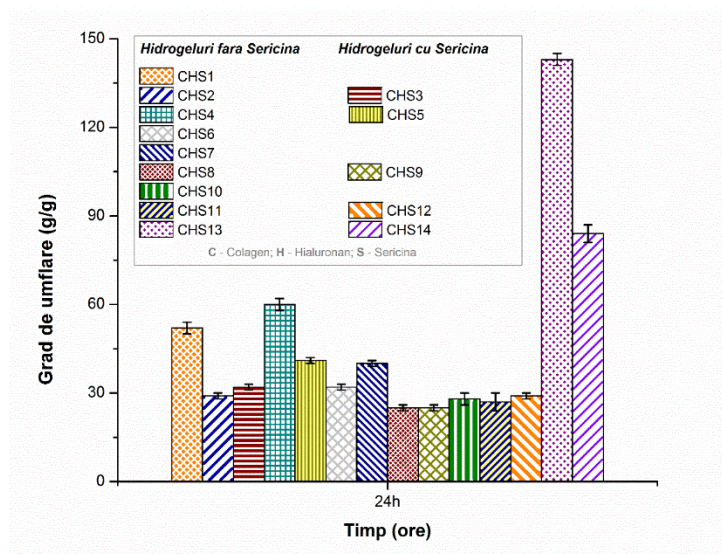


Fig.7.74. Valoarea gradului de retenție a apei la echilibru pentru hidrogeluri

7.8. Studii de biodegradare

Biodegradabilitatea este un factor cheie impus la sintetiza unui material cu aplicații biologice, proprietate importantă pentru aplicațiile medicale, dat fiind faptul că n astfel de material intră în contact cu țesuturile vii. Capacitatea de degradare a fost evaluată prin imersia biomaterialelor în

soluții diferite (PBS, collagenază, hialuronidază), ce simulează condițiile fiziologice. Așa cum era de așteptat când au fost imersate în PBS, hidrogelurile au prezentat stabilitate în condiții fiziologice. Când hidrogelurile au fost în contact cu collagenaza s-a observat că odată cu creșterea concentrației de collagen crește și capacitatea acestora de degradare (așa cum s-a observat pentru CHS₁₁ și CHS₁₂). Când hidrogelurile au fost imersate în soluția ce conținea hialuronidaza, hidrogelul ce s-a degradat cel mai repede a fost CHS₁₃ (100% hialuronat de sodiu).

Atunci când hidrogelurile au venit în contact cu collagenaza și hialuronidaza (Figura 7.78.), acestea s-au degradat aproape complet în 60 de ore. Degradarea a fost rapidă în soluția ce conținea collagenaza bacteriană, deoarece aceasta a digerat complet triplul helix al collagenului, prin urmare, hidrogelurile cu o concentrație mai mare de collagen au fost mai vulnerabile la degradare [156]. Studiile de degradare *in vitro* a hidrogelurilor au confirmat faptul că acestea sunt biodegradabile, și au relevat importanța hialuronatului de sodiu (creșterea concentrației acestuia crește și rezistența hidrogelurilor la degradare).

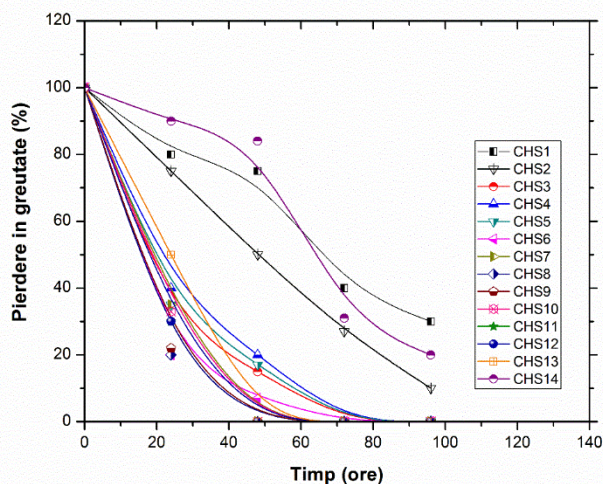


Fig.7.78. Studii de degradare a hidrogelurilor în PBS, collagenază și hialuronidază

7.10. Studii de citotoxicitate (MTT)

Biocompatibilitatea hidrogelurilor este o proprietate ce poate oferi o perspectivă de ansamblu asupra utilizării hidrogelurilor în ingineria tisulară, o posibilitate de evaluare o constituie realizarea testului MTT. Testele MTT au fost efectuate cu scopul de a determina dacă probele prezintă efecte citotoxice. După cum se poate observa în Figura 7.80., activitatea metabolică a celulelor viabile

NHDF a fost aproape de valoarea de control în cazul hidrogelurilor CHS₉ și CHS₁₃, unde viabilitatea celulară înregistrată a fost mai mare de 80%. O ușoară creștere a viabilității celulare a fost observată pentru CHS₁₃, ceea ce poate fi un efect al prezenței sericinei în compoziția materialului. Rezultatele indică că hidrogelurile nu sunt citotoxice, viabilitatea celulară fiind aproape de valoarea celei de control.

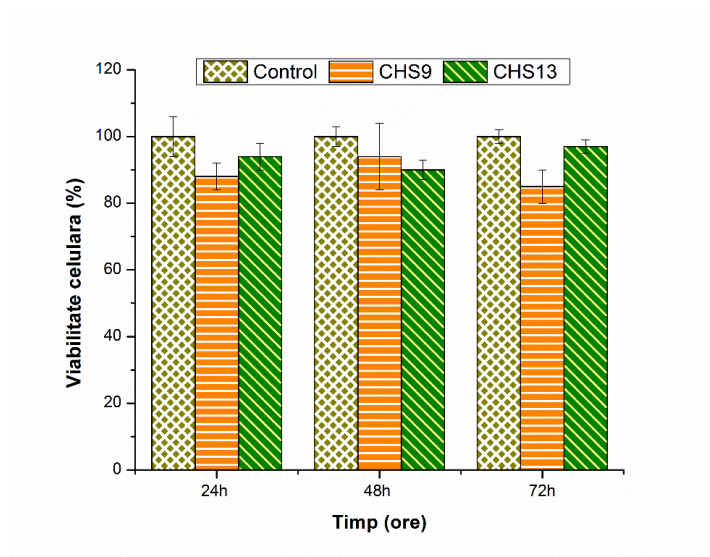


Figure 7.80. Viabilitatea celulară a hidrogelurilor CHS₉, CHS₁₃ în raport cu controlul

7.11. Concluzii

În urma tuturor analizelor efectuate s-a observat importanța contribuției testelor de reologie în înțelegerea dinamicii moleculare existente atât în cadrul amestecurilor de polimeri, cât și în timpul procesului de reticulare. Analiza cromatografică SEC a adus contribuții importante asupra valorilor maselor moleculare M_n , M_w (măsurate în $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) și a valorilor vâscozității intrinseci η_n , η_w (măsurate în $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$) pentru collagen, hialuronan și sericină. Măsurătorile reologice ale soluțiilor de polimeri au arătat caracterul de fluid newtonian al sericinei, precum și caracterul de fluide newtoniene ale collagenului și hialuronanului. Spectrul de frecvență efectuat asupra soluțiilor demonstrează omogenitatea soluției de hialuronat și eterogenitatea soluției de collagen. Analiza reologică a tuturor amestecurilor pentru hidrogelurile obținute demonstrează faptul că hialuronanul are o contribuție importantă asupra rețelei, de asemenea, acesta contribuie la creșterea modulului de elasticitate G' pe parcursul reacției de reticulare. În urma monitorizării reacției de reticulare, s-a observat că în cea mai mare măsură, contribuția esențială asupra formării rețelei o are hialuronanul și collagenul.

Microscopia electronică de baleiaj confirmă structura și morfologia de hidrogel a materialelor obținute, prin prezența porilor interconectați, aceștia fiind polidisperși ca valoare. Studiile de determinare a gradului de retenție a apei confirmă importanța hialuronanului în formarea rețelei tridimensionale a materialelor, precum și capacitatea de reținere a fluidelor de către materiale. Testele de biodegradare confirmă capacitatea de biodegradare a acestora în medii diferite. Studiile de încărcare/eliberare a ibuprofenului arată potențialul hidrogelurilor analizate de a fi utilizate ca suporturi de eliberare a medicamentelor. Testele de biocompatibilitate au confirmat că hidrogelurile nu provoacă efecte citotoxice, acestea având potențial de utilizare în ingineria tisulară.

9. HIDROGELURI OBTINUTE PRIN RETICULAREA CU RIBOFLAVINĂ: OBTINERE, CARACTERIZARE ȘI APLICAȚII

O serie nouă de hidrogeluri, pe baza acelorași biopolimeri utilizați în studiile anterioare, au fost obținute utilizând un reticulant natural – riboflavina (vitamina B2). Scopul studiului a fost obținerea unor noi biomateriale total lipsite de toxicitate.

9.1. Caracterizarea structurală a hidrogelurilor prin FT-IR

Spectroscopia FT-IR a fost efectuată pentru a confirma structura hidrogelurilor. Spectrul FT-IR al hidrogelului CHSRb (ce conține toți cei trei polimeri) a fost analizat prin compararea cu cel al riboflavinei. În figura 9.1. riboflavina prezintă caracteristicile de bandă specifice structurii sale: pentru întindere vibrațiilor C = O în regiunea C = O, $1735\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, vibrații CN ($1020\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$) și grupările de întindere hidroxil OH ($910\text{--}950\text{ cm}^{-1}$) pentru gruparea NH benzile se suprapun cu vibrațiile grupării OH din regiunea $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ [105, 143]. Spectrele FT-IR ale CHSRb au prezentat benzile caracteristice la amidice: amidă I (1660 cm^{-1}), amidă II (1550 cm^{-1}) și amidă III (1240 cm^{-1}), precum și benzile ce demonstrează prezența riboflavinei în structura hidrogelului.

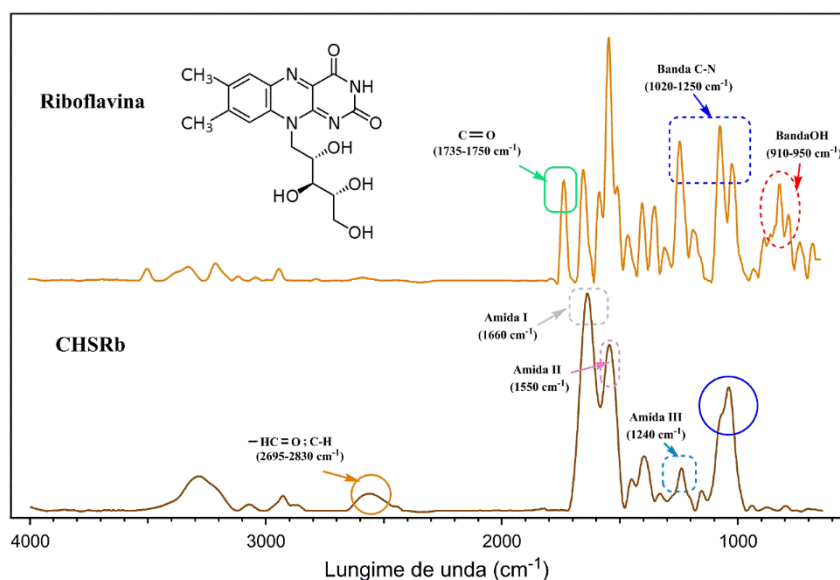


Fig.9.1. Spectrele FT-IR pentru riboflavină și CHSRb

9.5. Studii de biodegradare

Capacitatea de degradare a hidrogelurilor a fost evaluată prin imersia în soluții diferite (PBS, collagenază, hialuronidază). Când hidrogelurile au fost imersate în PBS, acestea au manifestat stabilitate în condiții ce simulează pe cele fiziologice. Atunci când hidrogelurile au fost în contact cu collagenază, și-au pierdut stabilitatea lor sub acțiunea enzimei, însă s-au dovedit mai stabile sub acțiunea hialuronidazei. Hidrogelul care s-a degradat cel mai repede a fost CRb, fiind doar pe bază de collagen. Atunci când hidrogelurile au fost în contact cu PBS, collagenază și hialuronidază s-a observat că acestea au fost rapid degradate în primele 24h (Figura 9.9.). Rezultatele studiilor de biodegradare enzimatică *in vitro* au confirmat capacitatea hidrogelurilor de a se degrada în corpul uman, unde collagenaza este prezentă în diferite țesuturi și fluide biologice.

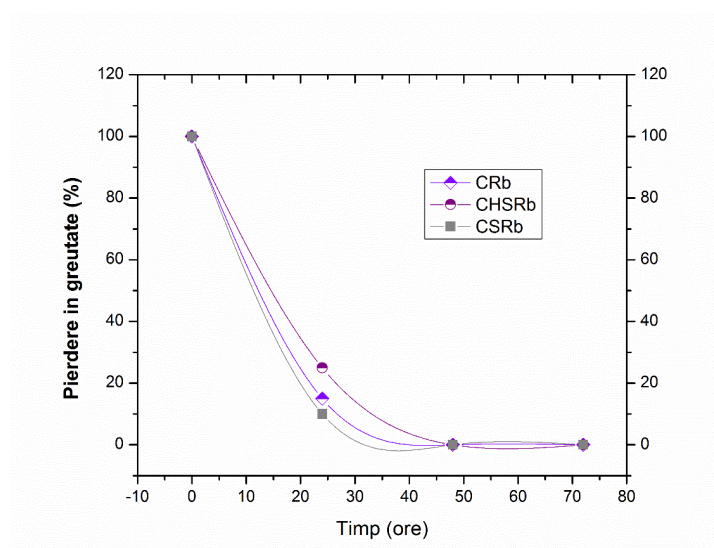


Fig.9.9. Studiile de degradare ale hidrogelurilor în PBS, collagenază și hialuronidază

9.7. Studii de citotoxicitate (MTT)

Testul de viabilitatea celulară MTT a fost efectuat pentru a determina efectele hidrogelurilor asupra fibroblastelor. Fibroblastele dermice umane normale (Figura 9.11.) au arătat că la 24h, 48h și 72h de cultură, cantitatea de celule metabolice active în hidrogeluri este aproape de valoarea de control, biocompatibilitatea fiind aproape de 90-95%. Rezultatele au indicat faptul că hidrogelurile nu sunt citotoxice, valorile viabilității celulare fiind aproape de cea a probei de control.

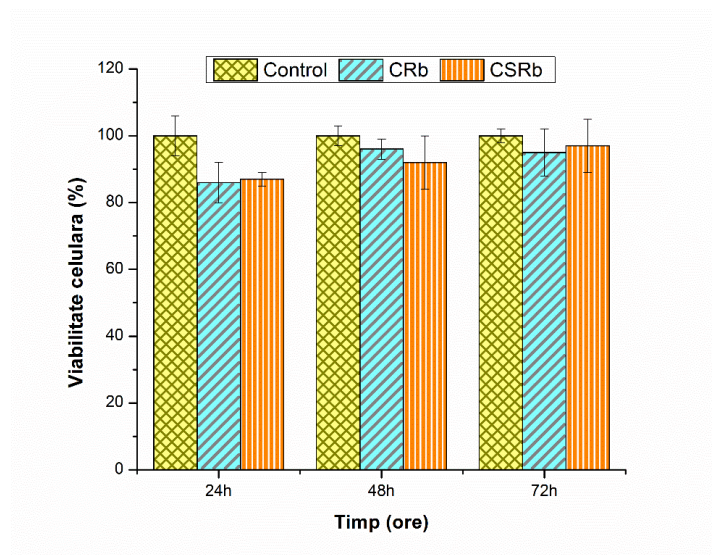


Fig.9.11. Viabilitatea celulară a hidrogelurilor față de control

9.8. Concluzii

Un nou tip de hidrogel a fost obținut pe bază de hialuronat de sodiu, collagen și sericină, prin reticularea cu riboflavină (vitamina B2). Caracteristicile fizico-chimice și biologice ale hidrogelurilor au fost determinate prin spectroscopie în infraroșu (FT-IR), microscopia electronică de baleiaj (SEM), umflarea în mediu apos și studiile de încărcare/eliberare a medicamentelor. Rezultatele au arătat că hidrogelurile pe baza de collagen, hialuronat de sodiu și sericină au o morfologie poroasă și stabilitate bună, și, de asemenea, au proprietăți importante pentru încorporarea ingredientelor active. Studiile de biodegradare au demonstrat faptul că hidrogelurile nu manifestă efecte citotoxice, putând constitui un bun substrat pentru o potențială utilizare în domeniul ingineriei tisulare.

10. CONCLUZII GENERALE

Scopul acestei lucrări a fost dezvoltarea de noi biomateriale pe bază de polimeri naturali, care să corespundă cerințelor de utilizare în ingineria tisulară a pielii și sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor. Pentru a realiza acest obiectiv, cercetarea a fost direcționată către obținerea unor sisteme binare și ternare prin combinarea de polimeri naturali, în structuri reticulate obținute prin metode originale utilizând ca reticulanți EDAC/ NHS, glutaraldehida și riboflavina.

1. S-a obținut un nou tip de hidrogel pe bază de collagen, acid hialuronic și sericină; acesta a fost realizat prin procedeul de reticulare cu carbodiimide (EDAC/NHS). Au fost evaluate caracteristicile fizico-chimice ale hidrogelurilor astfel obținute, din punct de vedere al structurii, morfologiei, degradării termice și enzimatică, precum și a încărcării/eliberării de ibuprofen. Studiile au confirmat structura macroporoasă și percolată a hidrogelurilor, acestea prezentând o bună capacitate de absorbție a apei și sensibilitate la biodegradare enzimatică, caracteristici importante pentru aplicațiile biomedicale. Adăugarea sericinei, cu toate că aceasta prezintă o masă molară mică și reduce randamentul de obținere a hidrogelurilor, nu modifică proprietățile materialelor realizate. Sericina aduce un plus de biocompatibilitate, manifestat prin creșterea ușoară a viabilității celulare.

2. Folosind același tip de reticulare (EDAC/NHS în amestec apă/etanol), s-au obținut hidrogeluri pe bază de collagen și gelatină. Analizele fizico-chimice și cele privind caracteristicile de biomaterial au condus hidrogeluri ce potențial de utilizare în domeniul ingineriei tisulare.

3. Au fost obținute hidrogeluri pe bază de collagen, hialuronat de sodiu și sericină prin reticularea directă cu carbodiimide. De această dată reacția de reticulare a fost realizată în soluția apoasă a amestecului de biopolimeri, realizat la diferite rapoarte prestabilite. Caracterizarea hidrogelurilor a inclus un studiu reologic a soluțiilor de polimeri atât înainte de reticulare cât și în timpul procesului de realizare a rețelelor tridimensionale. Analiza reologică a permis o mai bună înțelegere a dinamicii acestor sisteme și influența lor asupra cineticii de reticulare și asupra proprietăților finale ale hidrogelurilor obținute. Rezultatele au arătat un comportament vâcos newtonian al soluției de sericină 1%, care se explică prin greutatea sa moleculară mică. Soluția de hialuronat de sodiu 1% (HA) prezintă un tip ne-newtonian de comportament de fluidificare la forfecare și proprietăți vâscoelastice conform modelului Maxwell. În consecință, prezența HA

conferă polimerului proprietăți ale sistemelor încolăcite într-o soluție favorabilă pentru stabilirea unei matrici omogene reticulate. Colagenul, parțial solubil în apă, având agregate structurale de particule, se comportă mai mult ca un tip de fluid Casson cu prag de efort. Comportamentul său în modul dinamic are caracteristici ale unui material elastic. Prezența colagenului în soluție HA 1% nu a modificat semnificativ proprietățile reologice ale acestuia din urmă care a păstrat în continuare proprietăți de macromolecule încolăcite. Adăugarea sericinei nu schimbă proprietățile reologice ale colagenului și/sau HA. Hidrogelurile mixte colagen/HA/sericină sunt ușor de preparat prin această metodă, obținându-se proprietăți reologice și o cinetică a procesului de reticulare foarte interesantă. Analizele SEM, FT-IR au confirmat structura hidrogelului. Stabilitatea biomaterialelor a fost îmbunătățită pentru sisteme mixte care conțin mai mult decât HA și mai puțin colagen. Prezența HA la concentrații inițiale mai mari decât C^* , permite formarea unui sistem matricial cu o structură omogenă favorabilă unei morfologii cu o mai bună calitate, testele de biocompatibilitate probează lipsa efectelor citotoxice.

4. Hidrogeluri pe bază de polimeri naturali au fost obținuți și prin reticulare cu glutaraldehidă, un reticulant convențional utilizat la scară largă în ciuda caracteristicilor sale dovedite de toxicitate dovedite. Această abordare a permis să se obțină hidrogeluri având în esență aceleași caracteristici ca și cele produse în prezența agentului de reticulare EDAC/NHS, ceea ce constituie un rezultat interesant care confirmă abordarea noastră privind utilizarea celui din urmă.

5. O nouă modalitate promițătoare de reticulare a fost utilizată pentru obținerea de noi hidrogeluri, pe baza de colagen, hialuronatul de sodiu și sericină prin procedee naturale, care respectă abordările de tip "chimiei verzi" (reticulare foto-indusă în prezența riboflavinei – vitamina B2). Caracteristicile fizico-chimice și biologice ale hidrogelurilor au evidențiat că matricile care conțin cei trei polimeri au proprietățile dorite în ceea ce privește structura, morfologia, caracteristicile de umflare, biodegradabilitate, biocompatibilitate și eliberare controlată de principii active. Această ultimă sinteză de hidrogeluri aduce aportul la caracterul original al lucrării.

Precizez că cercetările efectuate au condus la rezultate care confirmă că hidrogelurile pe bază de colagen, hialuronat de sodiu și sericină pot avea aplicații biomedicale, cu potențial în ingineria tisulară.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] S.H. Hussain, B. Limthongkui, T.R. Humphreys, *The biomechanical properties of the skin*, Dermatol Surg 39 (2013) 193-203.
- [2] P.A. Tsonis, *Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration*, Differentiation 70 (2002) 397-409.
- [3] A.D. Metcalfe, M.W.J. Ferguson, *Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair*, Biomaterials 28 (2008) 5100-5113.
- [4] B. Langholz, J. Richardson, E. Rappaport, J. Waisman, M. Cockburn, T. Mack, *Skin characteristics and risk of superficial spreading and nodular melanoma*, Cancer Causes and Control 11 (2000) 741-750.
- [5] R.C. Webb, R.M. Pielak, P. Bastien, J. Ayers, J. Niittynen, J. Kurniawan, M. Manco, A. Lin, N.H. Cho, V. Malychuk, G. Balooch, J.A. Rogers, *Thermal transport characteristics of human skin in vivo using ultrathin conformal arrays of thermal sensors and actuators*, PLoS ONE 10 (2015) 1-17.
- [162] L.H.H. Olde Damink, O.J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Niewenhuis, J. Feijen, *Cross-linking of dermal sheep collagen using a water soluble carbodiimide*, Biomaterials 17 (1996) 765-773.
- [165] A. Lungu, M.G. Albu, I.C. Stancu, N.M. Florea, E. Vasile, H. Iovu, *Superporous collagen-sericin scaffolds*, J. Appl. Polym. Sci. (2013) 2269-2279.
- [176] R.M. Aminova, L.F. Galiullina, N.I. Silkin, A.R. Ulmetov, V.V. Klochkov, A.V. Aganov, *Investigation of complex formation between hydroxyapatite and fragments of collagen by NMR spectroscopy and quantum-chemical modeling*, Journal of Molecular Structure 1049 (2013) 13-21.
- [178] M. Worzakowska, P. Scigalski, *TG/DSC/FTIR characterization of linear genaryl diesters*, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 113 (2013) 53-60.
- [179] J.A. Heredia-Guerrero, J.J. Benitez, E. Dominguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou, A. Heredia, *Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles : A review*, Frontiers in Plant Science 5 (2014) 1-15.
- [181] D.F. Coutinho, S. Sant, H. Shin, J.T. Oliveira, M.E. Gomes, N.M. Neves, A. Khademhosseini, R.L. Reis, *Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties*, Biomaterials 29 (2010) 7494-7502.
- [182] F. Ganji, S. Vasheghani-Farahani, E. Vasheghani-Farahani, *Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A review*, Iranian Polymer Journal 19 (2010) 375-398.

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

Articole publicate în reviste cotate ISI

Raluca Vulpe, Marcel Popa, Luc Picton, Vera Bălan, Virginie Dulong, Maria Butnaru, Liliana Vereștiuc, *Crosslinked hydrogels based on biological macromolecules with potential use in skin tissue engineering*, International Journal of Biological Macromolecules 84 (2016) 174-181.

Articole în curs de publicare

Raluca Vulpe, Didier Le Cerf, Virginie Dulong, Marcel Popa, Cătălina A. Peptu, Liliana Vereștiuc, Luc Picton, *Study of chemically crosslinked hydrogels based on hyaluronan, collagen and sericin by rheology and enzymatic degradability* (în revizie la [Materials Science and Engineering C](#))

Raluca Vulpe, Marcel Popa, Luc Picton, Cătălina A. Peptu, Niță Tudorachi, Liliana Vereștiuc, *Scaffolds based on collagen, hyaluronan and sericin with potential applications as controlled drug delivery system* (acceptat la [Journal of Hydrogels](#))

Participări la manifestări științifice și conferințe internaționale

1. **Raluca Vulpe**, Marcel Popa, Liliana Vereștiuc, *Crosslinked Protein-Polysaccharide Based Biomaterial With Potential Use for Tissue Engineering* - International Seminar on Biomaterials & Regenerative Medicine BIOREMED 2013 and National Symposium of Biomaterials “Biomaterials and Medico-Surgical Applications” IXth Edition 30 may – 2 june 2013 – (Poster)
2. **Raluca Vulpe**, Marcel Popa, Camelia Ioana Boroianu, George Adrian Alăzăroaie, Liliana Vereștiuc, *Hidrogeluri pe bază de collagen și acid hialuronic cu aplicații în ingineria tisulară a pielii* – Conferința Națională de Bioinginerie Pentru Studenți și Tineri Cercetători, Ediția a XVII-a, 8-11 Mai 2014 (Poster).

3. **Raluca Vulpe**, Luc Picton, Marcel Popa, Liliana Vereștiuc, *Matrices a base d'acide hyaluronique et de collagène. Applications en génie tissulaire de la Peau*, XIème Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, Pitești (Cornul Vanatorului) – Roumanie, 27-29 Août 2014 (**Poster**)
4. **Raluca Vulpe**, Marel Popa, Liliana Vereștiuc, *Hydrogels based on crosslinked biopolymers with potential use in skin tissue engineering*, 6th International Seminar on Biomaterials & Regenerative Medicine, Oradea, România, 17-19th September 2015 (**Poster**)
5. **Raluca Vulpe**, Vera Bălan, Marcel Popa, Liliana Vereștiuc, *Scaffolds based on collagen, hyaluronan and sericin with potential applications in controlled drug delivery systems – A XXV-a Sesiune de Comunicări Științifice, Progrese În Știința Compușilor Organici și Macromoleculari*, Iași, 24-26 septembrie 2015 (**Poster**)
6. **Raluca Vulpe**, Marcel Popa, Liliana Vereștiuc, *Hidrogeluri pe baza de biopolimeri cu aplicatii în ingineria tisulară a pielii*, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași – Pregătim Viitorul Promovând Excelența – Ediția a XXVI-a -3-5 martie 2016, Iași (**Comunicare Orală**)

Alte colaborări – articole științifice publicate (fără cotă ISI)

Alina Gabriela Rusu, **Raluca Vulpe**, Marcel Ionel Popa, Maria Butnaru, Liliana Vereștiuc, *Novel semi-interpenetrating polymer networks based on functionalized chitosan and poly(acrylic acid) with potential applications in soft tissue engineering*, E-Health and Bioengineering Congerence (EHB), 2013.

Ana-Maria Vasi, Marcel Ionel Popa, **Raluca Vulpe**, Maria Butnaru, Liliana Vereștiuc, *New formulation of ophthalmic hydrogels based on hyaluronic acid derivates and poly(acrylic acid)*, Journal of Hydrogels 1 (2015).