

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE CHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII PRIVIND UTILIZAREA COLAGENULUI CA
SUPORT ÎN FORMULĂRI FARMACEUTICE PENTRU
TRATAREA RĂNILOR**

Conducător științific
Prof. dr. Minodora Leca

Doctorand
Fiz. chim. Mincan (Brăzdaru) Lavinia

2015

CUPRINS

LISTA DE ABREVIERI	4
INTRODUCERE	5
1. CARACTERISTICILE DE BIOMATERIAL ALE COLAGENULUI NEDENATURAT TIP I	8
1.1. Rolul colagenului în dezvoltarea celulară și regenerarea tisulară	9
1.2. Caracterul antigenic	13
1.3. Biodegradabilitatea	17
1.4. Controlul biodegradabilității prin reticulare	20
1.4.1. Reticularea prin procedee fizice	20
1.4.2. Reticularea chimică	21
1.5. Rolul colagenului în managementul rănilor	22
1.5.1. Colagenul în vindecarea rănilor cronice	23
1.5.2. Pansamentele de colagen în managementul rănilor	24
Bibliografie	26
2. ACIDUL TANIC	35
2.1. Structură și proprietăți	35
2.2. Utilizările acidului tanic în medicină	37
Bibliografie	40
3. DIGLUCONATUL DE CLORHEXIDINĂ	43
3.1. Structură și proprietăți	43
3.2. Mecanismele de acțiune antibacteriană	45
Bibliografie	46
4. MATERIALE ȘI METODE	48
4.1. Materiale	48
4.2. Metode de analiză	48
4.2.1. Metode fizico-chimice rapide	49
4.2.2. Metode spectroscopice	49
4.2.2.1. Spectroscopia de absorbție în infraroșu	49
4.2.2.2. Dicroismul circular	51
4.2.3. Microscopia electronică de scanare	51
4.2.4. Metode reologice	53
4.2.4.1. Reologia staționară	53
4.2.4.2. Reologia dinamică	55
4.2.5. Absorbția apei	55
4.2.6. Degradarea enzimatică <i>in vitro</i>	56
4.2.7. Evaluarea cedării medicamentelor	57
Bibliografie	57
5. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR DE COLAGEN ÎNȚIAL, CU ACID TANIC, DIGLUCONAT DE CLORHEXIDINĂ ȘI AMESTECURI ALE ACESTORA	59
5.1. Hidrogelul inițial	60
5.1.1. Metode rapide de analiză	60
5.1.2. Caracterizarea prin dicroism circular	61
5.2. Selectarea hidrogelului de colagen pentru prepararea biomaterialelor	62
5.3. Hidrogeluri cu acid tanic	67
5.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR	68
5.3.2. Caracterizarea prin spectroscopie UV-DC	75
5.3.2.1. Efectul concentrației colagenului asupra spectrului DC	76
5.3.2.2. Efectul deschiderii fantei	79
5.3.3. Caracterizarea prin comportare reologică staționară	83
5.3.4. Caracterizarea prin comportare reologică dinamică	89
5.4. Hidrogeluri cu digluconat de clorhexidină	92
5.4.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR	93

5.4.2. Caracterizarea prin UV-DC	96
5.4.3. Caracterizarea prin comportare reologică staționară	99
5.4.4. Caracterizarea prin comportare reologică dinamică	103
5.5. Hidrogeluri cu acid tanic și digluconat de clorhexidină	107
5.5.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR	108
5.5.2. Caracterizarea prin spectroscopie UV-DC	112
5.5.3. Caracterizarea prin comportare reologică staționară	116
5.5.4. Caracterizarea prin comportare reologică dinamică	124
5.6. Concluzii	128
Bibliografie	130
6. CARACTERIZAREA MATRICILOR POROASE CE CONȚIN ACID TANIC, DIGLCONAT DE CLORHEXIDINĂ SAU AMESTECURI ALE ACESTORA	134
6.1. Matrici cu acid tanic	135
6.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR	135
6.1.2. Caracterizarea prin SEM	139
6.1.3. Caracterizarea prin absorbția apei	144
6.1.4. Caracterizarea prin rezistență la digestia cu collagenază	144
6.2. Matrici cu digluconat de clorhexidină	145
6.2.1. Spectrele FT-IR	145
6.2.2. Caracterizarea prin SEM	148
6.3. Matrici cu acid tanic și digluconat de clorhexidină	151
6.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR	151
6.3.2. Caracterizarea prin SEM	155
6.3.3. Caracterizarea prin absorbția apei	158
6.3.4. Caracterizarea prin rezistență la digestia cu collagenază	161
6.4. Concluzii	163
Bibliografie	164
7. ELIBERAREA ACIDULUI TANIC DIN MATRICI	167
7.1. Eliberarea din matrici care conțin numai acid tanic	170
7.2. Eliberarea din matrici care conțin acid tanic și digluconat de clorhexidină	172
7.2.1. Eliberarea acidului tanic din matrici cu 5% acid tanic	173
7.2.2. Eliberarea acidului tanic din matrici cu 10% acid tanic	174
7.2.3. Eliberarea acidului tanic din matrici cu 15% acid tanic	176
7.3. Concluzii	177
Bibliografie	177
8. CONCLUZII GENERALE	180
LISTA DE LUCRARI	184

INTRODUCERE

Biomaterialele utilizate pentru tratarea rănilor trebuie să permită dezvoltarea celulelor și regenerarea tisulară, să fie biodegradabile și bioresorbabile și să nu aibă caracter antigenic.

Colagenul fibrilar tip I, îndeplinind toate condițiile enumerate, este cel mai utilizat biomaterial natural. În plus, formează compozite cu mulți polimeri naturali și sintetici, precum și cu materiale ceramice.

Biomaterialele pe bază de colagen se utilizează ca: dispozitive medicale, schelete pentru regenerare tisulară, implanturi artificiale, suporturi pentru eliberarea medicamentelor, factorilor de creștere și celulelor, precum și în terapia genetică. Dar colagenul este și principiu activ – hemostatic și pansament în vindecarea rănilor. Fiind proteină, este substrat și pentru bacterii, deci trebuie asociat cu antibiotice și/sau antiseptice.

Obiectivul tezei îl constituie obținerea de biomateriale pe bază de colagen – hidrogeluri și matrici poroase – utilizabile ca sisteme de cedare topică pentru substanțele antimicrobiene acid tanic și digluconat de clorhexidină, conținute individual sau ca amestecuri, în vederea tratării rănilor de diferite etiologii.

Pansamentele trebuie să fie suficient de elastice pentru a acoperi intim rănilor, să adere dar să se îndepărteze ușor pentru a nu vătăma țesutul, să protejeze de microbii din mediu, să fie permeabile pentru apă pentru a preveni deshidratarea sau acumularea de fluide, să prevină formarea de țesut granular excesiv, să poată avea orice dimensiune și grosime, să fie neantigenice și lipsite de toxicitate, să fie stabile la stocare, să se poată steriliza, să constituie rezervoare de antibiotice și să protejeze împotriva acțiunilor mecanice.

Acidul tanic, compus antimicrobian vegetal, reduce durerea, produce stabilizare hemodinamică rapidă, limitează infecția secundară, diminuează țesutul cicatricial și, totodată, reticulează colagenul.

Digluconatul de clorhexidină, substanță antiseptică cu administrare topică, se legă de pereții celulelor bacteriene, având proprietatea unică de substantivitate. În plus, distruge fungii și sporii. Absorbția sistemică și toxicitatea sunt reduse, rănilor se vindecă mai rapid și compatibilitatea cu antibiotice este bună.

Este de așteptat deci ca biomaterialele pe bază de colagen în care s-au încorporat acid tanic și digluconat de clorhexidină să fie utile pentru tratarea rănilor de diferite etiologii.

Capitolul 1 prezintă rolul colagenului în dezvoltarea celulară și în regenerarea tisulară, caracteristicile de biomaterial ale acestuia, procedeele de reticulare și rolul său, precum și al pansamentelor poroase, în vindecarea rănilor cronice.

Capitolul 2 conține structura, proprietățile și utilizările acidului tanic în domeniul medical.

Capitolul 3 prezintă structura digluconatului de clorhexidină, proprietățile și mecanismele prin care acționează pentru distrugerea bacteriilor.

Capitolul 4 descrie materialele și metodele utilizate pentru caracterizarea hidrogelurilor și matricilor.

Capitolul 5 începe cu caracterizarea hidrogelului de colagen inițial și continuă cu a celor diluate, cu 0,9, 1,1 și 1,3% colagen și pH 3,8 și 7,4, în scopul selectării concentrației pentru prepararea biomaterialelor. S-a găsit că 1,1% este cea mai convenabilă. Caracterizarea hidrogelurilor cu pH 3,8 și 5, 10 și 15% acid tanic, cu pH 3,8 și 7,4 și 1,82, 4,55 și 9,09% digluconat de clorhexidină și a celor cu amestecurile celor două componente și au pH 3,8 din punctele de vedere: structural – prin FT-IR și UV-DC și reologic – prin metoda staționară pentru determinarea proprietăților de curgere și dinamică pentru stabilirea celor elastice este discutată în paragr. 5.3-5.5.

Capitolul 6 cuprinde caracterizarea matricilor poroase obținute prin liofilizarea hidrogelurilor din cap. anterior prin FT-IR – pentru investigarea păstrării conformației native a colagenului și SEM – pentru stabilirea morfologiei matricilor, care determină eliberarea medicamentelor și permite creșterea și migrarea celulelor. Gradele de reticulare ale colagenului din matrici s-au apreciat prin absorbția apei și prin rezistența la digestie cu collagenază din *Clostridium histolyticum*.

Capitolul 7 prezintă studiul eliberării *in vitro* a acidului tanic din matricile cu acid tanic și din cele care conțin toate amestecurile celor două componente antimicrobiene în condiții fiziologice, utilizând ca mediu de cedare soluție tampon fosfat salină, utilizând un dispozitiv USP modificat (dispozitiv „sandwich”). Concentrația acidului tanic eliberat s-a determinat prin spectrofotometrie UV.

Pentru matricile care conțin doar acid tanic cea mai mare cantitate este cedată de matricea cu 10% acid tanic și cea mai mică de cea cu 5%, pe când pentru cele ce conțin amestecuri – de matricea care conține cantități minime de acid tanic și digluconat de clorhexidină (5,00, respectiv 1,82%), adică de cea mai slab reticulată.

Capitolul 8 conține concluziile generale.

1. CARACTERISTICILE DE BIOMATERIAL ALE COLAGENULUI NEDENATURAT TIP I

Biomaterialele trebuie să permită dezvoltarea celulelor, să producă regenerare tisulară, să fie foarte slab antigenice sau neantigenice, biodegradabile și bioresorbabile.

Colagenul nedegradat tip I, probabil cel mai important biomaterial natural, se aplică în medicină, farmacie, cosmetică, ingineria țesuturilor și organogeneză, datorită biocompatibilității remarcabile, antigenității reduse [6,7], posibilității controlului biodegradării [7] și formării de compozite cu alți polimeri și cu materiale ceramice. [8,9]

Pentru a putea fi utilizat ca biomaterial, colagenul trebuie să aibă structura moleculară cât mai apropiată de a celui nativ, de helix triplu, caracteristică moleculei de colagen.

Biomaterialele pe bază de colagen se pot găsi în diverse forme: hidrogeluri, membrane, matrici poroase, fire, tuburi sau materiale compozite. [15, 16]

1.1. Rolul colagenului în dezvoltarea celulară și regenerarea tisulară

Colagenul, singur sau asociat cu alte substanțe din matricea extracelulară (MEC), are rol important în fiziologia și comportamentul celulelor țesutului conjunctiv. MEC este un amestec complex de proteine: glicozaminoglicani (GAG) și proteoglicani (PG) ai acestora, glicoproteine adezive (laminină, fibronectină, tenascină, nidogen) și proteine fibroase (colageni și elastină), [17] așa cum se poate vedea în figura 1.1.

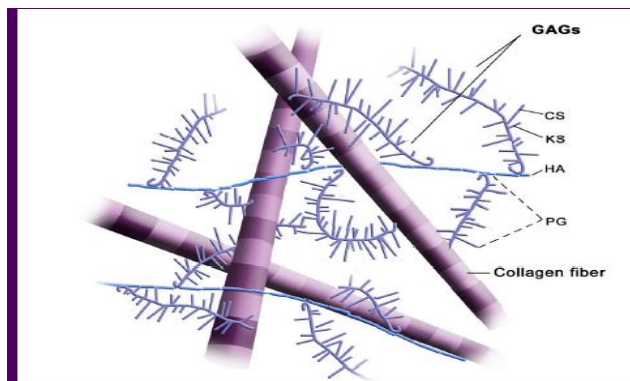


Figura 1.1. Prezentare schematică a MEC: HA – acid hialuronic, CS – condroitinsulfat, KS – chondroitinsulfat, PG – proteoglicani, GAG – glicozaminoglicani

Colagenul este familia de proteine caracterizată prin repetarea secvenței Gly-X-Y în lanțurile α -peptidice, (Gly – rest de glicină, X, Y – rest de alt aminoacid). Capacitatea de a lega substanțe îl face util ca suport pentru medicamente, factori de creștere și celule, iar funcția de ancorare contribuie la formarea eșafodajului pentru repararea și regenerarea tisulară. [17, 21, 22] De asemenea, contribuie la depozitarea locală și eliberarea factorilor de creștere, are rol în timpul dezvoltării organelor, vindecării rănilor și reparării țesuturilor. [18, 25]

Calitățile de biomaterial pentru dezvoltare celulară și regenerare tisulară sunt susținute și de următoarele particularități: biodegradabilitate, imunogenitate scăzută și posibilitatea de izolare pe scară largă în stare pură, ceea ce-l face indispensabil pentru medicină, industria farmaceutică, cosmetică sau alimentară.

1.2. Caracterul antigenic

Colagenul este slab imunogen comparativ cu alte proteine. Determinanții antigenici majori, situați în regiunile telopeptidice ale moleculei de tropocolagen, [33-35] se pot îndepărta. Dar colagenul mai conține alte două tipuri de determinanți antigenici: helixul triplu și secvența aminoacizilor din lanțurile α de pe suprafețele fibrilelor. [36-40] Imunogenitatea mai redusă a colagenului din fibrile comparativ cu a celui nativ se datorează reducerii accesului determinanților antigenici în timpul formării fibrilelor. [41, 42]

Antigenitatea telopeptidelor din tropocolagen se datorează compoziției în aminoacizi considerabil diferită de a helixului triplu, acestea conținând cantități mari de resturi de tirozină.

Colagenul este cel mai bine caracterizat antigen proteic, determinanții antigenici ce mediază formarea anticorpilor umorali fiind clar delimitați. [36,38,39,60] Preparat în condiții aseptice prezintă probleme speciale, iar la tărâie ionică și pH fiziologice tinde să se agregheze la 37°C, forma stabilă în aceste condiții fiind starea denaturată.

Locurile responsabile de antigenitate în tropocolagen sunt vulnerabile la acțiunea proteazelor. Acestea sunt situate în regiunile scurte, de dezordine din lanț, care sunt, totodată, și locuri de reticulare. Localizarea activității antigenice în telopeptide furnizează posibilitatea investigării fibrilogenezei, controlului hemostatic și defectelor patologice ale colagenului.

1.3. Biodegradabilitatea

Colagenul, având structură proteică, este biodegradabil. În țesuturi este degradat prin procese catabolice ce includ degradarea cu collagenaze specifice și fagocitoza. Collagenazele au capacitatea unică de a rupe lanțurile α într-un singur loc. Clivând numai lanțurile principale, biodegradarea cu collagenaze permite evaluarea gradului de reticulare. Cantitatea de tripsină măsoară extinderea denaturării. Fibrilele sunt degradate de la exterior, iar moleculele din interior devin accesibile proteazelor progresiv. [74]

Biodegradarea colagenului *in vivo* este un proces complex, cu particularități dependente de tipul de colagen. Cea *in vitro* este stimulată de incubarea cu collagenază bacteriană, catepsină, pepsină ori tripsină, teste ce permit compararea materialelor similare, dar corelarea cu degradarea *in vivo* este dificilă. [89-92]

1.4. Controlul biodegradabilității prin reticulare

Absorbția și viteza de biodegradare se reglează prin reticularea chimică suplimentară a colagenului, [81, 93-98] efectuată pentru a mări timpul de viață al biomaterialulelor și stabilitatea biologică.

Reticularea colagenului nativ și a celui denaturat se realizează prin tratamente fizice sau chimice.

1.4.1. Reticularea prin procedee fizice

Metodele fizice de reticulare reduc riscurile de citotoxicitate, neimplicând compuși chimici.

Radiațiile ultraviolete produc radicali liberi, concentrați în special în ciclurile aromatice ale resturilor de tirozină și fenilalanină, dar expunerea prelungită produce denaturarea colagenului. Metoda nu permite obținerea de biomateriale puternic reticulate. [100] În funcție de prezența apei, **radiațiile γ** produc efecte diferite: în absență se rup lanțurile polipeptidice, iar în prezență – reticularea. [100]

Deshidratarea termică se efectuează prin încălzirea biomaterialelor solide în vacuum câteva zile la 110°C și 100 torr, [101] condiții care elimină apa din molecule, conducând la legături între lanțuri.

1.4.2. Reticularea chimică

Reticularea chimică are următoarele avantaje: reduce antigenitatea biomaterialelor, îmbunătățește stabilitatea mecanică și biologică și, în unele forme de tratament, micșorează calcifierea. [101, 109]

Cei mai utilizați agenți sunt aldehidele. Tratamentul reduce imunogenitatea materialelor [107] și mărește rezistența la degradare enzimatică [50], dar crește citotoxicitatea. [104, 108] Carbodiimidele reticulează fără interpunerea agentului, deci colagenul nu conține fragmente străine. [109, 110]

Alternativă la reticularea covalentă este cea prin legături ionice, care nu generează reziduuri potențial toxice. Polielectroliți cationici ca chitosanul formează legături ionice între grupele sale amină și carboxil ale colagenului, formând complecși care măresc rezistența mecanică. [113]

1.5. Rolul colagenului în managementul rănilor

Principală funcție a tipurilor de colagen I-III este de schelet pentru formarea țesuturilor conjunctive. La începutul vindecării se depune întâi tipul III, iar cantitatea de tip I se mărește pe parcurs. [114]

Colagenul tip I, pe lângă rolul de componentă principală a țesutului cicatriceal, are rol cheie în: [114] controlul răspunsului inflamator la injuriu și reparare, influențând mitogeneza celulară, diferențierea și migrarea; sinteza proteinelor în matricea extracelulară; sinteza și eliberarea citochinelor și factorilor de creștere; interacțiunea dintre enzimele care remodelează MEC, inclusiv metaloproteinaza matriceală.

1.5.1. Colagenul în vindecarea rănilor cronice

În rănilor cronice ale pielii – răni care nu se închid în condiții optime în șase săptămâni, [128] procesul interactiv descris este degradat. Cauza cronicității este de obicei infecția, ce variază de la creșterea colonizării microbiene până la creșterea critică a contaminării și suprainfecție.

Factori extrinseci (diabetul sau fumatul) și intrinseci (presiunea oxigenului și răspunsul inflamator local excesiv) pot afecta direct metabolismul colagenului și încetini vindecarea. [114]

1.5.2. Colagenul în vindecarea rănilor cronice

Pansamentele de colagen sunt avantajoase pentru tratarea rănilor datorită funcțiilor sale în vindecare: [114, 131] inhibarea/dezactivarea metaloproteinelor matriceale; mărirea producerii de fibroblaste și permeabilității; aportul în preluarea și biodisponibilitatea fibronectinei; ajutorul în protejarea

leucocitelor, macrofagelor, fibroblastelor și celulelor epiteliale; ajutorul în menținerea micromediului chimic și termic.

Pansamentele poroase sunt eficiente în vindecarea rănilor de diferite etiologii. [133-135] Utilizarea materialelor colagenice pare să fie eficientă nu numai din punct de vedere clinic ci și al costului. [136-139]

Bibliografie

6. M. Chvapil, Reconstituted collagen, în "Biology of collagen", ed. A. Viidik și J. Vuust, Academic Press, London, **1980**.
7. K.P. Rao și T. Josep, Collagen graft copolymers and their biomedical applications, în "Collagen Biotechnology", ed. M. E. Nimni, CRC Press, Boca Raton, **1988**.
8. G. Goissis, L. Piccirili, J.C. Goes, A. M. De Guzzi Plepis și D.K. Das-Gupta, Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties, *Artificial Organs* 22, 203-209, **1998**.
9. S. Omura, N. Mizuki, S. Horimoto, R. Kawabe și A. Fujita, A newly developed collagen/silicone bilayer membrane as a mucosal substitute: a preliminary report, *British J. Oral Maxillofacial Surg.* 35, 85-91, **1997**.
15. V. Trandafir, și M.G. Albu, Achievement and Perspectives in the collagen-based biomaterials, *International Symposium Advanced Materials and Processes for Ecological Manufacturing of Leathers*, București, Nov. 2nd, **2007**.
16. V. Trandafir, Z. Vuluga, V. Danciu, M.G. Albu, R. Trușcă și C. Iancu, Collagen-based composite aerogels for medical applications, *International Symposium Advanced Materials and Processes for Ecological Manufacturing of Leathers*, București, November 2, **2007**.
17. D. Schuppan, M. Schmidt, R. Somasundaram, R. Ackermann, M. Ruehl, T. Nakamura și E.O. Riecken, Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor, *Gastroenterology* 114, 139-152, **1998**.
18. Y. Yamaguchi, D.M.Mann și E. Ruoslahti, Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin, *Nature* 346, 281-284, **1990**.
21. S.R. Frenkel, B. Toolan, D. Menche, M.I. Pitman și J.M. Pachence, Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair, *J. Bone Jt. Surg.* 79-B, 831-836, **1997**.
22. S. Wakitani, T. Kimura, A. Hirooka, T. Ochi, M. Yoneda, N. Yasui, H. Owaki și K. Ono, Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel, *J. Bone Jt. Surg.* 71-B, 74-80, **1989**.
25. E.D. Hay, Extracellular matrix, *J. Cell Biol.* 91, 205-223, **1981**.
33. F.O. Schmitt, L. Levine, M.P. Drake, A.L. Rubin, D. Pfahl și P.F. Davison, The antigenicity of tropo-collagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 493-497, **1964**.
34. P.F. Davison, L. Levine, M.P. Drake, A. Rubin și S. Bump, The serologic specificity of tropocollagen telopeptides, *J. Exp. Med.* 126, 331-346, **1967**.
35. C. Steffen, R. Timpl și I. Wolff, Immunogenicity and specificity of collagen. V. Demonstration of three different antigenic determinants on calf collagen. *Immunol.* 15, 135-144, **1968**.
36. D. Michaeli, G.R. Martin, J. Kettman, E. Benjamini, D.Y. Leung și B.A. Blatt, Localization of antigenic determinants in the polypeptide chains of collagen, *Sci.* 166, 1522-1524, **1969**.
37. H. Furthmayr, W. Beil și R. Timpl, Different antigenic determinants in the polypeptide chains of human collagen, *FEBS Lett.* 12, 341-344, **1971**.
38. H. Lindsley, M. Mannik și P. Bornstein, The distribution of antigenic determinants in rat skin collagen, *J. Exp. Med.* 133, 1309-1324, **1971**.
39. R. Timpl, W. Beil, H. Furthmayr, W. Meigel și B. Pontz, Characterization of conformation independent antigenic determinants in the triple-helical part of calf and rat collagen, *Immunol.* 21, 1017-1030, **1971**.
40. H. Furthmayr și R. Timpl, Immunochemistry of collagens and procollagens, *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 7, 61-99, **1976**.
41. K.S. Weadock, E.J. Miller, E.L. Keuffel și M.G. Dunn, Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions, *J. Biomed. Mater. Res.* 32, 221-226, **1996**.
42. M.D. Harriger, A.P. Supp, G.D. Warden și S.T. Boyce, Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice, *J. Biomed. Mater. Res.* 35, 137-145, **1997**.
50. K.R. Meade și F.H. Silver, Immunogenicity of collagenous implants, *Biomater.* 11, 176-180, **1990**.
60. R. Timpl, P.P. Fietzek, H. Furthmayr, W. Meigel și K. Kühn, Evidence for two antigenic determinants in the C-terminal region of rat skin collagen, *Fed. Eur. Biochem. Soc. (FEBS) Lett.* 9, 11-17, **1970**.
74. H.G. Welgus, J.J. Jeffrey, G.P. Stricklin, W.T. Roswit și A.Z. Eisen, Characteristics of the action of human skin fibroblast collagenase on fibrillar collagen, *J. Biol. Chem.* 255, 6806-6813, **1980**.
81. M.E. Boon, J.M. Ruijgrok și M.J. Vardaxis, Collagen implants remain supple not allowing fibroblast ingrowth, *Biomater.* 16, 1089-1093, **1995**.
89. A.M. Diamond, S.D. Gorham, D.J. Etherington, J.G. Robertson și N.D. Light, The effect of modification on the susceptibility of collagen to proteolysis: I. Chemical modification of amino acid side chains, *Matrix* 11, 321-329, **1991**.
90. J. Megerman, E. Reddi, G.J. L'Italien, D.F. Warnock și W.M. Abbott, A laboratory model to quantitate the resistance of collagen vascular grafts to biodegradation, *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 295-313, **1991**.
91. I.V. Yannas, J.F. Burke, C. Huang și P.L. Gordon, Correlation of in vivo collagen degradation rate with in vitro measurements, *J. Biomed. Mater. Res.* 9, 623-628, **1975**.
92. T. Okada, T. Hayashi și Y. Ikada, Degradation of collagen suture in vitro and in vivo, *Biomater.* 13, 448-454, **1992**.
93. R.F. Oliver, R.A. Grant, R.W. Cocs și A. Cooke, Effect of aldehyde crosslinking on human dermal collagen implants in the rat, *Br. J. Exp. Path.* 61, 544-549, **1980**.

94. N. Olmo, J. Turnay, J. Herrera, J.G. Gavilanes și A. Lizarbe, Kinetics of in vivo degradation of sepiolite-collagen complexes: effect of glutaraldehyde treatment, *J. Biomed. Mater. Res.* 30, 77-84, **1996**.
95. L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijktra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis și J. Feijen, In vitro degradation of dermal sheep collagen crosslinked using a water-soluble carbodiimide, *Biomater.* 17, 679-684, **1996**.
96. L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijktra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis și J. Feijen, Changes in the mechanical properties of dermal sheep collagen during in vitro degradation, *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 139-147, **1995**.
97. L.H.H. Olde Damink, Structure and properties of crosslinked dermal sheep collagen, Ph. D. Thesis, University of Twente, The Netherlands, **1992**.
98. K. Anselme, H. Petite și D. Herbage, Inhibition of calcification in vivo by acyl azide crosslinking of a collagen-glycosaminoglycan sponge, *Matrix* 12, 264-273, **1992**.
100. B. Chevallay și D. Herbage, Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy, *Med. Biol. Eng. Comput.* 38, 211-218, **2000**.
101. K.S. Weadok, R.M. Olsen și R.H. Silver, Evaluation of collagen crosslinking techniques, *Biomater. Med. Dev. Artif. Org.* 11, 294-318, **1984**.
104. I. Rault, V. Frei, D. Herbage, N. Abdul-Malak și A. Huc, Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 7, 215-221, **1996**.
107. K.R. Meade, și F.H. Silver, Immunogenicity of collagenous implants, *Biomater.* 11, 176-180, **1990**.
108. A. Jayakrishnan și S.R. Jameela, Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthetic and drug delivery matrices, *Biomater.* 17, 471-84, **1996**.
109. H.M. Powell și S.T. Boyce, EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability, *Biomater.* 27, 5821-5827, **2006**.
110. H.M. Powell și S.T. Boyce, Wound closure with EDC cross-linked cultured skin substitutes grafted to athymic mice, *Biomater.* 28, 1084-1092, **2007**.
113. F. Berthod, G. Saintigny, F. Chretien, D. Hayek, C. Collombel și O. Damour, Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage, *Clin. Mater.* 15, 259-265, **1994**.
114. A. Rangaraj, K. Harding și D. Leaper, Role of collagen in wound management, *Wounds UK* 7, 54-63, 2011.
128. T.A. Mustoe, K. O'Shaughnessy și O. Kloeters, Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying
131. D. Brett, A review of collagen and collagen-based dressings, *Wounds* 20, 347-353, **2008**.
133. M.P. Curran și G.L. Plosker, Bilayered bioengineered skin substitute (Apligraf). A review of its use in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers, *Biodrugs* 16, 439-455, **2002**.
134. H.P. Ehrlich, Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds, *Am. J. Surg.* 187, 29S-33S, **2004**.
135. K.G. Harding, T. Kreig și S.A. Eming, Efficacy and safety of the freeze-dried cultured human keratinocytes lysate, LymphoDerm 0.9%, in the treatment of hard-to-heal venous leg ulcers, *Wound Rep. Regen.* 13, 138-147, **2005**.
136. M. Ehrenreich și Z. Ruszczak, Update on tissue-engineered biological dressings, *Tissue Eng.* 12, 1-18, **2006**.
137. D.R. Baillie, P. Stawicki, N. Eustance, D. Warsaw și D. Desai, Use of human and porcine dermal-derived bioprostheses in complex abdominal wall reconstructions: a literature review and case report, *Ostomy Wound Management* 53, 30-39, **2007**.
138. K.S. Jehle, A. Rohatgi și MK Baig, Use of porcine dermal collagen graft and topical negative pressure on infected open abdominal wounds, *J. Wound Care* 16, 3637, **2007**.
139. D.M. Parker, P.J. Armstrong, J.D. Frizzi și J.H. North, Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction, *Curr. Surg.* 63, 255-258, **2006**.

2. ACIDUL TANIC

Taninii, produse vegetale larg raspândite, pot fi hidrolizabili și condensati [1]. Taninii hidrolizabili sunt esteri ai zaharurilor, în special ai glucozei, și ai acizilor carboxilici fenolici, ca galic și elagic. Compusul model este acidul tanic (AT) – 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-D-glucoza. [2]

2.1. Structură și proprietăți

AT este forma comercială de tanin. [5] Acesta este o pentagaloilglucozidă – partea centrală a moleculei – esterificată la grupele hidroxilice cu acid galic și este un tanin hidrolizabil (figura 3.1). [6, 7] Formula moleculară brută a AT este $C_{76}H_{52}O_{46}$ și are masa 1701,2 g.mol⁻¹. [4]

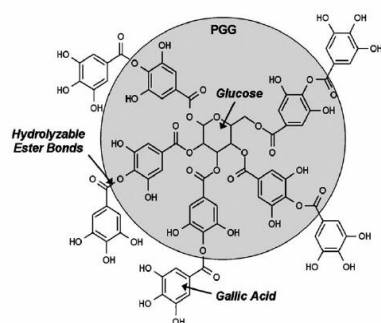


Figura 3.1. Structura acidului tanic

Alte denumiri: acid gallotannic, digallic sau tanin din coajă de stejar. [4]

Acizii tanici au următoarele proprietăți fizice: pudre amorfe albe, ușor gălbui sau ușor maronii, inodore sau cu miros caracteristic slab și gust puternic astringent, foarte solubile în apă – 2850 g/L, solubile în alcool și acetonă, aproape insolubile în benzen, cloroform și eter, se descompun fără să se topească peste 200°C și sunt acizi slabi, cu valori ale pH-ului cuprinse între 3 și 6.

Datorită grupelor hidroxil fenolic libere formează legături de hidrogen puternice cu proteinele și cu

carbohidrații, cu formare de complecși. [8] În plus, la formarea complecșilor cu proteine mai pot contribui și interacțiunile hidrofobe. [9]

2.2. Utilizările acidului tanic în medicină

În anii '20 AT s-a introdus pentru tratarea arsurilor grave. În anii următori a devenit terapie standard pentru pacienții cu arsuri, [10] datorită reducerii semnificative a gradului de toxemie și reducerii masive a ratei mortalității. [11] Utilizarea sa prezintă și alte avantaje: precipitarea locală a proteinelor, ce reduce sau elimină durerea; prevenirea pierderii de plasmă; limitarea infecției secundare și diminuarea cantității de țesut cicatricial.

Activitatea antimicrobiană a AT este bine documentată: inhibă creșterea multor funghi, levuri, bacterii și viruși. [14-17] AT prezintă și altele efecte benefice: activitate antimutagenică și anticancerigenă; [14] inducerea apoptozei în celule animale; [18] implicarea în sistemul hilauronidazei, producându-i distrugerea la fel ca echinacea și potențându-i efectul, apărând celulele de invazia virală; [19] acțiune antioxidantă [18] și inhibarea activității collagenazei din *Clostridium histolyticum*, prevenind degradarea collagenului din MEC. [20]

Biodegradabilitatea poate fi redusă prin reticulare. Aceasta îmbunătățește proprietățile mecanice și reduce degradarea enzimatică și termică, reglînd timpul de viață al biomaterialului. [24]

Ținând seama de structura AT și de multitudinea grupelor funcționale ale collagenului, între cele două componente se formează legături de hidrogen, interacțiuni ionice, legături hidrofobe și covalente. [27]

AT este taninul cu cea mai mare afinitate pentru collagen. [35, 36] Având grupe hidroxil și carboxil diferite, formează legăturile de hidrogen în mai multe puncte, dând stabilitate suplimentară collagenului. [38]

Collagenul tip I reticulat cu acid tanic prezintă avantajele de a avea stabilitate enzimatică bună, iar biocompatibilitatea și viteza de vindecare a rănilor sunt semnificativ mai mari decât ale celui nativ. [41]

Data fiind acțiunea AT de a inhiba acțiunea collagenazei în MEC, [19] este agent de reticulare valoros, prezentând citotoxicitate redusă, precum și proprietăți antimicrobiene și antiinflamatorii. [41]

Bibliografie

1. E. Haslam, "Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action", Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
2. J.D. Reed, Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes, J. Anim. Sci. 73, 1516-1528, **1995**.
5. E. Haslam, "Chemistry of Vegetable Tannins", Academic Press, London, 1966.
6. I. Mueller-Harvey, Analysis of hydrolysable tannins, Animal Feed Sci. Technol. 91, 3-20, **2001**.
7. J.C. Isenburg, D.T. Simionescu și N.R. Vyavahare, Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall, Biomater. 26, 1237-1245, **2005**.
8. E. Haslam, "Plant Polyphenols-Vegetable Tannins", Revisited, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
9. H.I. Oh, J.E. Hoff, G.S. Armstrong și L.A. Haff, Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes, J. Agric. Food Chem. 28, 394-399, **1980**.
10. E.C. Davidson, Tannic acid in the treatment of burns, Surg. Gynecol. Obstet. 41, 202-221, **1925**.
11. S.B.A. Halkens, A.J.J. Van den Berg, M.J. Hoekstra, J.S. Du Point și R.W. Kreis, The use of tannic acid in the local treatment of burn wounds: intriguing old and new perspectives, Wounds 13, 144-158, **2001**.
14. A. Scalbert, Antimicrobial Properties of Tannins, Phytochem. 30, 3875-3883, **1991**.
15. K.-T. Chung, T. Y. Wong, C.-I. Wei, Y.-W. Huang și Y. Lin, Tannins and human health: a review, Critical Rev. Food Sci. Nutr. 38, 421-464, **1998**.
16. M.M. Covan, Plant Products as Antimicrobial Agents, Clin. Microbiol. Rev. 12, 564-582, **1999**.
17. S.M. Colak, B.M. Yapici și A. Yapici, Determination of antimicrobial activity of tannic acid in pickling process, Rom. Biotechnolog. Lett. 15, 5325-5330, **2010**.
18. N.S. Khan, A. Ahmad și S.M. Hadi, Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA, Chem.-Biol. Interact. 125, 177-189, **2000**.
19. <http://www.appliedhealth.com/nutri/page8477.php>
20. G. Krishnamoorthy, P.K. Sehgal, A.B. Mandal și S. Sadulla, Studies on collagen-tannic acid-collagenase ternary system: Inhibition of collagenase against collagenolytic degradation of extracellular matrix component of collagen, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2011 Aug 8; 21823836, (doi:10.3109/14756366.2011.596834).
24. R. Lanza, R. Langer și J. Vacanti, "Principles of Tissue Engineering" ed. 2-a, Elsevier, San Diego, 2000.
27. B. Madhan, V. Subramanian, J. Raghava Rao, B. Unni Nair și T. Ramasami, Stabilization of collagen using plant polyphenols: Role of catechine, Int. J. Biol. Macromol. 37, 47-53, **2005**.
35. Y. Fuaesaku, V. Mizuhira și H. Nakamura, The new fixation method using tannic acid for electron microscopy and some observations of biological specimens, Proceedings of the 4th International Congress on Histochemistry and Cytochemistry, ed. T. Takeuchi, K. Ogawa și S. Fujita, 155, 1972.
36. K. M. Meek, The use of glutaraldehyde to preserve reconstituted collagen for electron microscopy, Histochem. 73, 115-120, **1981**.
38. B. Madhan, P. Thanikaivelan, V. Subramanian, J. Raghava Roa, B.U. Nair și T. Ramasami, Molecular mechanics and dynamics studies on the interaction of gallic acid with collagen like peptides, Chem. Phys. Lett. 346, 334-340, **2001**.

3. DIGLUCONATUL DE CLORHEXIDINĂ

3.1. Structură și proprietăți

Clorhexidina (CH), bisbiguanidă sintetică cu două cicluri 4-clorofenilice și două grupe biguanidă legate printr-un lanț hexametenic, [2] a fost descoperită în 1946 și introdusă în practica clinică în 1954. [1]

Pudră cristalină albă, cu formula $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, masa 505,45 g/mol, temperatura de topire 134-136°C, CH este foarte puțin solubilă în apă (0,8 g/L la 20°C) și nu se poate utiliza ca atare pentru obținerea biomaterialelor colagenice. Fiind bază, este stabilă sub formă de săruri: [3] digluconat (DGCH), diacetat și diclorhidrat. În practica clinică se utilizează mai ales digluconatul, în special pentru antisepsia pielii. [4]

Antisepticele distrug microorganismele sau inhibă creșterea pe suprafețele țesuturilor vii și în interior [7, 8] și se administrează doar topic. DGCH îndeplinește condițiile impuse unui antiseptic ideal.

DGCH este activ pe interval larg de pH, între 5 și 8, [15] care include pH-ul fiziologic al pielii. Este bază puternică la acest pH și prezintă cea mai mare activitate. [16] Prin disociere formează dicationi cu sarcinile pozitive pe atomii de azot din capetele punții hexametenice. [17, 18] Caracterul cationic face posibilă legarea de pereții celulelor bacteriene, [19] prezentând proprietatea unică de substantivitate. [3]

3.2. Mecanismele de acțiune antibacteriană

Fiind solubil în apă și bază puternică la pH-ul fiziologic al pielii, DGCH disociază complet la acest pH, eliberând dicationi CH. [20] Aceștia, fiind lipofili, interacționează cu fosfolipidele și lipopolizaharidele din membranele celulelor bacteriilor la concentrații mici, favorizând intrarea în celulele bacteriilor. [21] Eficacitatea antimicrobiană se datorează deci interacțiunilor dicationilor CH cu grupele fosfat și carboxil din componența pereților celulelor microbiene. [22] Astfel echilibrul osmotic al celulelor este alterat, permeabilitatea pereților celulari mărită și dicationi pătrund în bacterii, [3] perturbând procesele metabolice. Dicationii CH afectează indirect și funcția enzimatică a dehidrogenazei și ATP-azei din pereții celulari. [21] La concentrații mici DGCH are efect bacteriostatic, iar la concentrații mari – bactericid.

DGCH este și agent antifungic eficient, capabil să distrugă nu numai fungii, ci și sporii. [8] Nu este sporicid, însă previne dezvoltarea sporilor, inhibându-le efectul, dar nu germinarea. [23]

Bibliografie

1. A.D. Russell, Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria, J. Appl. Microbiol. 92 Suppl, 121S-135S, **2002**.
2. G. Greenstein, C. Berman și R. Jaffin, Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy, J. Periodontol. 57, 370-376, **1986**.
3. Z. Mohammadi, Chlorhexidine gluconate, its properties and applications in endodontics, Iranian Endodontic J. 1, 113-125, **2008**.
4. T.J. Karpanen, T. Worthington, E.R. Hendry, B.R. Conway și P.A. Lambert, Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of Staphylococcus epidermidis, J. Antimicrobial Chemotherapy 62, 1031-1036, **2008**.
7. S.S. Block, Definition of terms, în "Disinfection, Sterilization, and Preservation", ed. S.S. Block, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
8. G. McDonell și A.D. Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, Clin. Microbiol. Rev. 12, 147-179, **1999**.
16. http://www.burmester-pharma.de/deutsch/analyse_datenblatt/a1929.pdf
17. A. Albert și E.P. Sargeant, "Ionization Constants of Acids and Bases", Methuen, London, 1962.
18. C.G. Jones, Chlorhexidine: Is it still the gold standard?, Periodontology 15, 55-62, **2000**.
19. W.J. Loesche, Chemotherapy of dental plaque infections, Oral Sci. Rev. 9, 65-107, **1976**.
20. G. Greenstein, C. Berman și R. Jaffin, Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy, J. Periodontol. 57, 370-376, **1986**.
21. B. Athanassiadis, P.V. Abbott și L.J. Walsh, The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics, Aust. Dent. J. 52, S64-S82, **2007**.
22. B.P. Gomes, S.F. Souza, C.C. Ferraz, B.P. Teixeira, A.A. Zaia, L. Valdrighi și F.J. Souza-Filho, Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro, Int. Endod. J. 36, 267-275, **2003**.
23. A.D. Russell și M.J. Day, Antibacterial activity of chlorhexidine, J. Hosp. Infect. 25, 229-238, **1993**.

4. MATERIALE ȘI METODE

4.1. Materiale

Colagenul fibrilar tip I a fost furnizat de Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Textile Încălțăminte, sucursala Institutul de Cercetare Pielărie și Încălțăminte, INTDTI-ICPI București.

DGCH (soluție apoasă cu concentrația 20%) a fost achiziționat de la firma Fargon, Germania.

AT a fost cumpărat de la firma Sigma-Aldrich, Germania.

AG (soluție apoasă cu concentrația 25%) a fost procurată de la firma Merck, Germania.

Colagenaza tip I din *Clostridium histolyticum* s-a achiziționat de la Sigma-Aldrich, Germania.

4.2. Metode de analiză

Hidrogelurile de colagen s-au caracterizat prin metode fizico-chimice rapide, FT-IR, dicroism circular, reologie staționară și dinamică, iar matricile poroase prin spectroscopie FT-IR, SEM și absorbția apei. Matricile cu amestecuri de AT și DGCH s-au supus degradării enzimaticе și evaluării eliberării AT.

4.2.1. Metode fizico-chimice rapide

Metodele rapide pentru caracterizarea hidrogelurilor inițiale de colagen cuprind determinarea conținuturilor de: substanță uscată, cenușă, azot total, substanță proteică, substanță grasă și pH.

4.2.2. Spectroscopie FT-IR

FT-IR s-a utilizat pentru identificarea grupelor funcționale, analiza structurii terțiare a colagenului și evidențierea interacțiunilor cu alte substanțe (aparatură IR 6000 cu sistem ATR de reflexie MKII Golden Gate Single, Jasco, cu domeniul spectral 4000 și 200 cm^{-1}).

4.2.3. Dicroism circular

UV-DC s-a utilizat pentru evidențierea structurii de helix triplu a colagenului din hidrogeluri. Spectrele UV-DC s-au obținut cu un spectropolarimetru Jasco J-810, în domeniul 250-195 nm.

4.2.4. Microscopie electronică de scanare cu baleiaj

Caracterizarea morfologică a matricilor s-a făcut prin microscopie electronică de scanare (SEM). Imaginile s-au înregistrat cu un microscop Hitachi S-2600N cu rezoluție de 4 nm (la 25 kV, în vid înaintat în cazul utilizării detectorului de electroni secundari) și tensiuni de accelerare de la 0,5 până la 30 kV.

4.2.5. Metode reologice

Viscozitățile, destructurarea și restructurarea hidrogelurilor s-au determinat prin reologie staționară, iar comportarea viscoelastică prin reologie dinamică. Determinările staționare s-au efectuat cu un reoviscozimetru Haake VT 550 echipat cu sistemul de senzori MV1 pentru viscozități medii și software RheoWin 4 Thermo Fischer Scientific. Măsurătorile dinamice s-au făcut cu microreometrul Micro Fourier Transform Rheometer MFR 2100, GBC, Australia, care funcționează în regim de curgere sub compresie.

4.2.6. Absorbția apei

Aprecierea gradelor de reticulare a matricilor și a capacității de a absorbi fluide biologice s-a făcut prin absorbția apei la temperatura camerei.

4.2.7. Degradarea enzimatică in vitro

Rezistența la digestia cu colagenază s-a studiat în condiții fiziologice, prin incubarea probelor în soluție de colagenază 1 $\mu\text{g/mL}$ în soluție tampon fosfat salină cu pH 7,4 la 37°C, utilizând colagenază din *Clostridium histolyticum* cu activitatea 125 U/mg. Degradarea a fost urmărită timp de 9 zile.

4.2.8. Evaluarea cedării medicamentelor

Cantitățile de AT eliberat din matrici s-au determinat cu dispozitivul USP cu celule "sandwich". Concentrația acidului tanic s-a determinat prin spectrofotometrie UV, la lungimea de undă de 276 nm.

5. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR DE COLAGEN ÎNȚIAL, CU ACID TANIC, DIGLUCONAT DE CLORHEXIDINĂ SAU AMESTECURI ALE ACESTORA

Hidrogelurile – sisteme coloidale semisolide cu fază dispersată aposă și mediu de dispersie solid, [1,2] sunt definite ca rețele tridimensionale ale polimerilor hidrofilii capabile să absoarbă cantități mari de apă sau fluide biologice. [3-5] Consistența moale și conținutul mare de apă fac proprietățile asemănătoare cu ale țesuturilor. [8] Permeabile pentru moleculele dizolvate, sunt suporturi pentru eliberarea medicamentelor. [9-11]

Soluțiile/gelurile consistente de collagen sunt rețele tridimensionale de fibrile interțesute la întâmplare prin legături de hidrogen, interacțiuni ionice și forțe hidrofobe. Datorită numeroaselor grupe hidrofile înglobează cantități imense de apă [13] și au proprietăți mecanice slabe. Îmbunătățirea acestora se obține prin reticulare. Agenții chimici produc însă citotoxicitate și reducerea biocompatibilității. [14, 16-20]

Proprietățile hidrogelurilor sunt determinate de integritatea moleculelor din fibrile. Deci pentru obținere de biomateriale trebuie să fie foarte pur, iar moleculele să aibă conformație cât mai apropiată de cea nativă. Viscositatea este foarte importantă, influențând densitatea de reticulare, viteza de cedare a medicamentelor și dimensiunile porilor matricilor.

5.1. Hidrogelul inițial

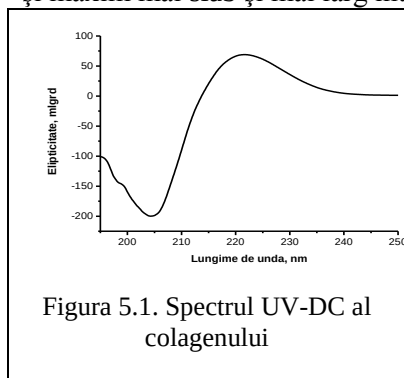
Hidrogelul inițial, extras din piele crudă de vițel prin tratamente bazice și acide, [23] s-a caracterizat prin puritate – prin metodele rapide și integritatea helixurilor triple ale moleculelor din fibrile.

5.1.1. Metode de analiză rapide

Metodele de caracterizare rapidă cuprind determinări de conținuturi de: substanță uscată (evaporare la etuvă la 105°C până la masă constantă) – 2,67%, azot total (metoda Kjeldal) – 0,47/17,6*, substanță proteică – din azotul total (înmulțire cu 5,67 – factorul de transformare a azotului în proteine) – 2,64/98,88*, cenușă (calcinare la 600-800°C până la masă constantă) – 0% și grăsimi (extracție cu eter de petrol și evaporare până la masă constantă) – 0%, la care se adaugă pH-ul. Valorile stelate sunt recalculate pentru substanța uscată.

5.1.2. Caracterizarea prin dicroism circular

Colagenul tip I are spectrul UV-DC asemănător cu al poli-L-prolinei II: minim intens la cca 200 nm și maxim mai slab și mai larg între 220 și 225 nm, atribuite structurii de helix triplu [24-27] (figura 5.1).



Spectrul UV-DC al collagenului obținut din hidrogelul inițial cu concentrația 0,35% în acid acetic 0,1 M, la 22°C, utilizând cuvă de cuarț de 0,2 mm și deschiderea fantei de 400 μm, are minimul situat la λ 204 nm, iar maximum la 221 nm, în concordanță cu literatura. [24-27] Punctul de elipticitate zero este 213,5 nm, dar raportul dintre intensitatea maximum și minimum, R_{pn}, este 0,35, mai mare ca valorile din literatură obținute în aceleași condiții (0,10-0,13 [27]). Aceasta se poate datora împachetării helicoidale mai avansate sau concentrației mai mari a collagenului. Valorile arată că în decursul extracției conformația de helix triplu a moleculelor de collagen nu a fost afectată, deci collagenul poate fi utilizat pentru prepararea de biomateriale.

5.2. Selectarea concentrației hidrogelului de collagen pentru prepararea biomaterialelor

Polielectrolit amfoter, collagenul are sarcină netă pozitivă în mediu acid, negativă în mediu bazic și interval izoelectric între 4,5 și 5,5. [28] Consistența hidrogelurilor și interacțiunea cu alte substanțe depinde de pH: viscozitățile, interacțiunile și stabilitățile la forfecare sunt maxime la pH 2,5-3,5 și la cca 7,5.

Pentru selectarea concentrației optime s-au preparat hidrogeluri cu concentrația 0,9, 1,1 și 1,3% collagen (masă/volum), cu pH acid (3,8) și slab bazic (7,4).

Reogramele obținute pentru hidrogelurile acide sunt reprezentate în figura 5.2.

Hidrogelurile se comportă pseudoplastic; viscozitățile aparente cresc cu concentrația collagenului.

Comportarea hidrogelurilor cu pH 7,4 este asemănătoare, dar valorile η* sunt mai mici.

Reogramele arată că pentru 0,9% collagen panta se micșorează ușor la viteza de 17 s⁻¹ la ambele pH-uri, deci hidrogelurile se destructurează ușor. La pH 7,4 se întâmplă același lucru și pentru 1,1% collagen.

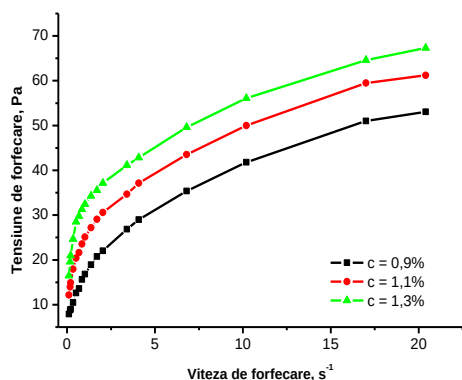


Figura 5.2. Reogramele pentru hidrogelurile acide cu concentrațiile menționate

Hidrogelurile având valori τ_0 , parametrii s-au calculat cu relația (5.2) (tabelul 5.2).

Valorile η_0 cresc cu concentrația collagenului la ambele pH-uri și sunt mai mari la o concentrație dată pentru cele acide. Și indicii de consistență, de 6,5-7,3 ori mai mari pentru cele acide, cresc cu concentrația collagenului, iar cei de curgere scad. Valorile subunitare ale indicilor de curgere confirmă

Tabelul 5.2. Parametrii reologici pentru hidrogelurile cu concentrațiile și pH-urile indicate

Concentrație gel, %/ parametru reologic	η_0 , Pa	K, Pa.s ⁿ	n
	pH 3,8		
0,9	1,553	16,321	0,394
1,1	1,857	23,641	0,314
1,3	2,504	29,835	0,259
	pH 7,4		
0,9	0,414	2,496	0,591
1,1	0,839	3,513	0,541
1,3	1,567	4,106	0,521

Parametrii ce descriu comportarea reologică a hidrogelurilor s-au determinat cu modelele utilizate frecvent pentru descrierea comportării pseudoplastice a fluidelor:

- Ostwald-de Waele, [31] pentru fluidele care nu prezintă tensiune limită de curgere:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (5.1)$$

unde τ este viteza de forfecare, K – indicele de consistență, iar n – indicele de curgere și

- Herschel-Bulkley: [32]

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (5.2)$$

unde τ_0 este tensiunea de la care începe curgerea sau tensiunea limită de curgere.

comportarea pseudoplastică a hidrogelurilor și creșterea caracterului pseudoplastic cu mărirea concentrației sale.

Comportarea reologică staționară arată că 1,1% este cea mai convenabilă concentrație, atât în ceea ce privește stabilitatea sub acțiunea forțelor de forfecare, cât și consistența. Deși hidrogelul slab bazic are doar jumătate din viscozitatea celui acid, creșterea concentrației la 1,3% nu este justificată de aportul la viscozitate.

5.3. Hidrogeluri cu acid tanic

AT leagându-se rapid și relativ ferm de collagen în mediu acid, s-au preparat hidrogeluri cu pH 3,8.

Pentru a stabili cantitatea optimă de AT pentru reticulare, în hidrogelul acid cu concentrația 1,1% s-a introdus 5, 10 și 15% AT raportat la cantitatea de collagen din hidrogel.

Hidrogelul cu 5% AT este mai opalescent și mai viscos decât martorul; cel cu 10% AT este asemănător, cu opalescență și viscozitate mai mari. Fragilitatea crește, agitarea producând fragmentarea, dar în stare de repaus redevine omogen. Pentru 15% AT opalescența și viscozitatea cresc, apare o slabă neomogenitate, fragmentarea este mai accentuată și timpul pentru a recăpăta aspectului inițial este mai lung.

Hidrogelurile s-au caracterizat structural – prin spectroscopie FT-IR și UV-DC – și reologic.

5.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Collagenul nedenaturat tip I este compus din 20 resturi de aminoacizi conectate prin legături C-N. Este constituit din secvențe oligomerice tripeptidice Gly-X-Y, [33] (Gly – rest de glicină, X și Y – resturile oricăruia dintre ceilalți aminoacizi). Acesta constituie **structura primară** a lanțului collagenului.

Glicina se află în lanțul α -polipeptidic în fiecare a 3-a poziție, iar prolina – Pro și hidroxiprolina – Hyp constituie 1/3 din resturile de aminoacizi; secvențele Gly-Pro-Hyp, caracteristice collagenului, sunt frecvente. Inflexibilitatea Pro și Hyp rigidizează lanțul și face imposibilă formarea helixului alfa, dar favorizează apariția spontană a helixului răsucit spre stânga, tip poliprolină II (PP II). [34] Conformația nu se poate stabiliza prin legături de hidrogen, grupele ce formează legăturile fiind în poziții nefavorabile. Stabilitatea este dată de repulsiile sterice ale ciclurilor pirolidinice din Pro și Hyp. [34] Helixul conține trei resturi de aminoacizi într-un pas, este mai extins decât alfa și exclude interacțiunile pe distanță mare. Aranjamentele structurilor primare constituie **structurile secundare** ale segmentelor, iar pentru collagen al lanțului polipeptidic în întregime. [35]

Trei helixuri răsucite spre stânga se răsucesc spre dreapta, în jurul unei axe centrale comune, formând helixul triplu, caracteristic moleculei de collagen nativ (tropocolagen), conformație numită

structură terțiară, [36-40] stabilizată de legăturile de hidrogen dintre lanțuri. Structurile terțiare reprezintă deci modul de autoasamblare a celor secundare în conformația tridimensională a moleculei de proteină.

În spectrul FT-IR s-au identificat următoarele benzi caracteristice collagenului: [42] 1640 și 1660 cm^{-1} – foarte intensă, datorate în special vibrațiilor de întindere ale legăturii C=O amidă, la care contribuie și legăturile de hidrogen cuplate cu vibrațiile de întindere C-N, bandă numită **amidă I**; 1500-1600 cm^{-1} – intensă, atribuită vibrațiilor de oscilație N-H (contribuție 60% [43, 44]) cuplată puternic cu întindere C-N din amină, denumită **amidă II**; semnalele din regiunea spectrală 1400-1200 cm^{-1} datorate întinderii legăturilor C-N cuplate cu oscilațiile N-H în plan din legăturile amidă, numite **amidă III**. Alte benzi atribuite grupelor amidă sunt: 3289 cm^{-1} – întindere N-H cuplată cu legături de hidrogen – **amidă A** și 2920 cm^{-1} – umăr, dat de întinderea asimetrică a CH_2 – **amidă B**. Mai slabe apar la: 1450 cm^{-1} – oscilație CH_2 , 1260 cm^{-1} – oscilație N-H cuplată cu întindere C-N, 1078 și 1021 cm^{-1} – întindere C-O și 804 cm^{-1} – întinderea scheletului moleculei.

Benzile amidă I și II datorându-se absorbției produse de helixurile triple ale collagenilor, [47] se pot utiliza pentru a stabili păstrarea structurii native.

Pentru a determina conservarea conformației native/cantitatea de helixuri triple rămase se utilizează: (a) rapoartele absorbanțelor benzilor amidă III și de oscilație a grupei CH_2 de la 1450 cm^{-1} , A_{III}/A_{1450} – valoarea 1 sau mai mare arată că helixurile triple sunt intacte, iar cele mai mici – că au fost denaturate; (b) diferențele dintre numerele de undă ale benzilor amidă I și II, $(\nu A_{\text{I}} - \nu A_{\text{II}})$ – valori mai mari ca 100 cm^{-1} arată prezența collagenului denaturat. Utile sunt și rapoartele absorbanțelor benzilor amidă I și A, $A_{\text{I}}/A_{\text{A}}$, care reflectă extinderea reticulării: raport mare indică reticulare mai avansată. [48]

Spectrul FT-IR al collagenului din hidrogelul martor în intervalul 1700-1000 cm^{-1} este prezentat în figura 5.8, culoarea portocalie. În figură sunt date și spectrele hidrogelurilor cu cele trei procente de AT.

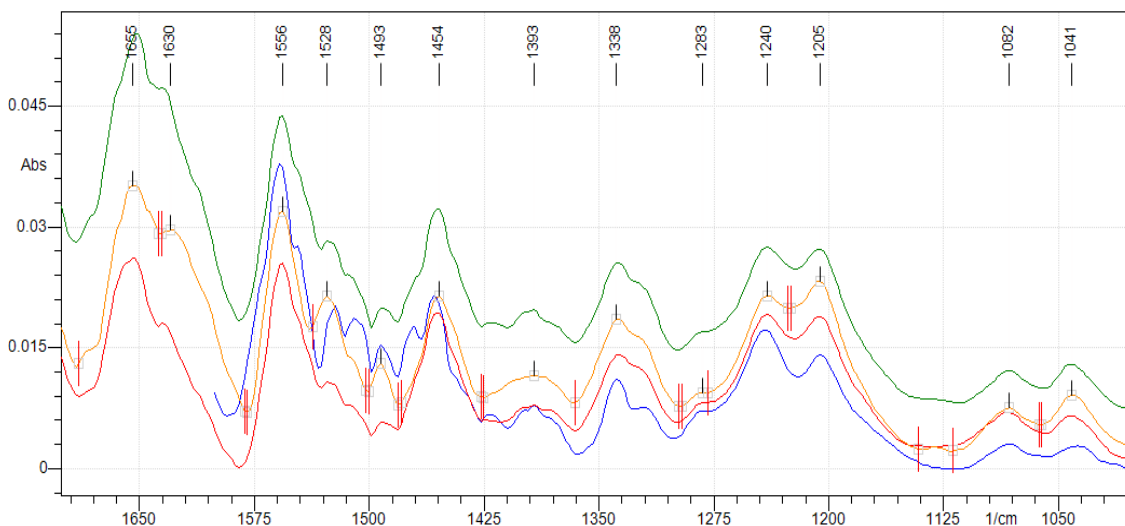


Figura 5.8. Spectrele FT-IR ale hidrogelurilor de collagen martor și cu AT: 5%; 10% și 15%

Tabelul 5.4. Numerele de undă ale benzilor amidă I-III, de oscilație a CH_2 și valorile $(\nu A_{\text{I}} - \nu A_{\text{II}})$ pentru hidrogelurile martor și cu AT

AT, %	Amidă I, cm^{-1}	Amidă II, cm^{-1}	Amidă III, cm^{-1}	CH_2 oscilație, cm^{-1}	$(\nu A_{\text{I}} - \nu A_{\text{II}})$, cm^{-1}
0	1655	1556	1240	1454	99
5	1655	1556	1242	1458	99
10	1655	1558	1240	1456	97
15	1657	1556	1240	1456	101

Figura arată benzi slabe și largi pentru hidrogelul martor, concentrația collagenului fiind mică. Banda amidă I apare la 1655 cm^{-1} , cu umăr la 1630 cm^{-1} și altele mai slabe de o parte și alta, amidă II la 1556 cm^{-1} – mai intensă și 1528 cm^{-1} – mai slabă, cu umeri la numere de undă

mai mici, amidă III la 1240 și 1205 cm^{-1} ; a grupei CH_2 la 1454 cm^{-1} , cu umeri de ambele părți, în concordanță cu valorile din literatură [49] (tabelul 5.4).

Liniile de bază ale benzilor fiind greu de delimitat, s-a renunțat la raportul A_{III}/A_{1450} și s-au folosit doar diferențele $(\nu A_{\text{I}} - \nu A_{\text{II}})$. Valoarea 99 cm^{-1} arată că martorul nu conține collagen denaturat.

AT nu conține benzi comune cu ale collagenului, cu excepția celei de la 1447 cm^{-1} , apropiată de cea a grupei CH_2 , dar aceasta este slabă pentru AT.

Benzile amidă I-III și 1454 cm^{-1} apar la aceleași numere de undă ca în collagenul nativ, dar amidă II se modifică: mărirea concentrației AT scade intensitatea celei de la 1528 cm^{-1} și apare umăr la 1545 cm^{-1} .

Diferențele dintre frecvențele benzilor amidă I și II sunt mai mici de 100 cm^{-1} , cu excepția concentrației de 15% AT, care este cu 1 cm^{-1} mai mare. Deci interacțiunile dintre collagen și AT nu afectează benzile caracteristice collagenului tip I nativ.

5.3.2. Caracterizarea prin pectroscopie UV-DC

Spectrul UV-DC al hidrogelului de collagen cu pH 3,8 este prezentat în figura 5.10 (negru).

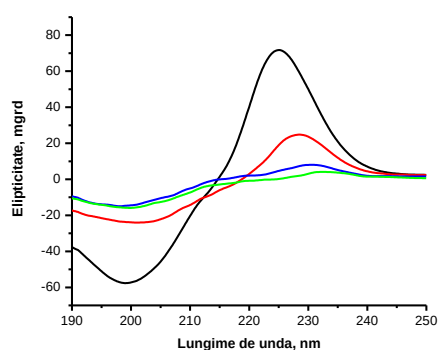


Figura 5.10. Spectrele UV-DC pentru hidrogelurile martor și cu AT: 5%; 10% și 15%

Comparându-l cu al collagenului inițial se constată diferențele: (a) minimumul este mult aplatisat; (b) maximumul pare mult mai ascuțit, dar aceasta se datorează scalei mult mai mari din figura 5.10 (de 6 ori); (c) minimumul este deplasat spre lungimi de undă mai mici (199 nm comparativ cu 204 nm); (d) maximumul se află la lungimi de undă mai mari – 225 față de 221 nm; (e) punctul de elipticitate zero se află la lungime de undă ceva mai mare, de 214,8 nm comparativ cu 213,5; (f) raportul Rpn este mare, de 3,54 ori mai mare decât cel obținut din spectrul din figura 5.1 pentru collagenul inițial.

O valoare Rpn așa de mare nu a fost găsită în literatura de specialitate, dar sunt raportate numai spectre pentru soluții diluate, sub 0,15%, pentru care valorile sunt cuprinse între 0,12 și 0,15. [26, 53, 54]

Hidrogelul utilizat la prepararea biomaterialelor fiind mult mai concentrat, pentru a stabili cauzele obținerii unui spectru cu forma și caracteristicile din figura 5.10 s-a întreprins un studiu privind efectul concentrației collagenului și deschiderii fantei spectropolarimetrului asupra caracteristicilor spectrului.

5.3.2.1. Efectul concentrației collagenului asupra spectrului UV-DC

S-a lucrat cu soluții de collagen molecular cu concentrații 0,1-1,0% în acid acetic 0,1 M, la deschiderea fantei de 400 μm și drum optic al celulei de 0,2 mm. Rezultatele sunt prezentate în figura 5.11.

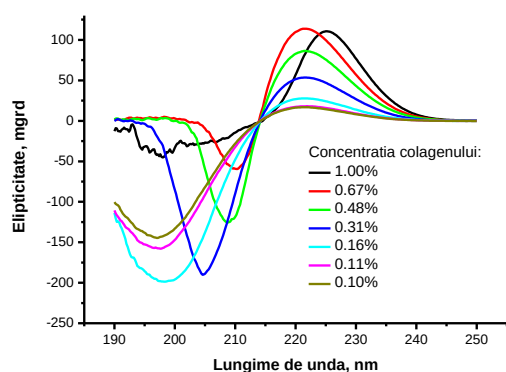


Figura 5.11. Efectul măririi concentrației collagenului asupra spectrului UV- DC

Creșterea concentrației collagenului mărește mult intensitatea maximumului dar poziția sa se păstrează, iar minimumul se deplasează mult spre valori mai mari ale λ , modificând valorile Rpn. Punctul de elipticitate zero este comun, la 214 nm, deci nu depinde de concentrație. Maximele au λ foarte apropiate pentru 0,10-0,67% (221,2-221,6 nm) și crește la 226 nm pentru 1%. Intensitatea maximumului crește liniar cu concentrația între 0,10 și 0,67%, iar între 0,67 și 1,00% scade ușor, cu consecințe asupra valorilor Rpn. Intensitățile minimelor variază astfel: cresc la mărirea concentrației collagenului de la 0,10 la 0,16%, scad puțin între 0,16 și 0,31%, mai mult între 0,31 și 0,67% și foarte puțin între 0,67 și 1,00%. Pozițiile se deplasează sensibil spre lungimi de undă mai mici la creșterea diluției între 0,67 și 0,10%, iar la 1% peak-ul este mai larg și mai puțin net, iar poziția sa mai

greu de stabilit. Din combinarea variațiilor intensităților celor două peak-uri cu creșterea concentrației collagenului rezultă pentru Rpn următoarea dependență de concentrație: între 0,10 și 0,31% crește puțin, de la 0,15 la 0,25; între 0,31 și 0,48% crește mai mult – de la 0,25 la 0,70; între 0,48 și 0,67% se mărește și mai mult, de la 0,70 la 1,9; peste 0,67% mărirea este din nou mai redusă, ajungând în final la 2,4.

5.3.2.2. Efectul deschiderii fantei

Opalescența sistemului alterează spectrul UV-DC, difuzia luminii putând depăși absorbția. Soluțiile de collagen sunt slab turbide, efect accentuat de concentrație. Utilizarea de cuve cu drum optic foarte mic și deschideri mari ale fantei reduce efectele, dar uneori factorul dispersiv nu poate fi diminuat suficient.

Sub 0,67% maximele și punctele de elipticitate zero nu sunt afectate de deschiderea fantei, dar la 1% scad ușor la creșterea deschiderii, fără modificarea poziției. Formele, intensitățile și lărgimile minimelor sunt însă puternic afectate pentru primele cinci concentrații: elipticitățile scad și lărgimile cresc la concentrație dată, efecte accentuate de concentrație. La 1% forma spectrului se modifică mult și este slab definit, fotomultiplicatorul nefuncționând optim din cauza opalescenței mari. Același lucru este de așteptat și peste 1%. Spectrul UV-DC are deci forma specifică collagenului doar la concentrații mici. [24-27] Intensitatea peak-ului negativ scăzând, iar a celui pozitiv crescând cu mărirea concentrației collagenului, Rpn crește și poate depăși unitatea. Deci valoarea 1,24 obținută pentru hidrogelul cu 1,1% collagen poate fi considerată corectă.

Pentru geluri sau soluții concentrate de collagen se poate propune deci drept criteriu pentru existența conformației de helix triplu a moleculelor în fibrile doar **existența peak-urilor pozitiv și negativ la lungimi de undă specifice collagenului, indiferent de valorile intensităților**. Existența helixurilor triple s-ar putea confirma prin diluare, când spectrele recapătă aspectul specific, dar numai când aceasta se poate face.

Revenind la efectul AT asupra collagenului, în tabelul 5.5 sunt date caracteristicile spectrelor cu AT.

Tabelul 5.5. Lungimile de undă, elipticitățile, punctele de elipticitate zero și valorile Rpn pentru hidrogelurile H1-H4

Hidrogel	Minim		Maxim		Punct de elipticitate zero, nm	Rpn
	λ , nm	θ , mgrd	λ , nm	θ , mgrd		
H1	199,0	-57,7	225,0	71,7	214,8	1,24
H2	200,8	-24,0	228,6	24,8	218,8	1,03
H3	198,2	-15,0	230,6	8,0	215,2	0,53
H4	199,8	-15,9	232,2	4,1	224,6	0,26

Figura 5.10 arată că toate minimele și maximele pentru hidrogelurile cu AT sunt mult mai aplatizate, rapoartele Rpn sunt mai mici, în special pentru cantități mai mari de AT, și punctele de elipticitate zero deplasare spre valori mai mari comparativ cu cele din collagen. Asemenea modificări fiind considerate dovezi de denaturare parțială a collagenului, [53, 54] s-ar putea crede că hidrogelurile conțin collagen denaturat, cu atât mai mult cu cât cantitatea de AT este mai mare. Dar diferențele ($v_{A_I} - v_{A_{II}}$) au valoare peste 100 cm^{-1} (101 cm^{-1}) numai pentru 15% AT. Deci datele FT-IR confirmă criteriul propus pentru aprecierea prezenței conformației native.

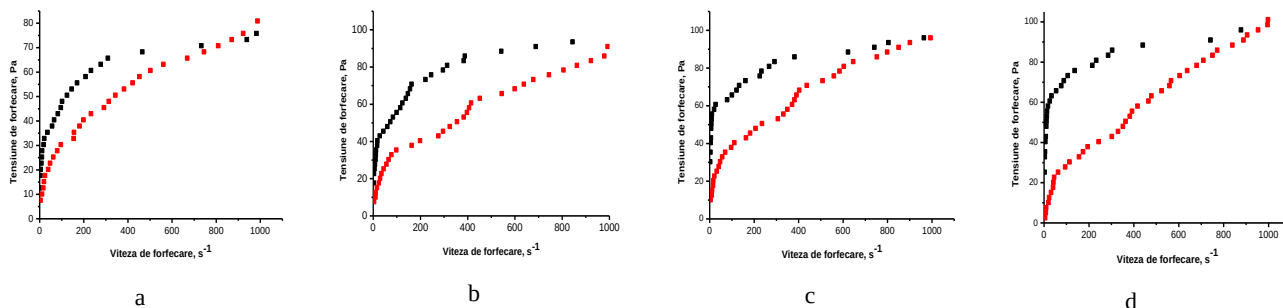
Considerând efectul turbidității asupra spectrului, modificările pentru hidrogelurile cu AT se pot atribui măririi opalescenței, ipoteză susținută de spectrele apropiate ale hidrogelurilor cu 10 și 15 % AT.

Sigur este faptul că mărirea concentrației AT deplasează ușor lungimea de undă a minimului spre valori mai mari, scade considerabil intensitatea maximului, crește lungimea de undă și scade valoarea Rpn.

5.3.3. Caracterizarea prin comportare reologică staționară

Comportarea reologică staționară permite determinarea consistenței și plasticității sistemelor disperse, [55] proprietăți ce permit prevederea comportării hidrogelurilor la aplicarea pe piele, a tehnicii de aplicare și a comportării la locul aplicării. Viscositatea determină întinderea sau etalarea pe piele, cinetica eliberării substanțelor active conținute și timpul de stază la locul aplicării.

În figurile 5.16-5.19 sunt prezentate reogramele înregistrate pentru hidrogelul martor și cele cu AT la mărirea și micșorarea vitezelor de forfecare pe un interval larg de viteze, pentru a stabili sensibilitatea la forfecare, vitezele de forfecare la care începe destructurarea și refacerile hidrogelurilor destructurate.



Figurile 5.16-5.19. Reogramele hidrogelurilor: a – martor și cu b –5% , c – 10% și 15% AT

Reograma martorului arată curgere la tensiuni mici, comportare ideală elastică la viteze foarte mici, apoi pseudoplastică, destructurare la cca 10 s^{-1} și continuare la viteze mai mari; scădere bruscă de pantă la cca 300 s^{-1} , apoi comportare plastică ideală. Rezistența redusă la forfecare se datorează concentrației mici de collagen. La reducerea vitezelor de forfecare reograma este sub cea anterioară, deci structura nu se reface complet. Apare o buclă de histererezis, deci hidrogelul este tixotrop.

Efectului reticulării asupra comportării reologice este evidențiat de reogramele din fig. 5.17-5.19.

Consistența hidrogelurilor, rezistența la forfecare și tixotropia se măresc cu creșterea cantității de AT. Pentru 15% AT restructurarea se reduce, sugerând depășirea cantității necesare reticulării collagenului.

Determinarea valorilor η_0 prin liniarizarea dependențelor viscozitate aparentă-viteză de forfecare arată că pentru fiecare hidrogel se obțin două drepte care se intersectează la 10 s^{-1} , deci destructurarea începe pentru toate la această viteză. Panta mai mare la viteze mai ridicate demonstrează creșterea

Tabelul 5.6. Viscositățile dinamice și indicii de curgere pentru probele H1-H4 obținute la mărirea și micșorarea vitezelor de forfecare

Hidrogel	Mărire viteze forfecare		Micșorare viteze forfecare	
	η_0 , Pa.s	n	η_0 , Pa.s	n
H1	9,80	0,43	3,80	0,46
H2	13,86	0,35	3,73	0,50
H3	21,55	0,42	5,37	0,44
H4	19,17	0,41	0,98	0,79

pseudoplasticității. Valorile η_0 s-au determinat doar din dreptele de la viteze de forfecare mici și sunt date în tabelul 5.6.

Hidrogelul cu 10% AT este cel mai viscos, susținând ipoteza că 15% depășește cantitatea necesară pentru reticulare, excesul deteriorând collagenul.

Influența asupra capacității de curgere s-a evidențiat prin indicii de curgere, calculați cu ecuația Ostwald-de Waele, dar rezultatele (tabelul 5.6) nu corespund complet cu viscositățile, hidrogelurile prezentând totuși tensiuni limită de curgere.

Restructurarea hidrogelurilor s-a urmărit din reogramele obținute la micșorarea vitezelor de forfecare. Valorile η_0 (tabelul 5.6) sunt mult mai mici decât cele obținute la mărirea. Hidrogelul cu 15% se restructurează cel mai slab. Indicii de curgere sunt în concordanță mai bună cu valorile viscosităților.

5.3.4. Caracterizarea prin comportare reologică dinamică

Măsurătorile reologice dinamice nu afectează structura sistemelor supuse determinărilor. Valorile modulilor de stocare sau de elasticitate, G' , și de pierderi sau de viscozitate, G'' , la amplitudini de deformare mici pentru ca răspunsul materialului să fie viscoelastic liniar, permit determinarea contribuțiilor elastică și viscoasă la comportarea viscoelastică: valori G' mari indică preponderența proprietăților elastice, iar G'' mari – predominanța celor viscoase. Aceștia permit și diferențierea sistemelor neretificate de reticulate: ambii moduli sunt foarte mari și curbele ce dau dependențele de frecvență sunt aproape paralele pentru cele puternic reticulate, [55] pe când cele neretificate nu prezintă relație între valorile modulilor sau în variația acestora cu frecvența.

Dependențele G' și G'' de ω din figura 5.22 arată că: (a) valorile $G' > G''$ pentru toate hidrogelurile, deci comportarea este preponderent elastică; (b) diferențele modulilor la o frecvență dată cresc cu cantitatea de AT, deci AT mărește elasticitatea; (c) ambii cresc practic liniar cu ω ; (d) dreptele modulilor sunt paralele pentru fiecare hidrogel, cu excepția celui fără AT, arătând că este foarte slab reticulat; (e) hidrogelul cu 10% AT are cele mai mari valori G' și G'' , deci este cel mai elastic și cel mai viscos, adică este cel mai reticulat; (f) hidrogelul cu 15% AT este mai puțin elastic și mai puțin viscos, deci este mai slab reticulat decât cel cu 10% AT, din cauza denaturării parțiale a collagenului produsă de excesul de AT. Deci cea mai adecvată cantitate de AT pentru reticularea collagenului din hidrogel este 10%.

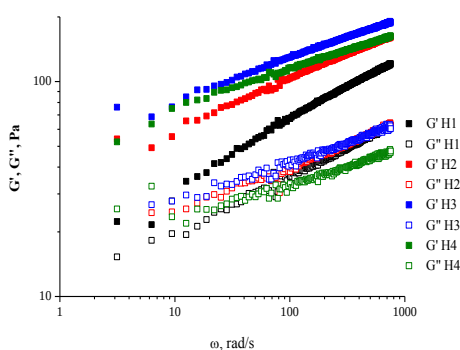


Figura 5.22. Variațiile G' și G'' cu ω pentru hidrogelurile H1-H4

din măsurători staționare. Ca și în cazul viscosităților dinamice, cea mai mare valoare s-a obținut pentru hidrogelul cu 10% AT, care se destrucurează cel mai slab, deci are structură tridimensională mai bine consolidată. Rezultatele susțin ipoteza denaturării slabe produse de excesul de AT.

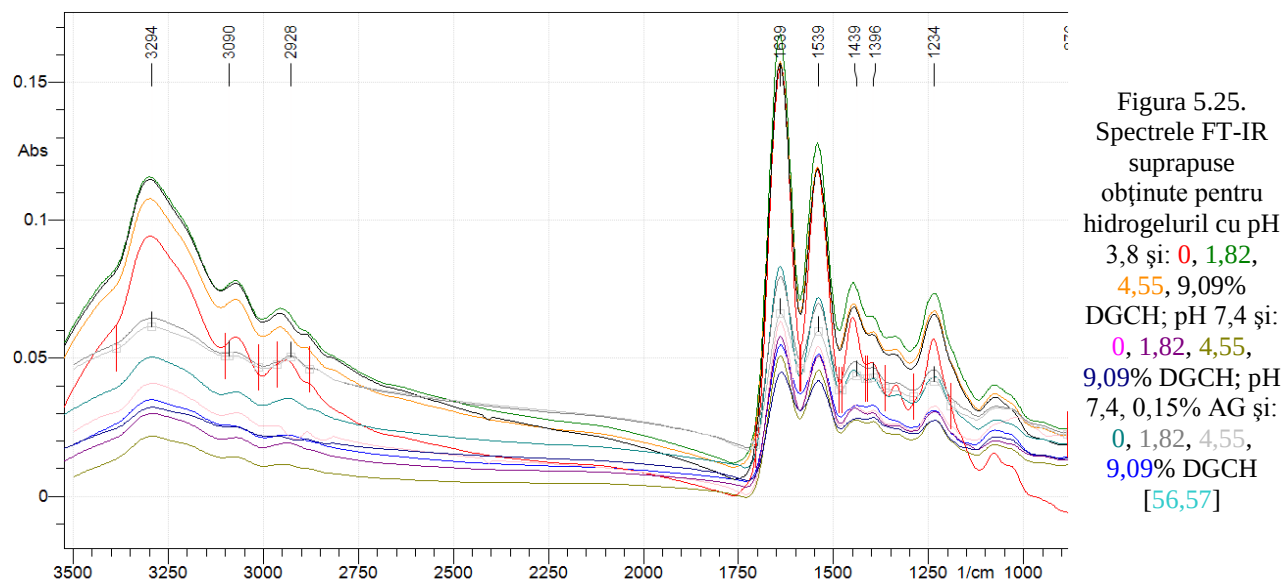
5.4. Hidrogeluri cu digluconat de clorhexidină

Asemenea hidrogeluri s-au preparat cu pH acid – 3,8 și slab bazic – 7,4, [56, 57] DGCH prezentând activitate la pH 5-8, [58] cu activitatea maximă la pH-ul fiziologic al pielii. [59] Cantitățile de

DGCH introduse au fost 1,82, 4,55 și 9,09% raportat la cantitatea de collagen din hidrogel. Cele cu pH slab bazic fiind prea fluide, pentru mărirea consistenței s-a introdus ca agent de reticulare aldehydă glutarică (AG), 0,15% raportată la collagenul din hidrogel. S-au preparat astfel trei serii de hidrogeluri: (a) cu pH 3,8, (b) cu pH 7,4 și (c) cu pH slab bazic și AG. Acestea s-au caracterizat prin aceleași metode ca cele cu AT.

5.4.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Spectrele FT-IR ale hidrogelurilor martor cu pH 3,8 și 7,4, al celui cu ultimul pH reticulat cu 0,15% AG și ale hidrogelurilor care conțin DGCH sunt prezentate în figura 5.25.



Numerele de undă la care apar benzile pentru hidrogelurile acide sunt prezentate în tabelul 5.7.

Tabelul 5.7. Frecvențele benzilor amidă I-III și A, de oscilație a grupei CH₂, rapoartele A_{III}/A₁₄₅₀ și A_I/A_A și diferențele frecvențele amidă I și II pentru hidrogelurile acide

DGCH, %	Amidă I, cm ⁻¹	Amidă II, cm ⁻¹	Amidă III, cm ⁻¹	CH ₂ , cm ⁻¹	Amidă A, cm ⁻¹	A _{III} /A ₁₄₅₀	A _I /A _A	(νA _I - νA _{II}), cm ⁻¹
0	1639	1543	1238	1450	3298	0,96	1,38	96
1,82	1641	1541	1234	1448	3298	1,88	1,29	100
4,55	1639	1543	1234	1446	3298	2,15	1,28	96
9,09	1639	1542	1234	1446	3298	1,21	1,29	97

Mărirea pH-ului reduce mult intensitățile tuturor benzilor, dar reticularea cu AG nu le modifică. Aceasta se datorează separării slabe de faze din hidrogelurile bazice, care reduce concentrația collagenului.

Comparând spectrul DGCH cu cel al collagenului se constată benzi comune doar în intervalul 3750-2750 cm⁻¹ și banda amidă I. Deci se pot suprapune doar aceste benzi, care trebuie utilizate cu grijă.

Pentru stabilirea efectului DGCH asupra conformației moleculelor de collagen din fibrile se pot utiliza și rapoartele A_{III}/A₁₄₅₀, precum și rapoartele A_I/A_A, care măsoară extinderea reticulării.

Hidrogeluri cu ambele substanțe preparându-se doar cu pH acid, se discută caracterizarea acestora.

Benzile își păstrează frecvențele în prezența DGCH. Pentru hidrogelurile cu 4,55 și 9,09% DGCH benzile se suprapun. Deci DGCH interacționează slab cu collagenul.

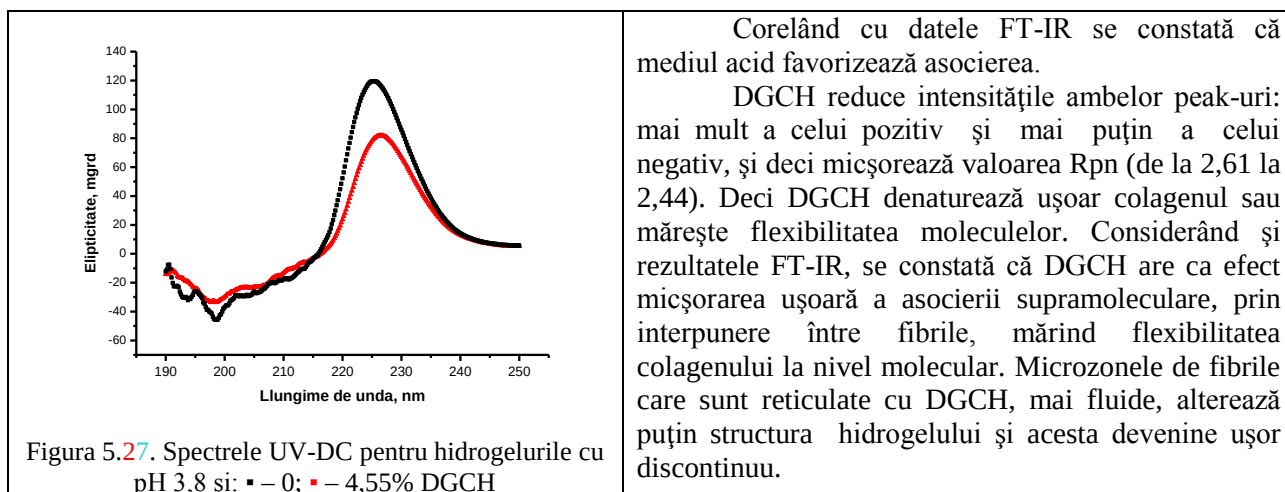
Rapoartele A_{III}/A₁₄₅₀ variază între 0,96 (martor) și 2,15 (cu 4,55% DGCH); diferențele benzilor amidă I și II nu depășesc 100 cm⁻¹, valori ce dovedesc că niciun hidrogel nu conține collagen denaturat.

Rapoartele A_I/A_A arată că martorul este cel mai puțin reticulat. DGCH micșorează puțin raportul, datorită legării dicationilor CH de grupele carboxil ale collagenului. Acestea fiind în număr foarte mic la pH 3,8, reticularea astfel produsă este extrem de slabă. În concluzie, DGCH nu afectează conformația moleculelor de collagen din fibrile în condițiile experimentale utilizate, dar reduce ușor reticularea. [56, 57]

5.4.2. Caracterizarea prin UV-DC

S-au înregistrat spectrele UV-DC ale hidrogelurilor martor și cu 4,55% DGCH (figura 5.27). [56, 57]

Spectrul hidrogelului martor este foarte asemănător cu al soluției 1% din figura 5.10, dar peak-ul negativ este mai bine conturat și mai intens, deci raportul R_{pn} este mai mare. Aceasta se poate explica prin reducerea flexibilității moleculelor de collagen datorită asocierii supramoleculare în fibrile.



5.4.3. Caracterizarea prin comportare reologică staționară

Reogramele înregistrate pentru hidrogelul acid martor și cu cele trei cantități de DGCH la viteze de forfecare mici, cuprinse între 0,1 și 20,4 s⁻¹, sunt prezentate în figura 5.30. [56, 57]

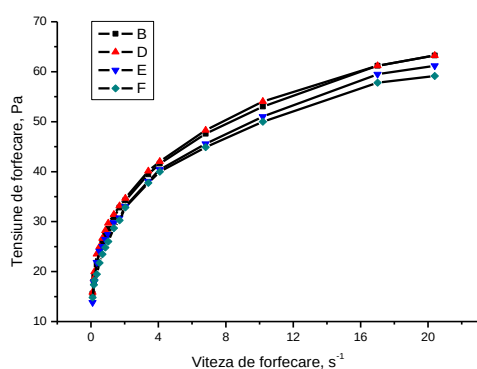


Figura 5.30. Reogramele pentru hidrogelurile acide cu: B – 0; D – 1,82; E – 4,55; F – 9,09% DGCH

Introducând 1,82% DGCH viscozitățile cresc ușor la viteze mici, deci collagenul este slab reticulat cu dicationi CH. Vitezele mai mari de 10,2 s⁻¹ destructurează hidrogelul. Măbind cantitatea de DGCH reogramele se situează mai jos. Deci mărirea cantității de DGCH scade

Tabelul 5.10. Parametrii reologici pentru hidrogelurile de collagen acide martor și cu DGCH

Concentrație DGCH, %/parametru reologic	τ_0 , Pa	K, Pa.s ⁿ	n
0	0,986	27,582	0,272
1,82	0,982	28,411	0,263
4,55	0,921	26,644	0,273
9,09	0,959	25,704	0,276

viscozitățile, ponderea reticulării fibrilelor cu dicationi crescând cu concentrația sa și reticularea prin legături de hidrogen scăzând; legăturile de hidrogen asigură consistența hidrogelurilor de collagen. [56,57]

DGCH afectează similar și viscozitățile dinamice – la început cresc, apoi scad. Hidrogelul cu 1,82% este cel mai viscos, urmat de martor și de cel cu 4,55%. Parametrii reologici s-au calculat cu ecuația Herschel-Bulkley (tabelul 5.10).

Din valorile obținute se constată că DGCH nu afectează tensiunea limită de curgere, dar reduce puțin indicii de curgere cu creșterea concentrației. [56, 57] Deci hidrogelul devine ușor discontinuu pe măsură ce crește concentrația DGCH.

5.4.4. Caracterizarea prin comportare reologică dinamică

În figura 5.33 sunt reprezentate dependențele G' și G'' de frecvența aplicată pentru hidrogelurile acide care conțin DGCH și pentru hidrogelul martor. [56, 57]

Pentru toate hidrogelurile valorile modulilor cresc cu frecvența și scad la mărirea concentrației DGCH. Valorile G' sunt de 2,5-2,9 ori mai mari decât G'', deci atât martorul cât și hidrogelurile cu DGCH sunt predominant elastice.

Diferențierea curbelor G' pentru cantități utilizate de DGCH este o dovadă a reticulării slabea collagenului cu dicationii clorhexidinei, interacțiuni evidențiate și prin celelalte metode.

Viscozitățile la frecvență minimă (0,5 s⁻¹) și maximă (140 s⁻¹) sunt date în tabelul 5.11.

La frecvența cea mai mică DGCH produce mai întâi scăderea ușoară a viscozității hidrogelului, apoi o mărire slabă. La frecvența maximă valorile sunt apropiate și mai mici decât valoarea pentru martor.

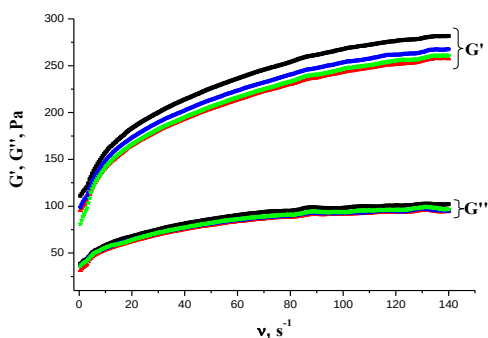


Figura 5.33. Dependențele G' și G'' de frecvență pentru hidrogeluri acide: ■ – 0, ▲ – 1,82, ■ – 4,55 și ■ – 9,09% DGCH

Tabelul 5.11. Viscositățile hidrogelurilor martor și cu DGCH

DGCH, %	Viscozitate, Pa.s	
	$\nu = 0,5 \text{ s}^{-1}$	$\nu = 140 \text{ s}^{-1}$
0	12,188	0,116
1,82	10,047	0,107
4,55	11,487	0,108
9,09	11,468	0,110

5.5. Hidrogeluri cu acid tanic și digluconat de clorhexidină

AT nu a fost utilizat ca agent de reticulare pentru hidrogelurile de collagen ce conțin DGCH.

Metabolit secundar polifenolic sintetizat de plante pentru a le apăra de microorganisme, AT are proprietăți antimicrobiene *in vivo* și *in vitro*. [60]. Introdus în hidrogeluri de collagen, funcționează ca agent de reticulare și antimicrobian, putând totodată să mărească activitatea compușilor antiseptici.

Reticulând fibrilele de collagen prin forțe de natură fizică, AT poate difuza la suprafața rănii. Cei doi compuși pot interacționa la pH 3,8 prin legături de hidrogen și mai puțin prin forțe ionice, din cauza numărului foarte mic de grupe carboxil existente în collagen la acest pH. Acțiunea celor două substanțe antimicrobiene poate fi individuală sau sinergetică, iar AT poate potența acțiunea antimicrobiană a DGCH.

S-au preparat hidrogelurile cu AT și DGCH cu pH 3,8 și compozițiile din tabelul 5. 12. [61]

Tabelul 5.12. Compozițiile și notarea hidrogelurilor care conțin AT și DGCH

AT, %	5	10	15	5	10	15	5	10	15
DGCH, %	1,82	1,82	1,82	4,55	4,55	4,55	9,09	9,09	9,09
Denumire	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13

Hidrogelurile sunt mai opalescente ca cele ce conțin numai AT. Opalescenta crește, ca și viscozitățile, nu numai cu concentrația AT, ci și cu a DGCH. La concentrații mari ale celor două componente omogenitatea scade, dar – păstrate la 4°C – nu suferă sinereză nici după 3 luni. Începând cu 4,55% DGCH hidrogelurile conțin bule de aer. Din cauza viscozității mari nu pot fi îndepărtate și îngreunează caracterizarea hidrogelurilor: opalescența – măsurătorile UV-CD, iar discontinuitatea – afectează toate celelalte metode pentru caracterizare.

5.5.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Spectrele FT-IR ale hidrogelurilor cu 1,82% DGCH și AT sunt prezentate în figura 5.36.

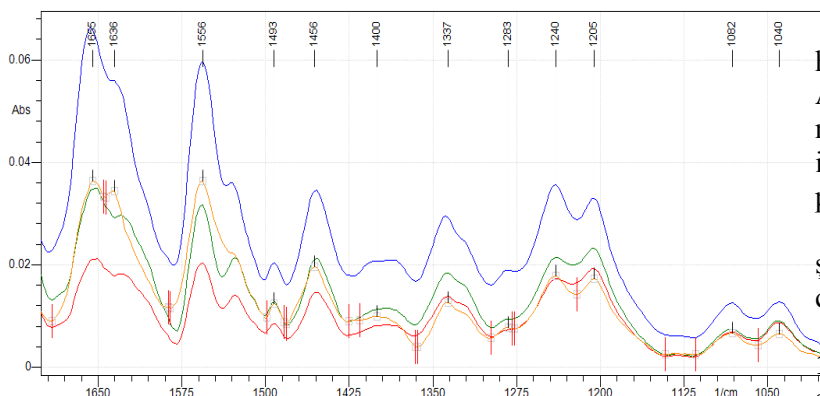


Figura 5.36. Spectrele FT-IR ale hidrogelurilor care conțin 1,82% DGCH martor și cu AT: 5%; 10% și 15%

Foarte asemănătoare cu ale hidrogelurilor acide care conțin numai AT și cu benzi practic la aceleași numerele de undă, spectrele arată că interacțiunea collagen-AT este mai puternică decât collagen-DGCH.

Numerele de undă ale benzilor și diferențelor necesare pentru caracterizare sunt date în tabelul 5.13.

Diferențele sunt mai mici ca 100 cm^{-1} pentru hidrogelurile P5 și P6 și 101 cm^{-1} pentru P7. Deci hidrogelurile cu 1,82% DGCH și AT nu conțin collagen denaturat.

Aspectul spectrele hidrogelurilor H8-H10 este același cu al celor anterioare, deci interacțiunile nu depind sensibil de cantitatea de DGCH. Benzile au aceleași valori ν , cu excepția benzii amidă I pentru hidrogelul cu 5% AT (P8), deplasată spre ν mai mari, dar nici acesta nu conține collagen denaturat.

Tabelul 5.13-5.15. Numerele de undă ale benzilor amidă I-III, de oscilație a grupei CH₂ și valorile diferențelor dintre frecvențele benzilor amidă I și II obținute pentru hidrogelurile H1 și H5-H13

Hidrogel	Amidă I, cm ⁻¹	Amidă II, cm ⁻¹	Amidă III, cm ⁻¹	CH ₂ oscilație, cm ⁻¹	($\nu_{A_I} - \nu_{A_{II}}$), cm ⁻¹
H1	1651	1556	1238	1454	95
H5	1655	1556	1240	1456	99
H6	1651	1556	1240	1454	95
H7	1657	1556	1240	1454	101
H8	1659	1556	1240	1454	103
H9	1651	1556	1240	1454	95
H10	1651	1556	1240	1454	95
H11	1657	1556	1242	1456	101
H12	1653	1556	1240	1454	97
H13	1651	1556	1240	1456	95

Pentru ultima serie benzile amidă I și III își păstrează formele și pozițiile, dar amidă II se scindează: la 10% AT apare o bandă la 1541 cm⁻¹, a cărei intensitate crește cu concentrația AT, atribuită interacțiunilor grupelor –OH ale AT cu amină din DGCH, [63,64] ce devin sesizabile la cantități mai mari din ambii compuși. Și banda grupei CH₂ se modifică: pentru 10% AT apare un umăr slab la 1470 cm⁻¹, mai intens pentru 15%, care se datorează interacțiunii punților hexametilenice ale DGCH cu grupele hidrofobe ale AT.

Numerele de undă ale benzilor pentru hidrogelurile H1 și H11-H13, din tabelul 5.13-5.15, arată că diferența este 101 cm⁻¹ doar pentru hidrogelul P11, dar intră în erorile experimentale. Deci nici aceste hidrogeluri nu conțin collagen denaturat.

Spectrele FT-IR arată că la concentrații mai mari de AT și DGCH banda amidă II se scindează, aparînd o nouă bandă la 1541 cm⁻¹, și un umăr pe banda grupei CH₂ la 1470 cm⁻¹, ceea ce indică apariția interacțiunilor AT-DGCH; niciun hidrogel nu conține collagen denaturat, deci se pot utiliza ca biomateriale.

5.5.2. Caracterizarea prin spectroscopie UV-DC

Spectrele UV-DC obținute pentru hidrogelurile cu DGCH și AT sunt prezentate în figura 5.39-5.41.

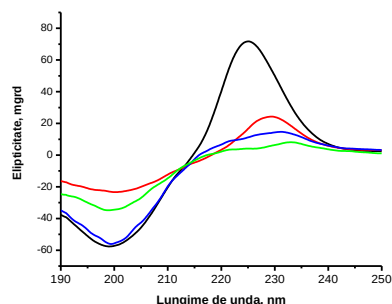


Figura 5.39. Spectrele UV-DC pentru hidrogelurile H1 și H5-H7

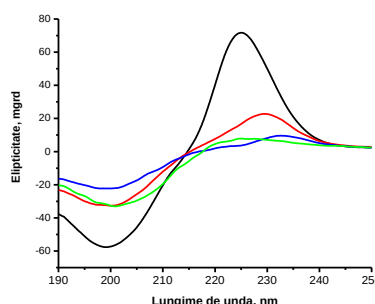


Figura 5.40. Spectrele UV-DC pentru hidrogelurile H1 și H8-H10

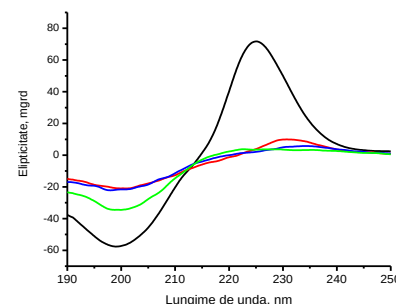


Figura 5.41. Spectrele UV-DC pentru hidrogelurile H1 și H11-H13

Ca și în cazul spectrelor FT-IR, aspectele sunt asemănătoare cu ale hidrogelurilor cu AT (fig. 5.9), dar sunt și deosebiri. În tabelul 5.16-5.18 sunt date valorile pentru spectrele din figurile 5.39-5.41.

Tabelul 5.16-5.18. Lungimile de undă, elipticitățile picurilor, punctele de elipticitate zero și valorile Rpn obținute pentru hidrogelurile H1 și H5-H13 din tabelul 5.12.

Hidrogel	Minim		Maxim		Punct de elipticitate zero	Rpn
	λ , nm	θ , mdeg	λ , nm	θ , mdeg		
H1	199,0	-57,7	225,0	71,7	214,8	1,03
H5	200,2	-23,4	229,4	24,3	218,2	1,04
H6	199,4	-56,1	231,2	14,7	215,8	0,26
H7	198,8	-34,8	233,0	8,1	217,2	0,23
H8	200,0	-32,6	229,6	22,8	215,2	0,70
H9	200,0	-22,2	232,6	9,6	216,8	0,43
H10	201,0	-33,0	225,0	7,9	217,6	0,24
H11	201,0	-21,0	230,6	9,9	221,6	0,47
H12	200,6	-21,6	234,0	5,8	220,0	0,27
H13	199,8	-34,5	228,6	3,7	217,2	0,11

Pentru 1,82% DGCH diferențe față de hidrogelurile cu AT apar începând cu 10% AT: λ pentru minim, lărgimea și elipticitatea sa se apropie mult de ale matorului; maximul este mai slab conturat, λ mai apropiat de al hidrogelului cu 10% AT și elipticitatea aproape dublă; punctele de elipticitate zero sunt apropiate, iar Rpn este 1/2 din cel pentru hidrogelul cu AT, datorită măririi intensității minimului. Acestea se datorează măririi turbidității și ușoarei separări de faze. La 15% AT intensitățile minimului și maximului scad, dar valorile Rpn rămân foarte apropiate. Când concentrația DGCH s-a mărit la 4,55% s-au obținut spectrele din figura 5.40: lungimile de undă ale minimelor sunt foarte apropiate de ale matorului, dar înălțimile sunt diferite, iar minimul are cea mai mare intensitate pentru hidrogelul cu 15% AT. Maximele se deplasează spre λ mai mari cu creșterea concentrației AT, cu excepția celui cu 15% AT, care revine la valoarea pentru mator; înălțimile scad continuu. Punctele de elipticitate zero cresc cu concentrația AT și valorile Rpn scad. Scăderea intensității ambelor benzi, a valorii Rpn și deplasarea spre roșu a punctului de elipticitate zero sunt considerate dovezi de denaturare parțială a helixului triplu. [53, 54] Responsabile de modificări sunt însă opalescența, ușoara separare de faze și bulele de aer și nu denaturarea parțială. Considerând criteriul propus anterior, se poate afirma că acestea nu conțin collagen denaturat.

Spectrele din figura 5.41 sunt foarte apropiate pentru 5 și 10% AT; pentru 15% maximul este foarte aplatisat. Valorile din tabel arată că diferențele dintre minime sunt ne semnificative pentru 5 și 10% AT, dar pentru maxime λ este mai mare pentru hidrogelul cu 10% AT și intensitatea sa de 1,7 ori mai mică decât a celui cu 5%. Punctele de elipticitate zero sunt apropiate și Rpn scade cu mărirea cantității de AT.

Dacă se acceptă criteriul propus în subparagr. 5.3.2 pentru dovedirea existenței conformației native, se poate afirma că niciun hidrogel nu conțin collagen denaturat, așa cum arată și spectrele FT-IR.

5.5.3. Caracterizarea prin comportare reologică staționară

Hidrogelurile cu 1,82% DGCH și cele trei cantități de AT sunt mai opace și mai neomogene decât cele ce conțin numai AT. Cel mai transparent și omogen este cel cu 5% AT, foarte asemănător ca aspect cu matorul. Viscositatea în stare de repaus a hidrogelului pare a se mări mult cu creșterea cantității de AT.

Reogramele obținute la prima mărire a vitezelor de forfecare pentru hidrogelurile mator și H5-H7 în intervalul 0-100 s^{-1} , în care destrucțurarea nu este semnificativă, sunt prezentate în figura 5.42.

Figura arată că: [61] reticularea cu AT mărește viscozitățile; valorile τ_0 sunt mici; la viteze mici se comportă ideal plastic, apoi pseudoplastic; structura începe să se distrugă la 10 s^{-1} și încetează la 20 s^{-1} .

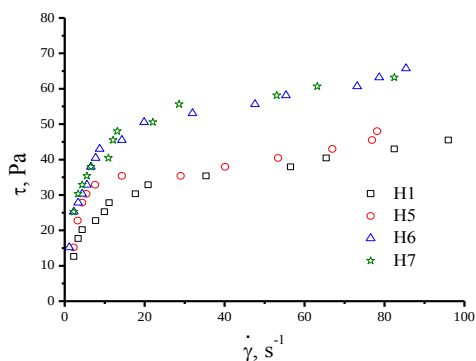


Figura 5.42. Reogramele hidrogelurilor H1 și H5-H7 obținute la mărirea vitezelor de forfecare

Liniarizarea viscozităților dinamice conduce la două drepte pentru fiecare hidrogel, ce se intersectează la 10 s^{-1} . Valorile η_0 obținute sunt date în tabelul 5.19.

Viscozitățile hidrogelurilor cu DGCH și AT sunt mai mari decât pentru mator, dar mai mici decât pentru cele cu AT, datorită interacțiunii AT-DGCH, și cresc cu procentul de AT; 15% AT nu mai este exces.

Reogramele de la reducerea vitezelor de forfecare arată că hidrogelul cu 1,82% DGCH și 5% AT – cel mai omogen – se restructurează cel mai rapid, urmat de cel cu 10%. Viscozitățile sunt mai mici decât cele obținute la mărire și scad cu concentrația AT: hidrogelurile mai reticulate necesită mai mult timp pentru restructurare. Indicii de curgere variază invers cu viscozitățile.

Tabelul 5.19-5.21. Viscozitățile dinamice și indicii de curgere pentru hidrogelurile H1 și H5-H13 obținute la mărirea și micșorarea vitezelor de forfecare

Hidrogel	Mărire viteze forfecare		Micșorare viteze forfecare		Hidrogelurile cu 4,55% DGCH se aseamănă cu cele din seria cu 1,82%, dar în stare de repaus par mai viscoase și conțin bule de aer. Reogramele arată că cel cu 10% AT este cel mai viscos, urmat de H8 (5% AT), dar la viteze de forfecare peste 20 s^{-1} viscozitățile devin apropiate. Liniarizarea arată existența tot a câte două drepte pentru fiecare hidrogel, ce se intersectează la aceeași viteză de forfecare – 10 s^{-1} . Viscozitățile dinamice
	η_0 , Pa.s	n	η_0 , Pa.s	n	
H1	9,80	0,43	3,80	0,46	
H5	10,14	0,63	7,55	0,40	
H6	15,21	0,48	4,45	0,46	
H7	20,72	0,30	3,89	0,47	
H8	15,51	0,47	8,02	0,39	
H9	16,66	0,55	7,91	0,39	
H10	11,93	0,49	1,64	0,62	
H11	21,17	0,28	6,62	0,41	
H12	14,85	0,42	5,07	0,41	
H13	9,11	0,70	3,82	0,51	

(tabelul 5.19-5.21) sunt mai mici decât ale celor cu 1,82% la toate procente de AT, din cauza consumării unei părți mai mari de AT și deci reducerii reticulării. Acestea cresc pentru 5 și 10% AT, dar scad pentru 15%, din cauza cantității mai mari de asociate AT-DGCH cu viscozitate mai mică, ce se interpun între fibrile. Ipoteza este susținută de valorile apropiate ale viscozităților celorlalte hidrogeluri.

În tabel sunt dați indicii de curgere; aceștia scad cu mărirea concentrației AT.

La micșorarea vitezelor de forfecare hidrogelurile cu 5 și 10% AT se restructurează cel mai puternic; cel cu 15% AT își reface structura mai slab decât martorul, datorită numărului mai mare de asociate AT-DGCH.

Viscozitățile dinamice (tabelul 5.19-5.21) sunt de 2 până la 7,5 ori mai mici decât cele obținute la mărirea vitezelor de forfecare. Valoarea mică pentru hidrogelul P10 este susținută și de valoarea mai mare a indicelui de curgere din același tabel, care arată că hidrogelul care conține 15% AT curge cel mai ușor.

Hidrogelurile cu 9,09% are DGCH au cea mai mare opalescență, sunt cele mai puțin omogene, par cele mai viscoase în stare de repaus și conțin cele mai multe și mai mari bule de aer.

La tensiunea de forfecare minimă valorile η^* cresc în ordinea: $H13 < H12 < H11$; relația continuă până la cca 10 s^{-1} . Peste această valoare $H13$ devine mai viscos, iar valorile celorlalte devin apropiate. Explicația constă în orientarea asociatelor AT-DGCH în direcția tensiunii, care favorizează interacțiunea dintre fibrile. La aceasta se adaugă contribuția bulelor de aer: la viteze mici, când viscozitățile sunt mari, bulele nu pot părăsi spațiul dintre cilindrii senzorului, dar la viteze mari o parte ies pe măsură ce scade viscozitatea. Tabelul 5.19-5.21 arată că $H13$ are cea mai mică viscozitate iar $H11$ cea mai mare.

La 9,09% DGCH cel mai mult se refac hidrogelurile cu 5 și 15% DGCH și cel mai slab cel cu 10%.

Comportarea reologică staționară sugerează deci formarea de asociate AT-DGCH la concentrații mari de antiseptice, mai puțin viscoase decât restul hidrogelului, care creează spectrul de neomogenitate.

5.5.4. Caracterizarea prin comportare reologică dinamică

Dependențele G' și G'' de frecvențele unghiulare sunt date în figurile 5.51-5.53.

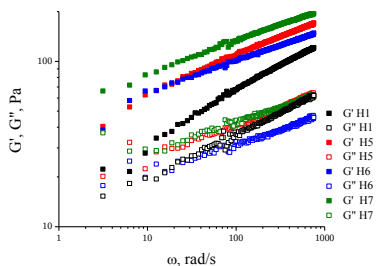


Figura 5.51. Dependentele G' și G'' de ω pentru hidrogelurile H1 și H5-H7

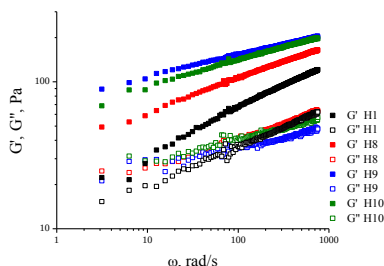


Figura 5.52. Dependentele G' și G'' de ω pentru hidrogelurile H1 și H8-H10

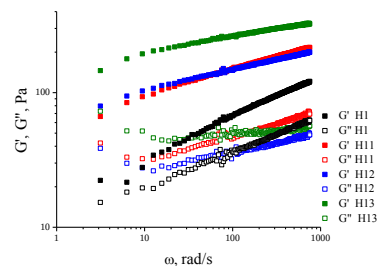


Figura 5.53. Dependentele G' și G'' de ω pentru hidrogelurile H1 și H11-H13

Comparând cu datele pentru hidrogelurile cu AT, se constată asemănări și deosebiri.

Asemănări: G' pentru hidrogelurile cu AT sunt mai mari decât pentru martor; toate valorile G' sunt puțin mai mari decât G'' pe întregul domeniu ω ; ambii moduli cresc practic liniar cu ω ; diferențele dintre valorile modurilor la o valoare dată sunt cu atât mai mari cu cât cantitatea de AT este mai ridicată; dreptele ce dau dependențele G' sunt practic paralele cu cele pentru G'' pentru fiecare hidrogel, cum este de așteptat pentru sisteme reticulate, cu excepția martorului, pentru care valorile devin apropiate la ω mai mici.

Deosebiri: hidrogelul cu 15% AT are cele mai mari valori G' și G'' , și nu cel cu 10% ca în cazul absenței DGCH (o parte din AT este consumat de DGCH și acesta nu mai este în exces față de cantitatea necesară reticulării); hidrogelul cu 10% AT curge mai ușor chiar decât cel inițial, în special la ω ce depășesc 100 rad/s . Deci cantitatea optimă de agent de reticulare este în acest caz 15%.

Mărind cantitatea de DGCH la 4,55% se obțin pentru G' și G'' dependențele de concentrația AT și de ω din figura 5.52. Valorile sunt puțin mai mari decât pentru seria anterioară, dreptele ce dau variația G' și G'' cu ω rămân paralele pentru fiecare hidrogel, iar cele cu 10 și 15% AT sunt apropiate, deci și DGCH contribuie la reticulare. La 4,55% DGCH reticularea este optimă atât pentru cantitatea de 10 cât și 15% AT.

Cantitatea maximă de DGCH conduce la variațiile modurilor cu frecvența din figura 5.53. Cel mai elastic este hidrogelul cu 9,09% DGCH și 15% AT ($H13$); cele cu 5 și 10% AT au valori mai mici și apropiate ale elasticității. Pentru hidrogelurile cu 5 și 10% AT dreptele ce dau dependențele modurilor de ω rămân practic paralele, iar pentru cel cu 15% paralelismul dispare, probabil din cauza cantității mai mari de aglomerate AT-DGCH din acest hidrogel, evidențiată și prin comportare reologică staționară.

Dependențele viscozităților de ω pentru fiecare serie de hidrogeluri sunt strict liniare, iar acestea scad cu mărirea ω practic la fel în fiecare serie. Valorile obținute prin extrapolare la 1 rad/s din tabelul 5.22 variază în serii ca în cazul celor obținute din măsurători staționare: cresc cu mărirea cantității de AT, dar sunt mult mai mari decât cele obținute din măsurători staționare, hidrogelurile ne fiind destructurate.

Tabelul 5.22. Viscositățile dinamice ale hidrogelurilor H5-H13 la frecvența unghiulară de 1 rad/s

Proba	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
η , Pa.s	41,6	43,4	58,2	41,0	81,2	66,7	66,0	76,9	58,6

Creșterea cantității de DGCH mărește valorile viscozităților hidrogelurilor cu același conținut de AT, cu excepția celui cu 15%, pentru care întâi crește, apoi scade pentru 9,09%, din cauza numărului mare de asociate AT-DGCH, care împiedică reticularea cu AT și, fiind mai puțin viscoase, reduc viscozitatea.

Bibliografie

1. „The American Heritage Dictionary of the English Language”, ed. A 4-a, updatată în 2009, Houghton Mifflin Company.
2. “Collins English Dictionary” ed. 6-a completată și neprescurtată, Harper Collins Publishers, 2003.
3. N.A. Peppas și A.G. Mikos, Preparation methods and structure of hydrogels, în “Hydrogels in Medicine and Pharmacy”, ed. N. A. Peppas, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1986.
4. L. Brannon-Peppas, Preparation and characterization of crosslinked hydrophilic networks, în “Absorbent Polymer Technology”, ed. L. Brannon-Peppas și R.S. Harland, Elsevier, Amsterdam, 1990.
5. N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung și H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 27-46, **2000**.
6. B.D. Ratner și A.S. Hoffman, Synthetic hydrogels for biomedical applications, în “Hydrogels for Medical and Related Applications”, ed. J.D. Andrade, ACS Symposium Series, No. 31, American Chemical Society, Washington, DC, 1976, 1-36.
7. N.A. Peppas și R. Langer, New challenges in biomaterials, Science 263, 1715-1720, **1994**.
8. K. Park, “Controlled Release: Challenges and Strategies”, American Chemical Society, Washington, 1997.
9. N.A. Peppas, Hydrogels and drug delivery, Curr. Opin. Int. Sci. 2, 531-537, **1997**.
10. E.A. Abou Neel, U. Cheema, J.C. Knowles, R.A. Brown și S.N. Nazhat, Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties, Soft Matter 2, 986-992, **2006**.
11. V. Charulatha și A. Rajaram, Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes, Biomaterials 24, 759-769, **2003**.
12. A. Jayakrishnan și S.R. Jameela, Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthetic and drug delivery matrices, Biomater., 17, 471-84, **1996**.
13. H.M. Powell și S.T. Boyce, EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability, Biomater., 27, 5821-5827, **2006**.
14. H.M. Powell și S.T. Boyce, Wound closure with EDC cross-linked cultured skin substitutes grafted to athymic mice, Biomater. 28, 1084-1092, **2007**.
15. W.M. Elbjeirami, E.O. Yonter, B.C. Starcher și J.L. West, Enhancing mechanical properties of tissue-engineered constructs via lysyl oxidase crosslinking activity, J. Biomed. Mater. Res. 66A, 513-521, **2003**.
16. W. Friess, Collagen – biomaterial for drug delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45, 113-361, **1998**.
17. M.L. Tiffany și S. Krimm, The effect of temperature on the circular dichroism spectra of polypeptides in the extended state, Biopolymers 11, 2309-2316, **1972**.
18. M.G. Venugopal, J.A.M. Ramshaw, E. Braswell, D. Zhu și B. Brodsky, Electrostatic interactions in collagen-like triple-helical peptides, Biochem. 33, 7948-7956, **1994**.
19. Y. Feng, G. Melacini, J.P. Taulane și M. Goodman, Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. 2. Synthesis and conformational analysis by circular dichroism, ultraviolet absorbance, and optical rotation, J. Am. Chem. Soc. 118, 10351-10358, **1996**.
20. U. Freudenberg, S.H. Behrens, P.B. Welzel, M. Muller, M. Grimmer, K. Salchert, T. Taeger, K. Schmidt, W. Pompe și C. Werner, Electrostatic interactions modulate the conformation of collagen I, Biophys. J. 92, 2108-2119, **2007**.
21. M. Leca, V. Trandafir și M.G. Albu, Preparation and characterization of some collagen gels and matrices, „Ovidius” Annals of Medicine Sci. – Pharmacy 1, 84-92, **2003**.
22. M.G. Albu și M. Leca, Rheological behaviour of some cross-linked collagen hydrogels for drug delivery use, European Cells & Materials, 10, 8, **2005**.
23. H. A. “A handbook of elementary rheology”, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, University of Wales, 2000.
24. J. A. M. Ramshaw, N. K. Shas și B. Brodsky, Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a contest of host-guest triple-helical peptides, J. Struct. Biol. 122, 86-91, **1998**.
25. K. Kar, P. Amin, M. A. Bryan, A. V. Persikov, A. Mosh, Y.-H. Wang și B. Brodsky, Self-association of collagen triple helix peptides into higher order structures, J. Biol. Chem. 281, 33283-33290, **2006**.
26. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, Internet ed., <http://goldbook.iupac.org/T06282.html>
27. G. N. Ramachandran, Structure of collagen, Nature 174, 269-270, **1954**.
28. A. Rich și F. H. Crick, Nature 176, 915-916, **1955**.
29. P. M. Cowan, S. McGavin și A. C. North, Nature 176, 1062-1064, **1955**.
30. A. Rich și F. H. Crick, The molecular structure of collagen, J. Mol. Biol. 3, 483-506, **1955**.
31. G. N. Ramachandran, Structure of collagen at the molecular level, în “Treatise on collagen” vol. 1, “Chemistry of collagen”, ed. G. N. Ramachandran, Academic Press, London, 1967.
32. C. Petibois, G. Gouspillou, K. Wehbe, J.-P. Delage și G. Deleris, Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue, Anal. Bioanal. Chem. 386, 1961-1966, **2006**.

43. C. Palpandi, P. Ramasamy, T. Rajinikanth, S. Vairamani and A. Shanmugam, Extraction of Collagen from Mangrove Archaeogastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck, 1822, Am-Euras. J. Sci. Res. 5, 23-30, **2010**.
44. N.F. Mohd Nasir, M.G. Raha, N.A. Kadri, S.I. Sahidan, M.Rampado and C.A Azlan, The Study of Morphological Structure, Phase Structure and Molecular Structure of Collagen- PEO 600K Blends for Tissue Engineering Application, Amer. J. Biochem. Biotechnol. 2, 175-179, **2006**.
47. A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, Biochim. Biophys. Acta 1767, 1073-1101, **2007**.
48. Z. Garcia, H. Naik, R., Collighan, M. Griffin, J. C. R. Cabello și A. Pandit, In-vitro characterization of an enzymatically cross-linked collagen-elastin like polymer scaffold, 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, May 28 – June 1, 2008.
49. K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, C. Petibois, Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. Anal. Bioanal. Chem. 395, 829-837, **2009**.
53. E. M. Brown, R. L. Dudley, A. R. Elsetinow, A conformational study of collagen as affected by tanning procedures, J. Amer. Leather Chem. 92, 225-233, **1992**.
54. D. Jenness, C. Sprecher și W. C. Johnson Jr., Circular dichroism of collagen, gelatin and poly(proline) II in the vacuum ultraviolet, Biopolymers 15, 513-521, **1976**.
56. D. Șulea, M. V. Ghica, M. Micutz, M. G. Albu, **L. Brăzdaru**, T. Staicu, M. Leca și L. Popa, Characterization an *in vitro* release of chlorhexidine digluconate comprised in type I collagen hydrogel, Rev. Roum. Chim. 55, 543-551, **2010**.
57. M. Leca, D. Șulea, M. V. Ghica, M. Micutz, M. G. Albu, **L. Brăzdaru**, T. Staicu și L. Popa, Collagen hydrogels containing chlorhexidine digluconate: Characterization and in vitro drug release, Proc. 3rd Int. Conf. ICAMS 2010, September 16-18, Bucharest, 205-210.
58. DGCH pH “Basic and Clinical Pharmacology”, Miscellaneous Antimicrobial Agents; Disinfectants, Antiseptics, & Sterilants, cap. 50, McGraw-Hill Comp., <http://basic-clinical-pharmacology.net/chapter50.htm>
59. http://www.burmester-pharma.de/deutsch/analyse_datenblatt/a1929.pdf
60. M. Murphy Cowan, Plant Products as Antimicrobial Agents, Clin. Microbiol. Rev. 12, 564-582, **1999**.
61. S. K. Filoche, K. Soma și C. H. Sissons, Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate, Oral Microbiol. Immunol. 20, 221-225, **2005**.
62. A. Albert și E.P. Sargeant, ”Ionization Constants of Acids and Bases”, Methuen, London, 1962.
63. **L. Brăzdaru**, M. Leca, M. Micutz, M. G. Albu și T. Staicu, Stationary and dynamic Rheological behaviour of some collagen hydrogels for wound management containing mixtures of chlorhexidine digluconate and tannic acid, Proc. 4th Int. Conf. ICAMS 2012, September 27-29, Bucharest, 237-242.
64. **L. Brăzdaru**, M. Micutz, T. Staicu, M. Albu, D. Șulea, M. Leca, Structural and rheological properties of collagen hydrogels containing tannic acid and chlorhexidine digluconate intended for wound dressings, C. R. Chim., doi: 10.1016/j.crci.2014.07.007

6. CARACTERIZAREA MATRICILOR POROASE CE CONȚIN ACID TANIC, DIGLCONAT DE CLORHEXIDINĂ SAU AMESTECURI ALE ACESTORA

Matricile de collagen au aplicații multiple în medicină: suport/schelet/eșafodaj (scaffold) în ingineria țesuturilor, [6] hemostatic și material de protecție pentru răni și noul țesut ce se formează, [6, 7] sisteme de înglobare și de eliberare a celulelor, proteinelor, acizilor nucleici și medicamentelor. [8-11]

6.1. Matrici cu acid tanic

6.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Spectrele pentru matricile martor și cu 5, 10 respectiv 15% AT sunt date în figura 6.1.

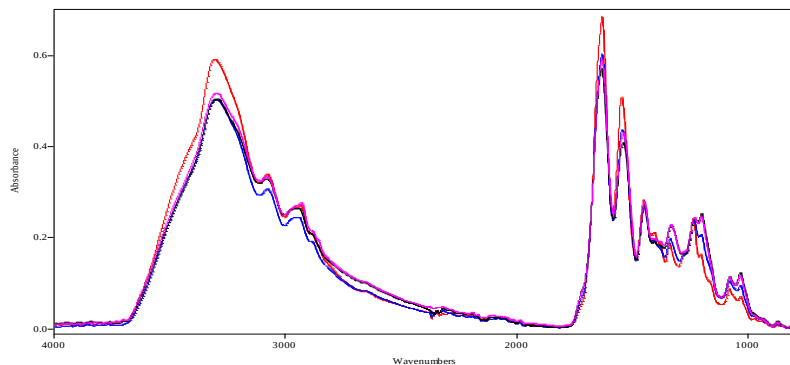


Figura 6.1. Spectrele FT-IR ale matricilor care conțin: **M1 – 0;**
M2 – 5; M3 – 10 și **M4 – 15% AT**

Spectrul FT-IR al martorului conține benzile collagenului, [18] cu excepția umărului de la 2920 cm^{-1} (amidă B), [20] care este suprapus cu un alt umăr la 2957 cm^{-1} .

Valorile ν și diferențele ($\nu_{A_I} - \nu_{A_{II}}$) sunt date în tabelul 6.1.

În matricea martor viorile ν pentru amidă I și II sunt puțin mai mici decât în hidrogel, dar celelalte rămân aceleași. Din banda complexă amidă III, în spectrul martorului se observă: 1338 cm^{-1} – foarte slabă, 1277 cm^{-1} – umăr, 1237 și 1203 cm^{-1} – umăr, în

concordanță cu literatura. [22-24] Valoarea ($\nu_{A_I} - \nu_{A_{II}}$) este 84 cm^{-1} , deci nu conține collagen denaturat.

Figura 6.1 relevă că AT produce următoarele modificări: (a) Intensitățile benzilor amidă A scad, datorită legării AT de collagen și reducerii numărului de legături de hidrogen dintre fibrile. (b) Subbenzile Tabelul 6.1. Numerele de undă ale benzilor amidă A, amidă I-III, de oscilație a grupei CH_2 și diferențele ($\nu_{\text{AI}} - \nu_{\text{AII}}$) obținute pentru matricile cu concentrațiile specificate de AT

AT, %	Amidă A, cm^{-1}	Amidă I, cm^{-1}	Amidă II, cm^{-1}	Amidă III, cm^{-1}	CH_2 oscilație, cm^{-1}	($\nu_{\text{AI}} - \nu_{\text{AII}}$), cm^{-1}
0	3301	1629	1545	1237	1451	84
5	3292	1630	1542	1235	1448	88
10	3291	1630	1539	1232	1447	91
15	3291	1631	1539	1231	1447	92

din banda amidă III apar la $1336\text{-}1332$, $1278\text{-}1276$, $1235\text{-}1231$ și $1202\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$, iar intensitățile se modifică cu creșterea concentrației AT: 1335 cm^{-1} își mărește ușor intensitatea, dar sunt identice pentru 10 și 15%; intensitatea umărului de la 1277 cm^{-1} scade și nu se mai observă pentru matricea cu 15% AT. Banda martorului de la 1237 cm^{-1} se deplasează spre ν mai mici, dar își păstrează înălțimea. Intensitatea umărului de la 1203 cm^{-1} se mărește: pentru 5% AT devine bandă, la 10% intensitate este comparabilă cu a celei de la 1237 cm^{-1} , iar la 15% este mai intensă. Transformarea umărului de la 1200 cm^{-1} în bandă și creșterea intensității sale se datorează reticulării, accentuată de cantitatea de AT. (c) Intensitățile benzilor martorului de la 1080 și 1031 cm^{-1} se modifică cu creșterea concentrației AT: a doua, mai puțin intensă, devine mai intensă în prezența AT, pentru 10 și 15% AT fiind mai intensă ca prima. Diferențele ($\nu_{\text{AI}} - \nu_{\text{AII}}$) cresc cu concentrația AT, dar rămân sub 100 cm^{-1} .

Deplasările ușoare ale benzilor amidă A, II și III spre numere de undă mai mici, creșterea intensității benzii de la 1200 cm^{-1} din banda complexă amidă III și scăderea intensității benzii amidă I la introducerea AT se pot asocia cu reticularea collagenului cu AT prin asemenea forțe.

6.1.2. Caracterizarea prin SEM

SEM, evidențiind aglomerarea fibrilelor și modificarea dimensiunilor porilor matricilor, permite urmărirea extinderii reticulării. Imaginile SEM pentru matricile martor și cu AT sunt date în figurile 6.3a-d.

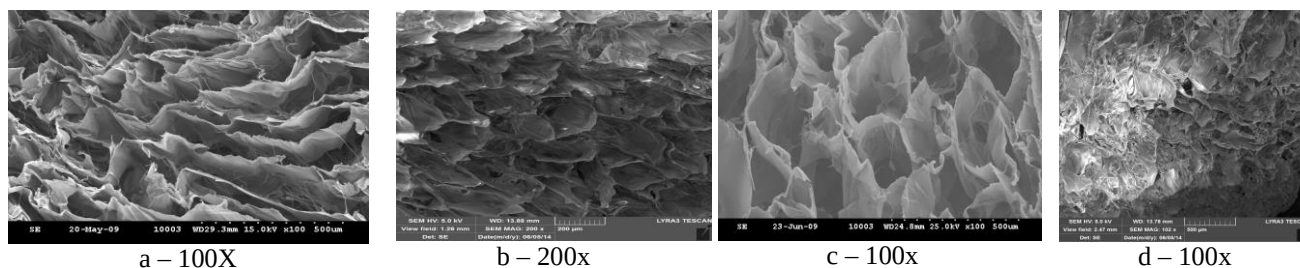


Figura 6.3. Imaginile SEM 100x ale matricilor: a – martor și cu b – 5%; c – 10%; d – 15% AT

Figura 6.3a arată matrice lamelară pentru martor și pori alungiți interconectați prin fibre și fibrile de collagen cu grosimi de cca $0,3\text{-}8,0 \mu\text{m}$. Lungimile sunt de $100\text{-}500 \mu\text{m}$, iar lățimile la $50\text{-}150 \mu\text{m}$.

Matricea obținută din hidrogelul cu 5% AT nu mai are structură lamelară (figura 6.3b), porii sunt inelari și turtiți, cu dimensiuni de $40\text{-}220 \mu\text{m}$, predominând cei mari. Diferența de morfologie se datorează viscozității mai mari a hidrogelului cu AT, care conduce la formarea de cristale de gheață mai mari.

Dublarea concentrației AT face ca porii inelari să fie mai bine conturați, cu dimensiunile alungite de $350\text{-}500 \mu\text{m}$ și cele mici de $100\text{-}250 \mu\text{m}$ și porțiuni compacte mari de collagen, datorate reticulării cu AT.

Aspectul matricilor cu 15% AT este foarte neomogen, cu pori mici (figura 6.3d) și regiuni compacte, determinate de reticularea mai avansată.

6.1.3. Caracterizarea prin absorbția apei

Capacitatea remarcabilă a matricilor de collagen de a reține mediu apos este dată de numărul mare de grupe hidrofile: amidă, carboxil și hidroxil. [30] Îmbibarea în medii apoase este foarte importantă pentru utilizarea ca pansamente, asigurând hidratarea suprafeței țesutului și cedarea medicamentului. Îmbibarea cu fluide biologice este prima etapă, obligatorie, în degradarea matricii.

Rezultatele pentru absorbția apei, exprimate ca raport între masa apei absorbite și masa inițială a matricii (g/g), sunt prezentate în figura 6.5 pentru matricile M1-M4, cu un detaliu în interiorul figurii pentru absorbția la timpi mici. [18]

Cele mai mari cantități de apă sunt absorbite de matricea martor (curba B). Aceasta absoarbe foarte mult în primele cca 70 min, devenind din ce în ce mai gelatinoasă, cantitatea scade între 70 și 100 min, iar la 120 min matricea își pierde integritatea.

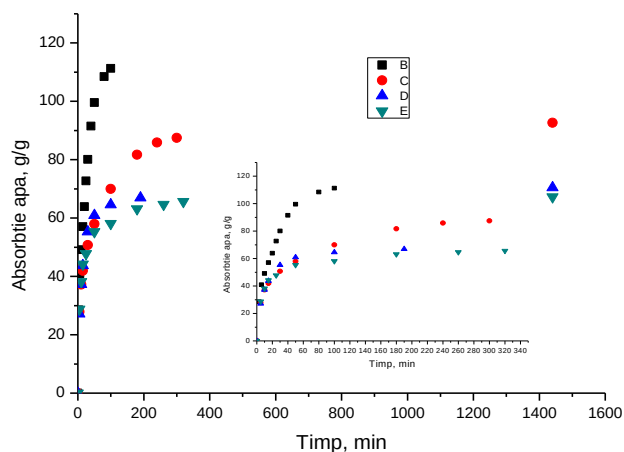


Figura 6.5. Cantitățile de apă absorbite în timp de 24 h de matricile care conțin AT: B – 0; C – 5; D – 10; E – 15%

Pentru matricea din hidrogelul cu 5% AT absorbția apei este mult mai redusă. Aceasta – fiind reticulată, nu-și mai pierde integritatea, ci se transformă într-o masă gelatinoasă voluminoasă continuă. Mai accentuată în primele cca 200 min, absorbția scade treptat.

Mărind cantitatea de AT la 10% absorbția scade mai mult și peste 100 min diferența față de matricea de referință devine semnificativă.

Curba pentru matricea cu 15% AT este foarte apropiată de cea anterioară, sugerând grade de reticulare apropiate și demonstrând că 10% AT este suficient pentru reticularea collagenului.

6.1.4. Caracterizarea prin digestie cu collagenază

Colagenaza, enzima cea mai utilizată pentru digestia collagenului *in vitro*, [34] scindează lanțurile, lăsând intacte legăturile intermoleculare. De aceea se utilizează pentru evaluarea gradului de reticulare.

Matricile cu AT servesc drept probe martor pentru cele care conțin AT și DGCH. Digestia s-a efectuat în condiții fiziologice – în soluție tampon fosfat salină cu pH 7,4 și la temperatura de 37°C. [18]

Matricile în care AT este absent dispar în cca 30 min, iar soluția în care se face digestia rămâne clară. Dacă conțin 5% AT matricile își păstrează integritatea și forma timp de cca 240 min, apoi se dezintegrează în fragmente puternic îmbibate. Soluția în care se face digestia nu mai este foarte clară, ci slab colorată în galben-verzui. Dublând cantitatea de AT matricile rămân întregi timp de 24 h, fragmentele formate prin dezintegrare ulterioară sunt mai mari decât cele rezultate în urma dezintegrării celor reticulate cu 5% AT, iar turbiditatea și culoarea solției în care se face digestia se intensifică puțin. Pentru 15% AT rezistența este de 9 zile, ultima zi de observație. Probele își păstrează forma, dar au volum mult mărit. [18]

6.2. Matrici cu digluconat de clorhexidină

6.2.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Spectrele FT-IR ale matricilor martor și ale celor cu DGCH obținute din hidrogelurile cu ambele pH-uri, ultimele în absența și prezența AG, sunt prezentate în figura 6.6. [16]

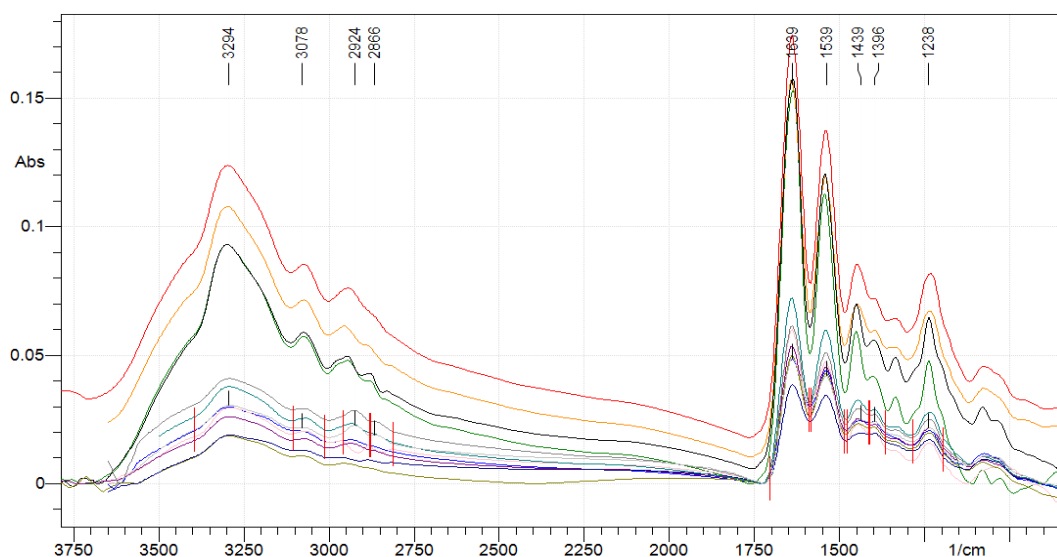


Figura 6.6. Spectrele FT-IR ale matricilor din hidrogelurile: acide cu 0, 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH; slab bazice cu 0, 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH; slab bazice și 0,15% GA cu 0, 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH

Spectrele sunt grupate în două categorii: cu benzi intense pentru matricile rezultate din hidrogeluri acide și foarte slabe și apropiate pentru cele obținute din hidrogeluri slab bazice.

Matricile obținute din hidrogeluri acide, discutate în continuare, au intensitățile benzilor amidă I și II foarte apropiate, dar diferite pentru amidă III. Valorile caracteristicilor spectrelor sunt date în tabelul 6.2.

Tabelul 6.2. Frecvențele benzilor amidă I-III, A și de oscilație a grupei metilen, rapoartele A_{III}/A_{1450} și A_I/A_A și diferențele ($\nu_{AI} - \nu_{AII}$) pentru matricile martor și cu DGCH

DGCH, %	Amidă A, cm^{-1}	Amidă I, cm^{-1}	Amidă II, cm^{-1}	Amidă III, cm^{-1}	Oscilație CH_2 , cm^{-1}	A_{III}/A_{1450}	A_I/A_A	$(\nu_{AI} - \nu_{AII})$, cm^{-1}
pH 3,8								
0	3293	1639	1542	1234	1446	1.98	1,27	97
1,82	3300	1637	1543	1238	1450	2.00	1,37	94
4,55	3298	1639	1542	1234	1446	2.08	1,36	97
9,09	3298	1637	1543	1238	1450	2.15	1,37	94

Tabelul demonstrează că DGCH nu modifică pozițiile benzilor collagenului, dar mărește rapoartele A_{III}/A_{1450} , deci stabilizează helixurile. Rapoartele A_I/A_A , măsură a reticulării, cresc cu concentrația DGCH, datorită reticulării collagenului cu dicarboni CH și formării de microzone reticulate prin forțe mai slabe.

Scăderea intensității benzii amidă I se poate datora creșterii ușoare a interacțiunilor prin legături de hidrogen în collagen, deci reticulării sale slabe, dovedită și de mărirea ușoară a rapoartelor A_I/A_A .

7.2.2. Caracterizarea prin SEM

Imaginile SEM obținute pentru matricea rezultată din hidrogelul acid martor, precum și pentru cele care conțin 1,83 și 4,55% DGCH sunt prezentate în figura 6.7a-c. [16]

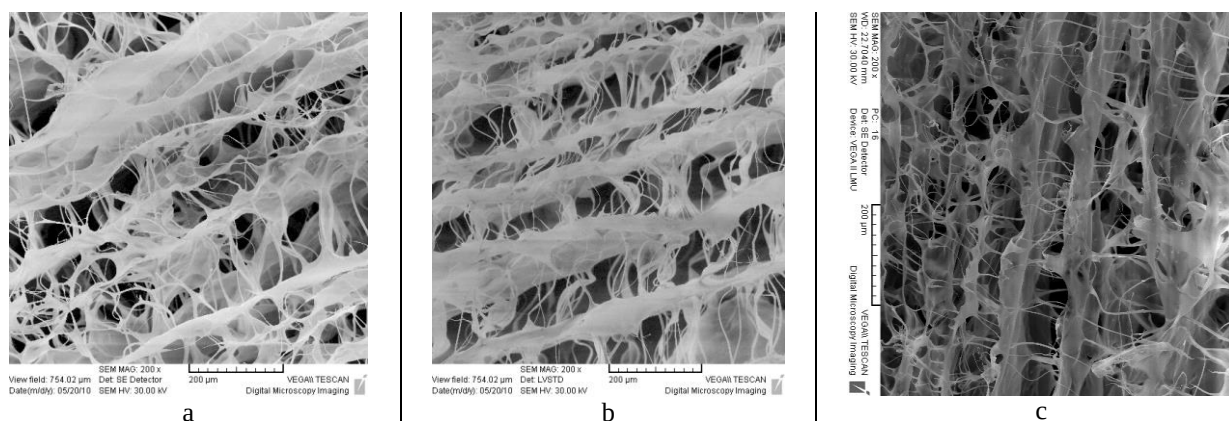


Figura 6.7. Imaginile SEM 200x ale matricilor obținute din hidrogeluri acide: a – martor; b – cu 1,82 % DGCH; c – cu 4,55% DGCH

Introducerea cantității minime de DGCH dă imaginea SEM din figura 6.7b: matricile rămân lamelare, cu lamele mai groase decât pentru martor, și distanțe mai mici, rezultând pori mai mici. Îngroșarea lamelilor se datorează reticulării collagenului cu dicarboni CH. 4,55% DGCH modifică și mai mult morfologia (figura 6.7c): lamelele se apropie mai mult, predominând cele subțiri și porii mici.

6.3. Matrici cu acid tanic și digluconat de clorhexidină

6.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Spectrele matricilor cu AT și DGCH sunt prezentate și discutate la concentrații constante de DGCH. Figura 6.11 prezintă spectrele matricilor M5-M7, cu 1,82% DGCH și cele trei cantități de AT. [18]

Numerele de undă ale benzilor amidă A, I-III, de oscilație a grupei CH_2 și diferențele dintre numerele de undă ale benzilor amidă I și II sunt date în tabelul 6.3-6.5.

Spectrele matricilor cu 1,82% DGCH și 5, 10 și 15% AT sunt foarte asemănătoare cu ale matricii M1 în intervalul de frecvențe $4000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, în care se află benzile amidă A, B, I și II și de oscilație a grupei CH_2 . Ușoară scădere a intensităților și deplasare slabă spre frecvențe mai mici a benzii amidă A apar doar pentru 10 și 15% AT. În intervalul $1400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ intensitățile se modifică, dar pozițiile rămân aceleași: umărul de la 1203 cm^{-1} devine bandă și intensitatea sa crește cu cantitatea de AT, ca pentru matricile cu AT. Comparându-le cu acestea se constată că sunt puțin mai intense, probabil din cauza

blocării unei părți din AT cu DGCH, care reduce reticularea. Modificări ale intensităților benzilor cu cantitatea de AT se observă și în intervalul $1120-1000\text{ cm}^{-1}$, asemănătoare cu cele pentru matricile cu AT.

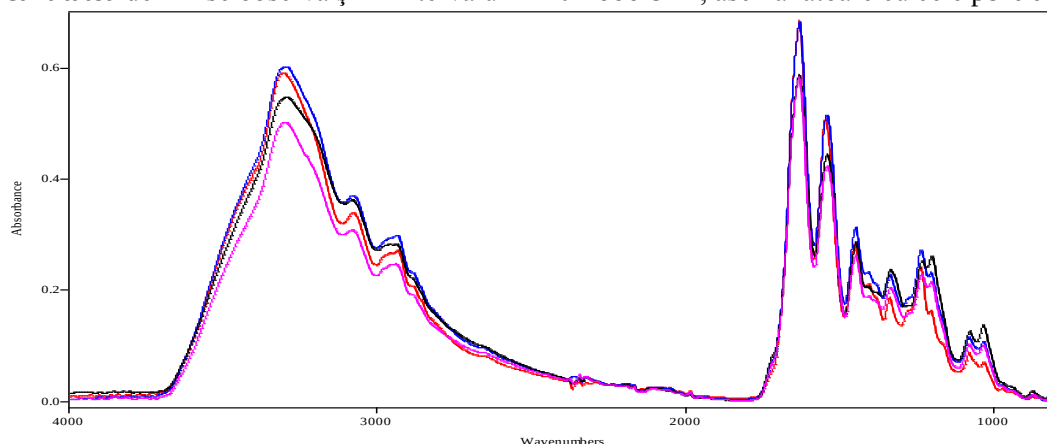


Figura 6.11.
Spectrele FT-IR
ale matricilor cu
1,82% DGCH și:
P1 – 0; P5 – 5;
P6 – 10 și P7 –
15% AT

Rezultatele de mai sus demonstrează că AT interacționează cu collagenul mai puternic decât DGCH, iar o parte interacționează și cu DGCH, făcându-l astfel indisponibil pentru reticularea collagenului.

Tabelul 6.3.-6.5. Frecvențele benzilor amidă A și I-III, de oscilație a grupeii CH_2 și diferențele ($\nu_{\text{A}_I} - \nu_{\text{A}_{II}}$) pentru matricile ce conțin toate combinațiile între cele trei cantități de DGCH și AT

Matrice	AT, %	Amidă A, cm^{-1}	Amidă I, cm^{-1}	Amidă II, cm^{-1}	Amidă III, cm^{-1}	CH_2 oscilație, cm^{-1}	$(\nu_{\text{A}_I} - \nu_{\text{A}_{II}}), \text{cm}^{-1}$
M1	0	3301	1629	1545	1237	1451	84
M5	5	3294	1629	1541	1236	1448	88
M6	10	3296	1631	1539	1234	1447	92
M7	15	3292	1630	1539	1233	1447	91
M8	5	3299	1631	1538	1233	1447	93
M9	10	3299	1631	1538	1235	1448	93
M10	15	3299	1631	1537	1231	1447	94
M11	5	3306	1631	1539	1237	1449	88
M12	10	3303	1632	1539	1235	1448	92
M13	15	3297	1631	1536	1234	1447	91

Diferențele numerelor de undă ale benzilor amidă I și II sunt aceleași ca pentru matricile cu AT (toate sub 100 cm^{-1}), deci nici acestea nu conțin collagen denaturat.

La concentrația de 4,55% DGCH apar, în principiu, aceleași modificări cu mărirea concentrației AT, dar scăderile intensităților sunt mai pronunțate, în special când matricea conține 10% AT – tabelul 6.3.

Diferențele dintre numerele de undă ale benzilor amidă I și II sunt puțin mai mari decât pentru matricile anterioare, dar sunt inferioare valorii 100 cm^{-1} , deci matricile nu conțin collagen denaturat.

Modificările aduse de dublarea cantității de DGCH sunt, în principiu, aceleași ca în spectrele anterioare. Caracteristică este apropierea intensităților tuturor benzilor când matricile conțin 10 și 15% AT.

Frecvențele benzilor sunt date tot în tabelul 6.3. Diferențele numerelor de undă ale benzilor amidă I și II arată că nici matricile M11-M13 nu conțin collagen denaturat.

În concluzie, în matricile de collagen care conțin toate combinațiile dintre 5, 10 și 15% AT și 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH nu există collagen nendenaturat, deci acestea pot servi ca pansamente pentru răni.

6.3.2. Caracterizarea prin SEM

Imaginile SEM pentru matricile ce conțin 1,82% DGCH și 5, 10 și 15% AT sunt prezentate în figura 6.14.a-c. Comparate cu cele care conțin doar AT, porii sunt mai mici, mai slab definiți, mai alungiți și mai neregulați, caracteristici care se accentuează când crește cantitatea de AT.

Suprafețele matricilor cu 5,05% DGCH și AT se aseamănă cu ale celor anterioare și există aceeași tendință de micșorare a dimensiunilor porilor cu creșterea concentrației AT. Porii sunt însă mai bine definiți, iar compactitatea crește mai accentuat cu conținutul de AT. Matricile cu 10% AT și 5,05% DGCH au cei mai bine definiți pori.

Cantitatea de 9,09% DGCH conduce la matricile cu imaginile din figura 5.16.

Deși aspectul nu se modifică mult comparativ cu al matricilor anterioare, dimensiunile porilor sunt mai neuniforme și, la ultimele două concentrații de AT, mai mici, din cauza reticulării mai puternice. În

toate imaginile apar regiuni cu dimensiuni mult mai mici ale porilor, datorate probabil reticulării cu DGCH, care conduce la rețele tridimensionale mai dense, lucru evidențiat și prin alte măsurători.

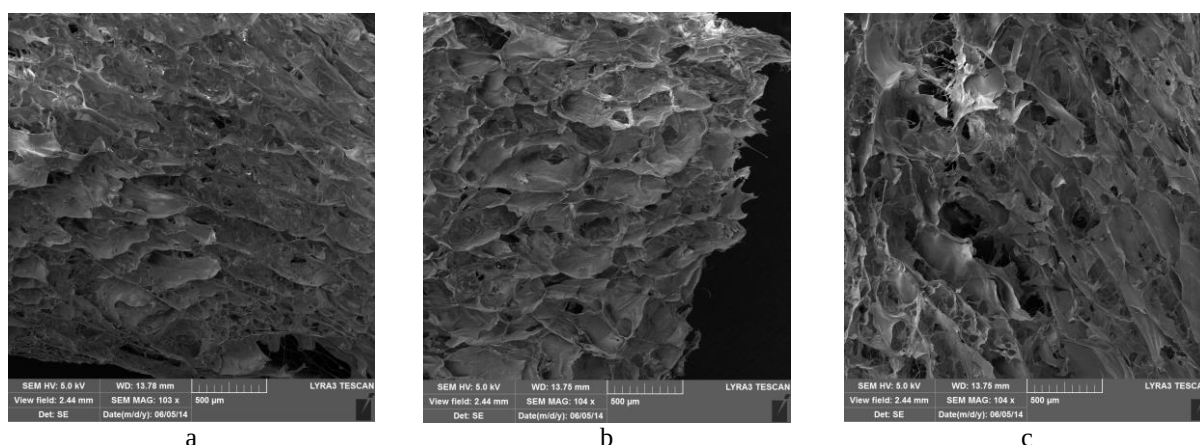


Figura 6.14. Imaginile SEM 100 x ale matricilor care conțin 1,82% DGCH și: a – 5, b – 10 și c – 15% AT

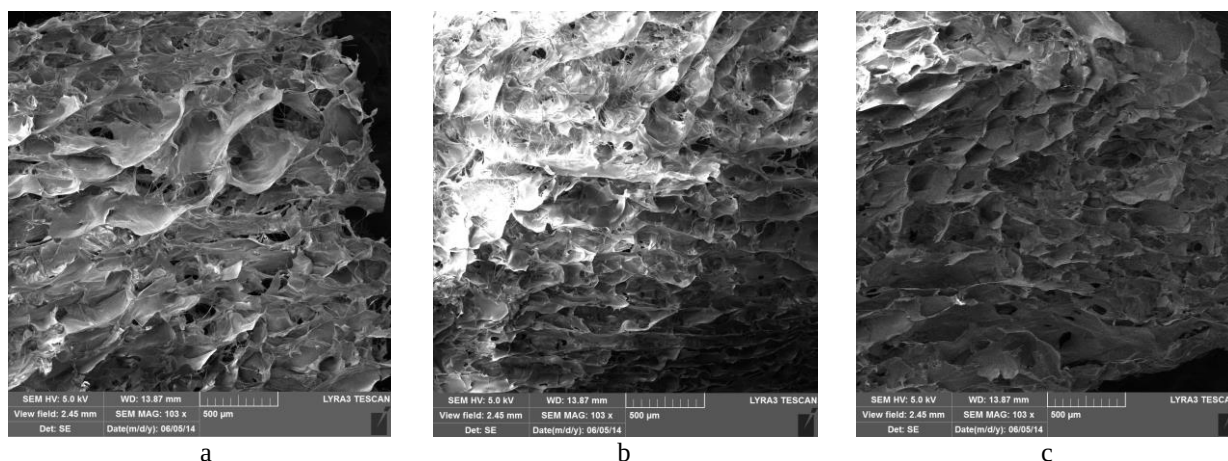
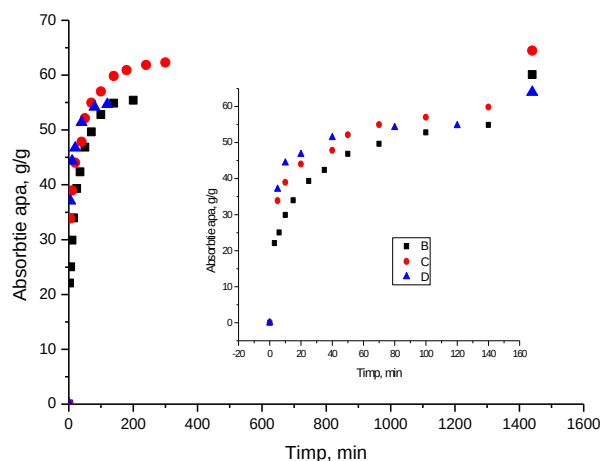


Figura 6.16. Imaginile SEM 100x ale matricilor care conțin 9,09% DGCH și: a – 5, b – 10 și c – 15% AT

În concluzie, cel mai adecvat raport între cele două substanțe antimicrobiene din punctul de vedere al dimensiunilor și uniformității porilor matricilor este 10% AT/5,05% DGCH, concluzie desprinsă și din alte proprietăți.

6.3.3. Caracterizarea prin absorbția apei

Curbele care dau cantitățile de apă absorbită de matricile obținute prin liofilizarea hidrogelurilor ce conțin 1,82% DGCH și cele trei cantități de AT în interval de 24 h sunt prezentate în figura 6.14. [18]



Matricea care conține 10% AT absoarbe cea mai mare cantitate de apă pe întreg intervalul (24 h), cu excepția primelor 40 min în care cea cu 15% AT absoarbe ceva mai mult, și nu de cea cu 5%, cum era de așteptat, fiind cea mai puțin reticulată.

Comparând cu absorbțiile matricilor cu AT, serie în care absorbția scade cu creșterea concentrației AT, când este prezent DGCH în concentrație de 1,82% ordinea anterioară nu se mai păstrează: matricea ce conține 10% AT absoarbe cantitatea maximă în 24 h, dar aceasta este mai mică decât atunci când nu conține DGCH. Aceasta demonstrează că DGCH reduce hidrofilia matricilor reticulate cu AT.

Dacă hidrogelurile din care s-au

Figura 6.14. Cantitățile de apă absorbite de matricile cu 1,82 % DGCH și: ■ – 5; ● – 10 și ▲ – 15% AT preparat matricile conțin 4,55% DGCH, curbele de absorbție au aceeași alură, dar cantitățile absorbite sunt mai mari, comparabile cu ale celor cu AT. Cea mai mare cantitate este absorbită de matricea cu 10% AT, urmată de cea cu 5%. Singura explicație pentru mărirea hidrofiliei ar fi că aceasta este cantitatea optimă de digluconat pentru combinațiile cu AT.

Mărind cantitatea de DGCH la 9,09% alura curbelor se păstrează, dar valorile absorbțiilor variază invers cu cantitatea de AT pentru timpi de absorbție sub 120 min: cel mai mult absoarbe matricea cu 15% AT, urmată de cea cu 10%, și cel mai puțin cea cu 5%. Între 4 și 24 h ordinea cantităților absorbite este: matricea cu 15% AT absoarbe mai mult decât cea cu 5%, iar cel mai puțin absoarbe matricea cu 10%. Toate matricile sunt puțin mai hidrofobe ca cele cu 4,55% DGCH, dar puțin mai hidrofile ca cele cu 1,82%. Trebuie remarcat diferențele mici dintre cantitățile de apă absorbite în 24 h.

În concluzie se poate spune că cea mai convenabilă cantitate de DGCH pentru a fi combinată cu cele trei cantități de AT pare a fi 4,55%, iar dintre acestea – combinația 10% AT-5,05% DGCH.

6.3.4. Caracterizarea prin digestie cu collagenază

Prezența simultană a celor două substanțe antimicrobiene în matricile de collagen mărește spectaculos rezistența la digestie cu collagenază. Astfel, toate matricile rezistă 9 zile (ultima zi de observare), cu excepția celor care conțin 5% AT și 1,82% DGCH, care – în ultima zi – sunt fragmentate în 2 sau 3 bucăți. Aceasta demonstrează, încă odată, că și DGCH reticulează collagenul, sau cel puțin se leagă de fibrilele, crescându-le astfel rezistența la digestie. Matricile cu 9,09% DGCH și 5 și 10% AT își păstrează forma, pe când marginile celor care conțin 15% AT sunt puțin erodate. Acest lucru este în concordanță cu observațiile anterioare, că 15% AT depășește cantitatea necesară reticulării și că excesul afectează într-o oarecare măsură collagenul nativ. [18]

Bibliografie

- M. Geiger și W. Friess, Collagen sponge implants: applications, characteristics and evaluation: Part II, Pharm. Tech. Europe, 14, 58-66, **2002**.
- M. Geiger și W. Friess, Collagen sponge implants: applications, characteristics and evaluation: Part I, Pharm. Tech. Eur., 14, 48-56, **2002**.
- V. Glattauer, J.F. White, W.B. Tsai, C.C. Tsai, T.A. Tebb, S.J. Danon, J.A. Werkmeister și J.A. Ramshaw, Preparation of resorbable collagen-based beads for direct use in tissue engineering and cell therapy applications, J. Biomed. Mater. Res., A 92, 1301-1309, **2010**.
- F. Takeshita, N. Hokaiwado, K. Honma, A. Banas și T. Ochiya, Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy, Methods Mol. Biol., 487, 83-92, **2009**.
- F. Takeshita și T. Ochiya, Therapeutic potential of RNA interference against cancer, Cancer Sci., 97, 689-696, **2006**.
- A. Sano, M. Maeda, S. Nagahara, T. Ochiya, K. Honma, H. Itoh, T. Miyata și K. Fujioka, Atelocollagen for protein and gene delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 1651-1677, **2003**.
- M.V. Ghica, M.G. Albu, L. Popa, M. Leca, L. Brăzdaru, C. Cotruș, și V. Trandafir, Drug delivery systems based on collagen-tannic acid matrices, Rev. Roum. Chim., 54, 1103-1110, **2009**.
- D. Șulea, M.G. Albu, M.V. Ghica, L. Brăzdaru, M. Leca și L. Popa, Characterization and in vitro release of chlorhexidine digluconate contained in type I collagen porous matrices, Rev. Roum. Chim., 56, 65-71, **2011**.
- L. Mincan, M.G. Albu, M. Leca și R. Sirbu, Izolation of type I fibrillar collagen and characterization of collagen matrices, Timișoara Medical J. 55 Suppl., 212-214, **2005**.
- L. Mincan, M. Micuț, M.V. Ghica, M.G. Albu, M. Leca, **baiatul cu FT-IR și SEM?**, Characterization of collagen matrices containing tannic acid and chlorhexidine digluconate and tannic acid delivery, **revista**, sent for publication.
- C. Petibois, G. Gouspillou, K. Wehbe, J-P. Delage și G. Deleris, Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue, Anal. Bioanal. Chem., 386, 1961-1966, **2006**.
- R.J. Jakobsen, L.L. Brown, T.B. Hutson, D.J. Fink și A. Veis, Intermolecular interactions in collagen self-assembly as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy, Sci., 220, 1288-1290, **1983**.
- K.J. Payne și A. Veis, Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies, Biopolymers, 27, 1749-1760, **1988**.
- A. George și A. Veis, FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro, Biochem., 30 2372-2377, **1991**.
- K. Pal, A.K. Banthia, D.K. Majumdar, Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications – A mini review, Design. Monomers Polymers, 12, 197-220, **2009**.
- R. Mayne și R. Burgeson, „Structure and Function of Collagen Types”, Academic Press, N.Y., 1987.

7. ELIBERAREA ACIDULUI TANIC DIN MATRICI

Collagenul, datorită proprietăților fizice, chimice și imunologice, biocompatibilității, absenței toxicității, antigenității slabe, capacității de reconstituire și acțiunii hemostatice este suport pentru multe medicamente. [10-13]

AT se leagă cu collagenul prin legături de hidrogen, [24] forțe electrostatice, [25] interacțiuni hidrofobe [26] și legături covalente. [27] Reticularea poate fi modulată prin cantitatea de AT introdusă. [28]

Presupunând matricea de collagen suport polimeric omogen, medicamentul poate fi liber sau legat. Matricea fiind poroasă, medicamentul liber difuzează și se eliberează practic imediat, iar cel parțial imobilizat este eliberat treptat, pe măsură ce fluidul biologic difuzează iar îmbibarea și eroziunea matricii progresează. Eliberarea prelungită este favorizată de porozitatea și structura tridimensională a matricii. [32, 33] Cinetica eliberării mai este influențată de tratamentele chimice aplicate matricii și de modificarea porozității sau densității sale. [34]

Ecuția cinetică ce descrie eliberarea medicamentelor din suporturi are următoarea formă generală:

$$m_t/m_\infty = kt^n \quad (7.1)$$

în care m_t este cantitatea de medicament eliberată la timpul t , m_∞ – cantitatea totală de medicament conținut în suport, m_t/m_∞ – fracția de medicament eliberat, k – constanta cinetică și n – exponentul de eliberare, care indică mecanismul prin care aceasta are loc: (a) dacă n are valoarea 0,5 viteza de difuziune a medicamentului este mult mai mică decât cea de relaxare a suportului, cantitatea eliberată este proporțională cu radical din timpul de eliberare, iar eliberarea este guvernată de prima lege a lui Fick; modelul ce descrie comportarea a fost elaborat de Higuchi; (b) când n este 1 viteza de difuziune a medicamentului este mult mai mare decât cea de relaxare a suportului, cantitatea eliberată este proporțională cu timpul de eliberare și este descrisă de modelul de ordinul zero; (c) dacă $0,5 < n < 1$ viteza de difuziune este de același ordin de mărime cu cea de relaxare a suportului, eliberarea nu se bazează doar pe difuziune ci este asociată și cu alte mecanisme, iar modelul care o descrie a fost elaborat de Ritger-Peppas. [30, 35, 36]

Pentru suporturi poroase care nu se îmbibă n este mai mic decât 0,5 și se utilizează o extindere a modelului Peppas, numită modelul legii puterii, în care n are valoarea cuprinsă între 0 și 1.

Eliberarea AT s-a determinat *in vitro* în condiții fiziologice: mediu de cedare soluție tampon fosfat salină cu pH 7,4 și temperatură de 37°C.

AT interacționând cu DGCH prin legături de hidrogen și forțe hidrofobe, [37] prezența DGCH influențează reținerea sa și eliberarea din cele două categorii de matrici trebuie discutată separat.

7.1. Eliberarea din matrici care conțin numai acid tanic

Concentrația AT eliberat s-a măsurat prin spectrofotometrie UV, din valorile absorbanțelor maximului de la lungimea de undă de 276 nm, folosind curba de etalonare trasată în prealabil. [38]

Cantitățile cedate din matricile de collagen obținute din hidrogelurile ce conțin cele trei procente de AT, exprimate ca procente din cantitatea totală introdusă, sunt prezentate în figura 7.2.

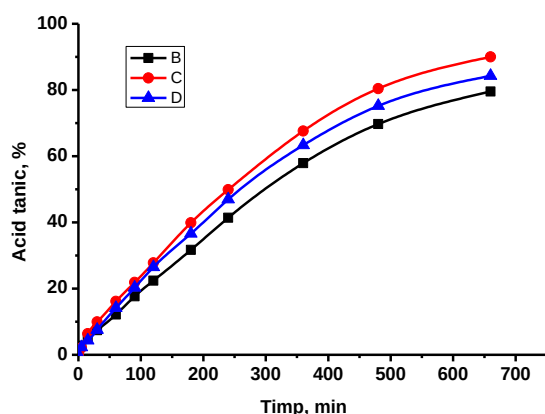


Figura 7.2. Curbele cumulative de eliberare a AT din matricile de collagen cu: B – 5%; C – 10% și D – 15% AT

Curbele au alură asemănătoare: până la cca 240 min cantitatea cedată crește practic liniar în timp, apoi se reduce și peste 500 min tinde spre un platou. Cea mai mare cantitate este cedată de matricea cu 10% AT. Aceasta susține ipoteza că 10% AT este suficient pentru a reticula collagenul. Excesul denaturează collagenul, măbind numărul de grupe funcționale, deci legarea de collagen este mai puternică și este eliberat mai puțin.

Datele obținute pentru cedarea AT au fost introduse în cele trei modele ce descriu cinetica eliberării, iar valorile obținute pentru coeficienții de corelare sunt date în tabelul 7.1.

Valorile arată că datele de cedare sunt descrise cel mai satisfăcător, pentru toate matricile, de modelul Ritger-Peppas. Acest lucru era de așteptat, la eliberarea din matrici poroase contribuind, în afara

difuziunii și relaxării suportului, și alte fenomene, cum este îmbibarea matricii cu fluidul de cedare. Modelul de ordinul unu poate fi valabil doar în primele minute.

Cu modelul Ritger-Peppas s-au calculat parametrii cinetici k și n , iar valorile obținute sunt prezentate în tabelul 7.2, împreună cu cantitățile maxime eliberate măsurate (la 660 min) – c_m .

Valorile coeficienților de eliberare sunt foarte apropiate pentru matricile cu 10 și 15% AT, probabil din cauza gradului de reticulare apropiat. Deci la eliberare contribuie și alte fenomene ce au loc la

Tabelul 7.1. Valorile coeficienților de corelare obținuți cu modelele menționate

% AT	Modelul Higuchi	Modelul de ordin zero	Modelul Ritger-Peppas
5	0,9700	0,9702	0,9924
10	0,9794	0,9568	0,9916
15	0,9775	0,9562	0,9902

Tabelul 7.2. Parametrii cinetici calculați cu modelul Ritger-Peppas pentru matricile cu AT

% AT	k, min ⁻ⁿ	n	c _m , %
5	0,711	0,734	79,54
10	1,113	0,685	90,00
15	0,961	0,698	84,28

introducerea matricilor în soluția de fosfat, cel mai important fiind îmbibarea, care controlează probabil cedarea. Rezultatele sunt în concordanță cu absorbțiile de apă, foarte apropiate pentru aceste matrici.

7.2. Eliberarea din matrici care conțin acid tanic și digluconat de clorhexidină

Eliberarea AT din matricile ce conțin toate combinațiile dintre AT și DGCH s-a determinat în același mod, iar cantitățile cedate s-au măsurat și exprimat similar. S-au calculat coeficienții de corelare cu cele trei ecuații cinetice și parametrii de cedare cu ecuația Ritger-Peppas ce descrie cel mai fidel cedarea și în aceste cazuri. Curbele prezentând regularități la concentrații constante de AT, se discută separat.

7.2.1. Eliberarea din matrici cu 5% acid tanic

Curbele de eliberare cumulativă a AT din matricile cu 5% AT și 1,82, 4,55, respectiv 9,09% DGCH sunt reprezentate în figura 7.3.

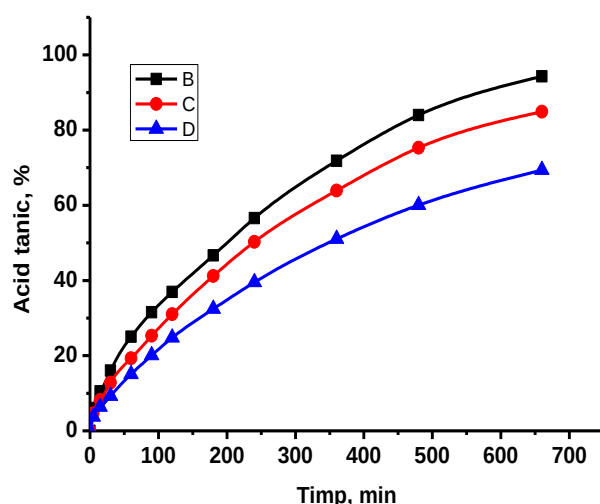


Figura 7.3. Curbele cumulative de eliberare a AT din matricile cu 5% AT și B – 1,82, C – 4,55 și D – 9,09% DGCH

Pentru aceste matrici regiunile de creștere liniară a cantităților de AT în primele cca 3 h cu timpul sunt înlocuite cu regiuni exponențiale. Cu cât procentul de DGCH este mai mare, cu atât cantitatea de AT eliberată este mai redusă, fiind simțitor mai mică pentru matricea cu cantitatea maximă de DGCH. Rezultatele pentru cantitățile

Tabelul 7.3. Coeficienții de corelare pentru matricile cu 5% AT și DGCH calculați cu modelele specificate

% DGCH	Modelul Higuchi	Modelul de ordin zero	Modelul Ritger-Peppas
1,82	0,9960	0,9329	0,9974
4,55	0,9919	0,9424	0,9959
9,09	0,9911	0,9506	0,9973

Tabelul 7.4. Parametrii cinetici dați de modelul Ritger-Peppas pentru matricile cu 5% AT și DGCH

% DGCH	k, min ⁻ⁿ	n	c _m , %
1,82	2,548	0,562	94,28
4,55	1,789	0,601	84,89
9,09	1,289	0,618	69,40

cedate sunt în concordanță cu viscozitățile dinamice ale hidrogelurilor din care s-au obținut matricile, sugerând că difuzia AT prin hidrogelul format prin îmbibarea matricilor cu soluția de fosfat joacă rol important în eliberare.

Valorile coeficienților de corelare obținuți cu ecuațiile cinetice ce descriu eliberarea din suporturi sunt mai apropiate de unitate tot pentru ecuația Ritger-Peppas, cum se poate vedea din tabelul 7.3.

Exponenții de eliberare (tabelul 7.4), calculați cu ecuația Ritger-Peppas, sunt mai mici decât pentru matricea cu aceeași cantitate de AT, cu valorifoarte apropiate pentru cele cu 4,55 și 9,09% DGCH.

Cantitățile de AT maxime eliberate, c_m, date în același tabel, scad cu creșterea cantității de DGCH apoi cresc, la fel ca viscozitățile hidrogelurilor la mărirea cantității de digluconat (tabelele 5.19-5.21).

7.2.2. Eliberarea din matrici cu 10% acid tanic

Curbele de eliberare a AT din matricile cu 10% AT și DGCH sunt prezentate în figura 7.4.

Acestea sunt plasate asemănător cu cele anterioare numai pentru 1,82 și 4,55% DGCH, pe când cea pentru matricea cu 9,09% digluconat este situată deasupra primelor două. Deci matricea cu cea mai mare cantitate de DGCH cedează cele mai mari cantități de AT, urmată de cea cu 1,82%. Pozițiile curbelor sunt

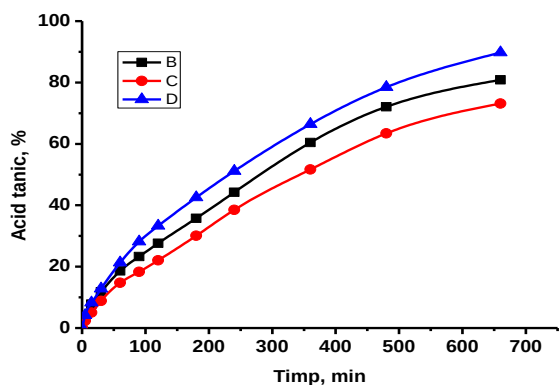


Figura 7.4. Curbele cumulative de eliberare a AT din matricile cu 10% AT și 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH

Tabelul 7.5. Valorile coeficienților de corelare obținuți pentru matricile cu 10% acid tanic și 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH

% DGCH	Modelul Higuchi	Modelul de ordin zero	Modelul Ritger-Peppas
1,82	0,9876	0,9547	0,9957
4,55	0,9810	0,9685	0,9968
9,09	0,9939	0,9444	0,9977

Tabelul 7.6. Parametrii cinetici obținuți cu modelul Ritger-Peppas pentru matricile cu 10% AT și DGCH

% DGCH	k, min ⁻ⁿ	n	c _m , %
1,82	1,405	0,630	80,85
4,55	0,862	0,689	73,15
9,09	1,878	0,600	89,74

în concordanță cu viscozitățile hidrogelurilor din care s-au obținut matricile, cea mai mare viscozitate având hidrogelul cu 4,55% digluconat. Deci și în acest caz difuzia AT prin hidrogelul format în urma îmbibării matricii este importantă în procesul de cedare.

Valorile coeficienților de corelare obținuți cu modelele cinetice utilizate au valorile cele mai apropiate de unitate tot pentru modelul Ritger-Peppas, așa cum se poate vedea din tabelul 7.5.

Cele mai mici valori ale coeficienților de corelare au rezultat pentru modelul de ordinul zero, eliberarea la timpi mici depinzând neliniar de timp, și cele mai mari pentru Ritger-Peppas.

Coeficientul de eliberare are cea mai mare valoare pentru matricea care conține 4,55% digluconat, pentru care s-a măsurat și cea mai mică cantitatea maximă eliberată, cum se poate constata din tabelul 7.6.

7.2.3. Eliberarea acidului tanic din matrici cu 15% acid tanic

Reprezentate în figura 7.5, curbele cumulative pentru eliberare a AT din matricile cu 15% AT sunt plasate cu atât mai sus cu cât conțin mai mult DGCH, deci cantitățile eliberate cresc cu cantitatea de DGCH.

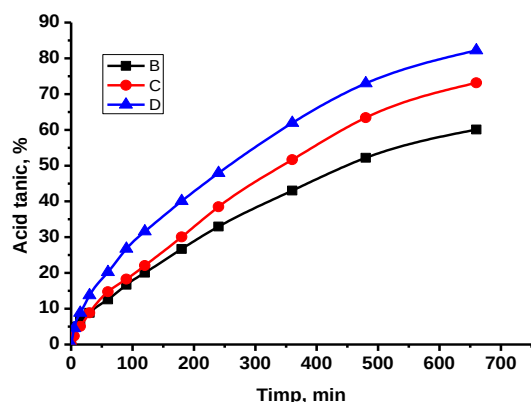


Figura 7.5. Curbele cumulative de eliberare a AT din matricile cu 15% AT și 1,82, 4,55 și 9,09% DGCH

Tabelul 7.7. Valorile coeficienților de corelare obținuți cu modelele specificate pentru matricile cu 15% AT DGCH

% DGCH	Modelul Higuchi	Modelul de ordin zero	Modelul Ritger-Peppas
1,82	0,9852	0,9633	0,9963
4,55	0,9920	0,9419	0,9959
9,09	0,9952	0,9387	0,9976

Tabelul 7.8. Parametrii cinetici obținuți cu modelul Ritger-Peppas pentru matricile cu 15% AT și DGCH

% DGCH	k, min ⁻ⁿ	n	c _m , %
1,82	1,041	0,628	60,06
4,55	1,434	0,601	68,33
9,09	2,002	0,577	82,21

Cantitățile eliberate sunt în concordanță cu viscozitățile hidrogelurilor din care s-au obținut matricile, care scad la creșterea cantității de digluconat.

Coeficienții de corelare au, și în acest caz, cele mai mari valori dacă sunt calculați cu modelul Ritger-Peppas, așa cum se poate vedea din tabelul 7.7.

Valorile coeficienților de eliberare, calculați cu modelul Ritger-Peppas, sunt date în tabelul 7.8.

Cantitățile de acid tanic eliberate cresc cu mărirea concentrației digluconatului, legarea sa de compusul antibacterian fiind mai slabă decât de colagen, așa cum s-a mai specificat.

Bibliografie

11. H. C. Goo, Yu-S. Hwang, Y. R. Choi, H. N. Cho și H. Suh, Development of collagenase-resistant collagen and its interaction with adult human dermal fibroblasts, *Biomater.* 24, 5099-5113, **2003**.
12. J. M. Pachence, Collagen-based devices for soft tissue repair, *J. Biomed. Mater. Res. A* 33, 35-40, **1996**.
13. R. K. Panduranga, Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 623-645, **1995**.
25. K. M. Meek și J. B. Weiss, Differential fixation of poly(L-arginine) and poly(L-lysine) by tannic acid and its application to the fixation of collagen in electron microscopy, *Biochim. Biophys. Acta.*, 587, 112-120, **1979**.
26. W. D. Loomis, Removal of phenolic compounds during isolation of plant enzymes, *Methods Enzymol.*, 13, 535-563, **1969**.
27. B. Madhan, V. Subramanian, J. Raghava Rao, B. Unni Nair și T. Ramasami, Stabilization of collagen using plant polyphenols: Role of catechine, *Int. J. Biol. Macromol.*, 37, 47-53, **2005**.
28. B. Madhan, C. Muralidharan și R. Jayakumar, Study on the stabilisation of collagen with vegetable tannins in the presence of acrylic polymer, *Biomater.*, 23, 2841-2847, **2002**.
30. N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung și H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 27-46, **2000**.
32. Z. Ruszczak și W. Friess, Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 55, 1679-1698, **2003**.
33. D. G. Wallace și J. Rosenblatt, Collagen in drug delivery and tissue engineering, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 55, 1631-1649, **2003**.
34. M. Grassi și G. Grassi, Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems, *Current Drug Delivery*, 2, 97-116, **2005**.
35. S. Li, Y. Shen, W. Li, X. Hao, A common profile for polymer-based controlled releases and its logical interpretation to general release process, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 9, 238-244, 2006.
36. H. Teles, T. Vermonden, G. Eggink, W. E. Hennink, și F. A. de Wolf, Hydrogels of collagen-inspired telechelic triblock copolymers for the sustained release of proteins, *J. Controlled Release*, 147, 298-303, **2010**.
37. **L. Mincan, M. Micutz, M.V. Ghica, M.G. Albu, M. Leca, baiatul cu FT-IR și SEM?, Characterization of collagen matrices containing tannic acid and chlorhexidine digluconate and tannic acid delivery, revista, sent for publication.**
38. M. V. Ghica, M. G. Albu, L. Popa, M. Leca, **L. Brăzdaru**, C. Cotruț și V. Trandafir, Drug delivery systems based on collagen-tannic acid matrices, *Rev. Roumaine Chim.*, 54, 1103-1110, **2009**.

8. CONCLUZII GENERALE

Metodele rapide de caracterizare arată că puritatea collagenului din hidrogelul inițial este suficientă, iar spectrul UV-DC că este păstrată conformația nativă, deci poate fi utilizat la obținerea biomaterialelor.

Concentrația optimă de collagen în hidrogelul pentru prepararea biomaterialelor – hidrogeluri și matrici poroase – determinată din proprietăți reologice staționare, este 1,1%, atât consistența cât și stabilitatea sub acțiunea forțelor de forfecare fiind convenabile.

Caracterizarea hidrogelurilor

Obținerea de hidrogeluri de collagen care conțin compuși antimicrobieni acid tanic sau/și digluconat de clorhexidină, în vederea tratării rănilor uscate, cu caracteristicile:

- **conformație nativă a moleculelor de collagen;**
- **consistență suficientă pentru a putea fi aplicate și a rămâne pe rană;**
- **elasticitate suficientă pentru a putea fi întinse.**

1. Hidrogeluri cu AT. În spectrele FT-IR interacțiunile collagen-AT se manifestă prin modificarea benzii amidă II: mărirea concentrației AT produce reducerea intensității benzii de la 1528 cm⁻¹ și apariția unui umăr la 1545 cm⁻¹, atribuit reticulării. AT nu denaturează collagenul în concentrațiile utilizate.

Intensitățile minimelor, maximelor și valorile Rpn din **spectrele UV-DC** scad considerabil la mărirea concentrației AT, dar lungimile de undă sunt nemodificate, deci hidrogelurile cu AT nu conțin collagen denaturat. S-a demonstrat că valorile Rpn mari obținute pentru hidrogeluri sunt determinate de concentrația mare a collagenului și de opalescență și nu de denaturare. S-a stabilit criteriul de recunoaștere a structurii native a collagenului în soluții concentrate/hidrogeluri de collagen: **existența maximului și minimului la lungimile de undă specifice, indiferent de valorile intensităților, adică ale valorilor Rpn.**

Hidrogelurile devin mai viscoase și rămân **pseudoplastice** și **tixotrope**, proprietăți accentuate de concentrația AT. Cea mai consolidată structură are hidrogelul cu 10% AT.

Hidrogelurile sunt predominant **elastice**, caracteristică amplificată de AT. Modulii cresc liniar cu frecvența unghiulară și dreptele ce dau variațiile sunt paralele, confirmând reticularea cu AT. Cel cu 10% AT este cel mai elastic și cel mai viscos, deci cel mai reticulat. 15% AT depășește cantitatea necesară reticulării și afectează puțin collagenul.

2. Hidrogeluri cu DGCH. DGCH nu modifică numerele de undă ale benzilor **FT-IR** ale collagenului, concluzie susținută și de diferențele numerelor de undă ale benzilor amidă I și II, care sunt mai mici ca 100 cm^{-1} . Valorile $A_{\text{III}}/A_{1450} > 1$, deci nu există collagen denaturat. Rapoartele $A_{\text{I}}/A_{\text{A}}$ sunt micșorate puțin, deci reticularea prin legături de hidrogen este redusă slab datorită interacțiunilor ionice a grupelor carboxil cu dicationii clorhexidinei.

UV-DC. DGCH reduce maximele și mai puțin minimele, nu denaturează collagenul dar produce o ușoară separare de faze, mai redusă în mediu acid, din cauza numărului mult mai mic de grupe carboxil disociate la pH 3,8. Collagenul nu este denaturat.

Hidrogelurile au comportare **pseudoplastică cu viteze limită** de curgere. Viscositățile dinamice scad cu creșterea cantității de DGCH, indicii de consistență sunt reduși ușor în fiecare serie, iar cei de curgere sunt măriți puțin.

Contribuțiile **elastică** și **viscoasă** depind de concentrația DGCH și pH: în mediu acid ambii moduli scad ușor la introducerea DGCH și predomină componenta elastică; în mediu slab bazic valorile sunt mai mari pentru ambii moduli.

3. Hidrogeluri cu AT și DGCH. Interacțiunea AT-DGCH se evidențiază în **spectrele FT-IR** în mediu acid la concentrația maximă de DGCH: banda amidă II se scindează, apărând o bandă nouă la 1541 cm^{-1} . Mai apare și un umăr pe banda de oscilație a grupei metilen. Intensitățile ambelor se măresc la creșterea concentrației AT. Valorile $A_{\text{III}}/A_{1450} > 1$ și diferențele dintre numerele de undă ale benzilor amidă I și II $< 100\text{ cm}^{-1}$, deci nu conțin collagen denaturat.

Spectre UV-DC se aseamănă foarte mult cu ale hidrogelurilor cu AT. Maximele și minimele sunt cu atât mai aplatizate cu cât concentrația DGCH este mai mare, dar pozițiile și punctele de elipticitate zero se deplasează foarte puțin. Valoare Rpn minimă – 0,11 – s-a obținut pentru hidrogelul cu cantități maxime din cele două componente. Collagenul nu este denaturat.

Reologia staționară sugerează formarea de asociații AT-DGCH, mai ales la concentrații mari ale ambelor antiseptice. Viscositatea hidrogelului cu 15% AT este mai mică decât a celui cu 10%, probabil din cauza asociațiilor AT-DGCH care au viscozitate mică și se interpun între fibrile. Collagenul reticulat cu dicationi CH conduce la hidrogel cu viscozitate mai mică decât cel reticulat cu AT, ceea ce creează aspectul de neomogenitate a hidrogelurilor.

Reologia dinamică arată că hidrogelurile sunt predominant elastice. Componentele elastice cresc mai mult decât cele viscoase cu mărirea cantității de AT. Hidrogelul cu cantitățile maxime de AT și DGCH este cel mai elastic, iar cel cu 9,09% DGCH și 5% AT cel mai viscos.

Caracterizarea matricilor

Obținerea de matrici poroase de collagen ce conțin acid tanic sau/și digluconat de clorhexidină, în vederea tratării rănilor umede, cu caracteristicile:

- **conformație nativă a moleculelor de collagen;**
- **dimensiuni ale porilor care să permită creșterea și migrarea celulelor epiteliale;**
- **capacitate bună de absorbție a fluidelor biologice;**
- **rezistență suficientă la degradare.**

1. Matrici cu AT. **Spectrele FT-IR** prezintă, la introducerea AT, deplasări ușoare ale benzilor amidă A și II spre valori mai mici ale numerelor de undă, creșterea intensității benzii de la cca 1200 cm^{-1} din banda complexă amidă III și scăderea intensității benzii amidă I, modificări asociate reticulării collagenului cu AT prin legături de hidrogen. Diferențele numerelor de undă ale benzilor amidă I și II cresc la mărirea concentrației AT, dar rămân mai mici ca 100 cm^{-1} , deci AT nu denaturează collagenul în concentrațiile utilizate.

SEM. Morfologia lamelară caracteristică matricilor de collagen dispare, porii sunt inelari și relativ alungiți, cu dimensiuni variind în limite largi, adecvate pentru creșterea și migrarea celulelor. Dimensiunile se măresc la creșterea concentrației AT și conțin zone compacte de collagen, ca rezultat al reticulării cu AT.

Cantitățile de apă absorbite scad cu creșterea procentului de AT, de la 90 g/g pentru matricea ce conține 5% AT la 65 g/g pentru cea cu 15% în 24 h, cu valori foarte apropiate pentru 10 și 15% AT, sugerând grade de reticulare apropiate pentru ultimele două matrici. Deci 10% AT este suficient pentru reticularea collagenului.

Digestia cu collagenază din *Clostridium histolyticum* în condiții fiziologice arată că matricile devin mai rezistente pe măsură ce se mărește concentrația AT; cele cu 10 și 15% AT rămân întregi și la 9 zile.

2. Matrici cu DGCH. DGCH nu modifică lungimile de undă ale benzilor **FT-IR** ale collagenului. Rapoartele $A_{III}/A_{1450} > 1$ și diferențele numerelor de undă ale benzilor amidă I și II $< 100 \text{ cm}^{-1}$ arată că matricile nu conțin collagen denaturat. Rapoartele A_I/A_A sugerează că DGCH reduce puțin reticularea prin legături de hidrogen, datorită reticulării cu dicationi clorhexidină.

SEM. La 1,82% DGCH se păstrează morfologia lamelară pentru matricile obținute din hidrogel acid, în timp ce pentru celelalte concentrații nu se mai păstrează. Cele preparate din hidrogel slab bazic au porii și aglomeratele de fibrile mai mari, interacțiunile collagen-DGCH fiind mai puternice. Dimensiunile porilor permit dezvoltarea și migrarea celulelor.

3. Matrici cu AT și DGCH. Spectrele FT-IR arată că interacțiunile collagen-AT sunt mai puternice decât collagen-DGCH. Diferențele numerelor de undă ale benzilor amidă I și II sunt mai mici ca 100 cm^{-1} , deci nu conțin collagen nendenaturat și pot servi ca pansamente pentru răni.

SEM. În prezența ambelor componente porii sunt mai mici decât în matricile ce conțin substanțele individuale, mai alungiți și mai neregulați; matricile conțin aglomerate, a căror dimensiuni cresc cu concentrația componentelor. Deci atât AT, cât și DGCH reticulează collagenul, iar rețelele tridimensionale rezultate prin reticulare cu DGCH sunt ceva mai dense. Porii permit dezvoltarea și migrarea celulelor.

Cantitatea de **apă absorbită** se reduce la mărirea concentrației AT, dar și DGCH are un slab efect de micșorare, deci reticulează collagenul. Capacitatea de absorbție rămâne suficientă.

Digestia matricilor arată că prezența celor două substanțe antimicrobiene mărește spectaculos rezistența la digestie cu collagenază, ceea ce înseamnă că ambele componente reticulază collagenul. Singurele matrici care nu rezistă 9 zile sunt cele ce conțin cantitățile cele mai mici de AT – 5% și de DGCH – 1,82%, care în ultima zi prezintă 2-3 fragmentate. Deci și DGCH produce reticularea collagenului, măbind astfel rezistența la digestie.

Eliberarea acidului tanic din matrici

S-a determinat cu un dispozitiv USP modificat (sandwich).

Matrici cu AT. Cantitățile cumulative de AT eliberat cresc liniar cu timpul în primele 4 h, apoi panta se micșorează treptat, tinzând spre platou. Eliberarea este descrisă de modelul Ritger-Peppas, ceea ce arată că, pe lângă difuzie, la eliberare contribuie și alte fenomene, cel mai important și probabil fiind îmbibarea. Cea mai mare cantitate de AT este cedată de matricea cu 10% AT și cea mai mică de cea cu 5%.

Matrici cu AT și DGCH. Porțiunile liniare dispar din curbele de eliberare a AT, acestea fiind exponențiale pe întregul interval de timp în care s-au făcut măsurători (11 h). Cinetica eliberării este descrisă tot de modelul Ritger-Peppas, deci la eliberare contribuie aceleași fenomene ca în cazul în care conțin AT. Cea mai mare cantitate de AT este eliberată de matricea care conține 10% AT și 9,09% DGCH.