



PROIECT DE DIPLOMĂ

**HIDROGELURI PE BAZĂ DE GELATINĂ-POLIVINILPIROLIDONĂ-
DOXICICLINĂ UTILIZATE PENTRU TRATAREA RĂNILOR INFECTATE**

Coordonatori științifici:

Conf. Dr. Ing. Iuliana Elena BÎRU
Dr. Ing. Maria Minodora MARIN

Student:

Dan-Robert DĂSCĂLINA



**Universitatea Națională de Știință și Tehnologie
Politehnica București
Facultatea de Inginerie Medicală**



Proiect de diplomă

**HIDROGELURI PE BAZĂ DE GELATINĂ-POLIVINILPIROLIDONĂ-
DOXICICLINĂ UTILIZATE PENTRU TRATAREA RĂNILOR
INFECTATE**

prezentat la

**Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București
Facultate de Inginerie Medicală
Departamentul de Bioinginerie și Biotehnologie**

pentru obținerea titlului de

inginer

Specializarea: Biomateriale și dispozitive medicale

de către

Dan-Robert DĂSCĂLINA

(absolvent Politehnica București)

sub îndrumarea

Conf. Dr. Ing. Iuliana Elena BÎRU

Dr. Ing. Maria Minodora MARIN



CUPRINS

CUPRINS.....	3
MEMORIU JUSTIFICATIV.....	4
I. STUDIU DOCUMENTAR	6
I.1. INTRODUCERE	6
I.1.1. Noțiuni generale	6
I.1.2. Clasificare biomateriale	9
I.2. BIOMATERIALE UTILIZATE PENTRU TRATAREA RĂNILOR INFECTATE.....	13
I.3. POLIMERI NATURALI UTILIZAȚI PENTRU OBTINEREA BIOMATERIALELOR CU APLICAȚII IN TRATAREA RĂNILOR INFECTATE.....	18
I.3.1. Gelatina.....	18
I.3.1.1. Metode de obținere/extracție a gelatinei	18
I.3.1.2. Aplicații și proprietăți ale gelatinei	23
I.3.2. Polivinilpirolidona	25
I.3.2.1. Metode de obținere/extracție polivinilpirolidonă.....	25
I.3.2.2. Aplicații și proprietăți polivinilpirolidonă	27
I.4. MEDICAMENTE UTILIZATE ÎN TRATAREA RĂNILOR INFECTATE	29
II. STUDIU EXPERIMENTAL	31
II.1. SCOPUL LUCRĂRII	31
II.2. OBTINERE ȘI CARACTERIZARE HIDROGELURI PE BAZĂ DE GELATINĂ-POLIVINILPIROLIDONĂ-DOXICICLINĂ.....	32
II.2.1. Obținere hidrogeluri	32
II.2.1.1. Materiale.....	32
II.2.1.2. Sinteză hidrogeluri	33
II.2.2. Caracterizarea hidrogelurilor.....	37
II.2.2.1. Spectroscopie în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR)	37
II.2.2.2. MicroCT	45
II.2.2.3. Teste gonflare	51
II.2.2.4. Teste de stabilitate	54
II.2.2.5. Teste antimicrobiene	55
II.2.2.6. Testări celulare.....	58
III. ANALIZĂ TEHNICO-ECONOMICĂ.....	61
CONCLUZII.....	63
BIBLIOGRAFIE.....	64

MEMORIU JUSTIFICATIV

În proporție de 30-50% din populația mondială a suferit o formă de infecție într-un anumit moment al vieții. Un tip de infecție des întâlnit este infecția cutanată, cauzată de rănilor infectate (10%).

Rănilor infectate sunt leziuni ale pielii sau ale țesuturilor de dedesubtul pielii care au intrat în contact cu bacterii, fungi sau virusuri care încep să se dezvolte în zona rănilor. Aceste infecții împiedică procesul de vindecare și pot duce la complicații dacă nu sunt tratate corespunzător.

Patogenii pot intra în contact direct cu pielea, prin expunerea rănilor la aer sau apă care conține microorganisme sau prin intervenții chirurgicale sau accidente care permit pătrunderea bacteriilor.

Hidrogelurile sunt folosite pentru a elibera controlat substanțele active, cum ar fi medicamentele sau agenții terapeutici. Utilizarea acestor hidrogeluri permite o gestionare eficientă a eliberării medicamentelor sau a altor agenți direct în zona afectată. Eliberarea substanței active poate fi treptată, ceea ce înseamnă că se va asigura un nivel constant de medicament în zona afectată pe o perioadă de timp stabilită. Mai mult, polimerii din hidrogeluri protejează substanțele active de degradarea în zonele nedorite. De exemplu, antibioticele sau alte substanțe terapeutice sensibile la pH, enzime, oxidare sau temperatură. Alte două proprietăți importante ale polimerilor sunt biocompatibilitatea și biodegradabilitatea, minimizând riscurile. Un ultim avantaj îl reprezintă flexibilitatea matricelor. Acestea pot fi adaptate în funcție de aplicație.

Gelatina și polivinilpirolidona (PVP) sunt polimeri des folosiți pentru obținerea hidrogelurilor polimerice datorită proprietăților acestora. Gelatina prezintă biocompatibilitate, biodegradabilitate și proprietăți de hidratare. Gelatina este derivată din collagen și este biocompatibilă, ceea ce înseamnă că nu va provoca reacții adverse sau respingeri în organism. Acesta este cel mai important aspect al unui polimer ce intră în contact cu organismul. Caracterul biodegradabil va reduce riscul de acumulare a materialului folosit în corp, iar capacitatea de reținere a apei poate ajuta la menținerea unui mediu umed favorabil vindecării rănilor și prevenția uscării acesteia. PVP-ul este un polimer solubil în apă care permite matricei să se dizolve treptat în mediu umed. Acesta poate forma un film subțire și flexibil pe suprafața rănilor, care ajută la protejarea împotriva contaminării externe și reduce riscul de noi infecții. Astfel, combinația acestora asigură eliberarea de medicament, conferind și proprietăți antimicrobiene.



Alegerea compoziției hidrogelurilor formată din **gelatină**, **polivinilpirolidonă** și **doxiciclină** este susținută de fundamentarea științifică și tehnică, precum și de analiza costurilor. Această combinație oferă un mediu propice pentru regenerarea eficientă a țesutului, având potențialul de a revoluționa tratamentul afecțiunilor rănilor infectate.

În urma acestor argumente, au fost sintetizate și caracterizate hidrogeluri polimerice încapsulate cu doxiciclină cu potențial în tratarea rănilor infectate.

I. STUDIU DOCUMENTAR

I.1. INTRODUCERE

I.1.1. Noțiuni generale

Noi abordări în tratarea plăgilor apar datorită dificultăților de vindecare și severității unor leziuni. Filmele subțiri, materialele spongioase, scaffold-urile sau hidrogelurile sunt materiale folosite în tratarea acestor inconveniențe întâlnite. La mărire vitezei de vindecare a rănilor și formarea unui țesut nou cu proprietăți superioare contribuie combinația dintre biocompatibilitate și capacitatea de a stimula proliferarea [1].

O rană reprezintă o întrerupere a funcției de protecție a pielii. Aceasta poate fi sau nu însoțită de pierderea țesutului conjunctiv. Rănile pot fi cauzate de factori fizici, chimici sau biologici. Când apare o rană, corpul declanșează un lanț de acțiuni pentru a repara țesutul lezat. Etapele reparării plăgii sunt hemostaza, inflamația, proliferarea, procesul fiind finalizat cu etapele de remodelare tisulară [1].

Din punct de vedere al timpului de vindecare există două tipuri de răni: acute și cronice. Astfel, rănilor acute vor restaura funcțiile și structura pielii în urma vindecării la un timp scurt, în timp ce în cazul rănilor cronice, țesutul este incomplet vindecat. În fiecare an, pacienții ce suferă de rănilor cronice crește. Datorită timpului îndelungat în care pacientul suferă de o boală cronică, riscul de amputare și de moarte crește exponențial. Astfel, este imperativ să se dezvolte tehnologii pentru vindecarea rănilor într-un timp cât mai scurt și cu o eficiență mare [1].

Peste 6,5 milioane de oameni în întreaga lume suferă de răni cronice, pentru acestea fiind alocate 25 de milioane de dolari americani pe an. Principalele cauze ale acestora sunt ulcerele, rănilor chirurgicale, tumorile sau traumatismele. Pentru a trata aceste răni este esențial să se înțeleagă structura și funcțiile pielii, dar și tipul de rană și diferențele dintre acestea. Pielea este compusă din derm, epiderm și țesut subcutanat. Legătura dintre derm și epiderm este realizată de către membrana bazală, iar stratul cornos din epiderm asigură funcția de barieră și previne pierderea de lichid. Dermul este predominant compus din collagen și elastină. Principalele elemente ale țesutului subcutanat sunt fibroblastele și adipocitele [2].

Epidermul, glandele sudoripare și glandele sebacee conțin celule stem ce promovează regenerarea pielii în condiții normale. Rețeaua de fibrină se va forma în timpul primului pas (hemostaza) care acționează ca o barieră ce separă mediul exterior de organism. Aceasta mai are rol în proliferarea fibroblastelor și promovarea migrării celulelor. Faza inflamatorie debutează prin pătrunderea neutrofilelor, limfocitelor și a monocitelor la nivel local. În această fază, spre dermul lezat vor migra keratinocitele. Țesutul de granulație va înlocui treptat rețeaua de fibrină. Finalizarea procesului de epitelizare este susținută de matricea nou formată. Mai mult, matricea nou formată va susține și maturizarea keratinocitelor [2].

Etapă de remodelare tisulară se va declanșa la 2 săptămâni de la inițierea rănii și poate dura până la un an. În această etapă, colagenul de tip III se transformă în colagen de tip I, acest proces fiind mediat de metaloproteinaze. Această transformare a colagenului are un rol important în procesul de reparare a rănii. În urma vindecării rănilor acute pot exista două rezultate. Unul dintre rezultate este regenerarea care constă în refacerea structurii țesutului epitelial. Cel de al doilea rezultat îl constituie repararea, în urma căreia se va forma țesut cicatricial [2].

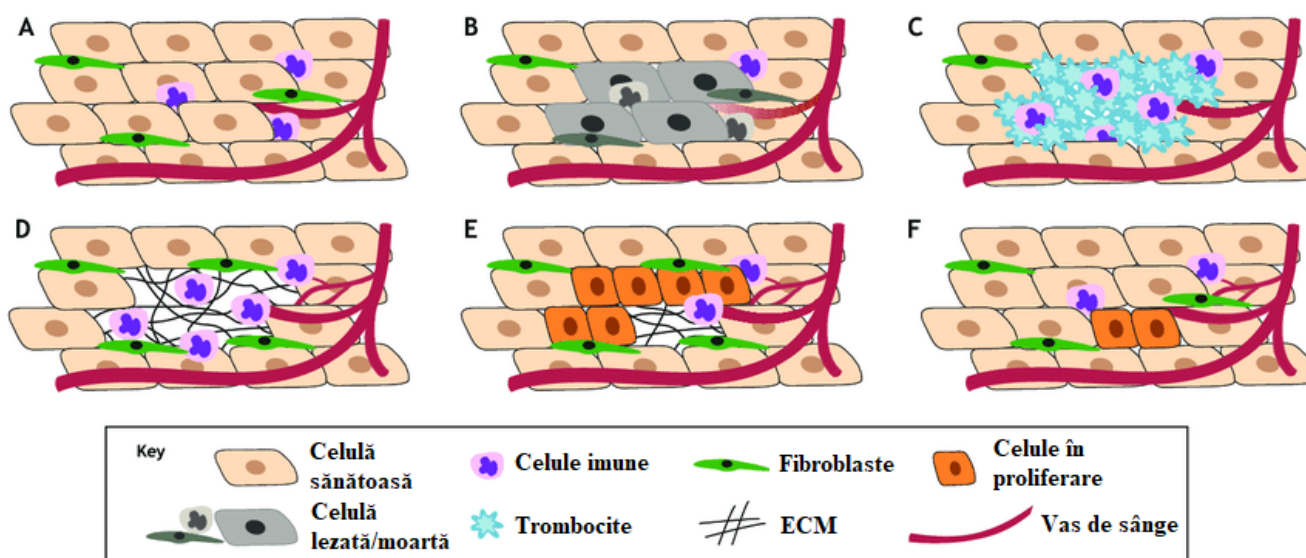


Figura I.1.1. Etapele regenerării țesutului epitelial [3]

În figura I.1.1. sunt reprezentate etapele regenerării țesutului epitelial. În figura A este ilustrat țesutul intact, fără leziuni. Figura B evidențiază celulele afectate sau moarte, reprezentate în nuanțe de gri. În figura C este prezentat procesul de reparare a plăgii, caracterizat prin acumularea de trombocite care contribuie la hemostază, precum și prezența celulelor imune implicate în răspunsul inflamator. Figura D surprinde etapa de depunere a matricei extracelulare, însoțită de inițierea formării vaselor de sânge noi. În figura E are loc resorbția matricei extracelulare și debutul proliferării celulare. În final, figura F arată regenerarea zonei afectate, cu un număr vizibil redus de celule [3].

Microorganismele sunt prezente în orice rană deschisă, însă acest lucru nu înseamnă că orice rană va fi infectată. Manifestările unei infecții sunt inflamațiile, edemul, eritemul sau durerea. La nivelul plăgilor se pot afla atât bacterii, cât și ciuperci, acestea prezentând posibilitatea de a interacționa cu alte bacterii, astfel realizând o rezistență la medicamente. Cele mai frecvent identificate bacterii în rănilor infectate sunt *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*, iar genul de ciupercă cel mai des întâlnit este *Candida* [4].

Infecția poate evolua fără să afecteze negativ vindecarea rănilor sau poate afecta acest proces în cazul formelor severe. Contaminarea, colonizarea, infecția locală, infecția extinsă și infecția sistemică sunt etapele progresive ale evoluției infecției [4].

Biofilmele sunt formate de către bacterii încă din stadiul infecției locale, conform *Institutului Internațional pentru Infecțiile Plăgilor*. Eficiența agenților antibacterieni este redusă datorită substanțelor polimerice extracelulare (EPS) care protejează bacteriile. Comunicarea interbacteriană este favorizată de către mediul biofilmului, conducând la adaptări ale bacteriilor. Datorită acestor factori, biofilmele sunt rezistente și favorizează cronicizarea plăgilor. Generează infecții invazive locale sau sistemice prin dispersia celulelor planctonice, a fragmentelor de biofilm sau a microcoloniiilor mature. Din cauza toleranței ridicate pe care o prezintă biofilmul, eficiența tratamentului este limitată, implicând prelungirea vitezei procesului de vindecare [5].

În 1894 apare pentru prima dată termenul de „**hidrogel**”. Materialul pentru care a fost folosită această denumire nu corespunde cu hidrogelurile din ziua de azi. Acel material era un gel coloidal obținut din săruri anorganice. Hidrogelurile sunt materiale polimerice care formează o rețea capabilă să absoarbă și să rețină apă, umflându-se fără a se dizolva pe termen scurt. Datorită afinității ridicate a hidrogelurilor față de solvent apare capacitatea de gonflare. Extinderea aplicării gelurilor a fost realizată datorită combinației dintre capacitatea de gonflare, versatilitatea ridicată și posibilitatea reglării caracteristicilor materialului. Aceste structuri polimerice stabilesc interacțiuni cu mediul înconjurător, adaptându-se la temperatură și compoziția lichidului, ceea ce le asigură o formă stabilă și o bună rezistență mecanică [6].

Structura și proprietățile gelului sunt în strânsă legătură cu modificarea structurii și funcționalitatea monomerilor sau a agenților de reticulare. Un alt factor care influențează structura și proprietățile îl reprezintă modificările concentrației [6].

Hidrogelurile care sunt capabile să interacționeze la stimuli externi, precum temperatura, pH-ul, concentrația ionică, lumina sau câmpurile magnetice și electrice poartă denumirea de hidrogeluri inteligente. Polimerii cu sensibilități multiple s-au dezvoltat prin combinarea mai multor mecanisme de răspuns, oferind o adaptabilitate mai mare. La stimuli externi, hidrogelurile pot suferi tranziții de

fază și modificări ale volumului. Aceste modificări conferă potențial atât pentru cercetarea științifică, cât și pentru aplicații tehnologice [6].

Principalul mod de clasificare al hidrogelurilor îl constituie natura substanțelor din care sunt realizate, astfel acestea pot fi de origine naturală sau sintetică. Principalii polimeri utilizați pentru sinteza hidrogelurilor naturale sunt: colagenul, fibrina, acidul hialuronic, chitosanul, și alginatul. Hidrogelurile naturale prezintă cea mai mare compatibilitate cu organismul pentru că imită structura, compoziția și funcțiile mediului biologic, fiind hidrofile, moi, permeabile și tolerabile imunologic. Datorită sursei biologice, compoziția lor poate prezenta variații semnificative de la un lot la altul. Acestea pot fi stabile chimic sau se pot degrada. Atunci când rețelele sunt menținute de către interacțiunile dintre lanțurile polimerice și/sau forțele secundare, hidrogelurile se pot numi „reversibile” [6].

I.1.2. Clasificare biomateriale

Biomaterialul este orice material folosit care are ca scop înlocuirea unui organ sau a funcției pe care o realizează organul. Acest biomaterial utilizat trebuie să își justifice prețul și să fie acceptat de organism. Acestea pot fi atât naturale, cât și artificiale și trebuie să funcționeze în contact cu organismul [7].

Aceste biomateriale pot fi clasificate în mai multe moduri. Primul mod de clasificare îl constituie nivelul la care acționează acestea. Ele pot acționa la nivelul sistemului sau la nivelul organelor. Un exemplu de sistem unde pot fi folosite este sistemul osos. Pentru acesta, materialele sunt utilizate sub formă de proteze articulare și plăci osoase. Un exemplu de organ la care poate acționa biomaterialul este inima. Valvele cardiace artificiale, protezele valvulare sau stimulatoarele cardiace sunt cele mai bune exemple de dispozitive utilizate la nivelul inimii [8].

Un alt factor după care putem clasifica biomaterialele îl reprezintă regiunile tratate. Acestea pot intra în contact cu o zonă a corpului, însă pot trata o altă regiune. Scopul terapeutic este alt factor după care putem clasifica biomaterialele. Astfel, proteza de șold este utilizată ca substituent morfo-funcțional, iar aparatul de dializă poate îndeplini funcția rinichiului, însă nu înlocuiește morfologia acestuia. Există și materiale ce ajută la vindecarea rănilor, însă nu pot îndeplini această funcție singure, cum ar fi șuruburile ortopedice și firele de sutură [8].

O altă modalitate de clasificare o constituie proprietățile fizice și chimice ale materialului utilizat. Acestea se împart în trei mari categorii. Acestea pot fi bioceramice, polimerice și metalice, iar selectarea acestora se va face în funcție de aplicația dorită. Materialele bioceramice sunt importante în realizarea implanturilor osoase, materialele polimerice în sisteme de eliberare controlată și cele metalice în implanturi ortopedice sau dentare. Acestea reprezintă cele mai



importante aplicații ale materialelor exemplificate. O altă aplicație la care sunt utilizate materialele polimerice sunt firele de sutură datorită biodegradabilității acestora. Acestea pot fi și bioresorbabile, principala diferență dintre bioresorbabilitate și biodegradabilitate fiind absorbția materialului de către organism. Acestea au scopul de a ajuta procesul de vindecare și ajută la prevenirea infecțiilor. Materialele metalice utilizate în implanturile dentare trebuie să fie inerte pentru a nu provoca inflamații [8].

Metalele sunt printre biomaterialele cele mai utilizate datorită conductivității lor ridicate termice și electrice. Acestea sunt utilizate frecvent în fabricarea stimulatoarelor cardiace, stenturilor vasculare și valvelor cardiace artificiale. În plus, datorită proprietăților lor mecanice superioare și rezistenței la coroziune, implanturile care suportă sarcini mecanice, cum ar fi protezele de șold și genunchi, sunt fabricate în mare parte din biomateriale metalice [8].

Aliajele sunt o altă alternativă utilizată în obținerea biomaterialelor. Acestea prezintă proprietăți superioare față de metalele din care sunt compuse. Acesta sunt frecvent supuse acoperirilor cu straturi ceramice bioactive sau pelicule polimerice subțiri pentru a oferi o mai bună integrare și biocompatibilitate. Acestea pot fi și prelucrate pentru a oferi o altă textură a suprafeței. Prin urmare, proprietățile mecanice și rezistența la coroziune a materialului sunt îmbunătățite [8].

În domeniul biomaterialelor metalice, există trei categorii principale: titanul pur (Ti) și aliajele sale (cum ar fi Ti-6Al-4V); oțelul inoxidabil; și aliajele de cobalt-crom (Co-Cr). Proprietățile sale superioare în comparație cu aliajele pe bază de cobalt-crom și oțel inoxidabil face ca aliajul de Ti-6Al-4V să fie cel mai utilizat biomaterial metalic în aplicații medicale. Are o rezistență mecanică ridicată, este mai ușor și prezintă o rezistență superioară la coroziune [8].

Atunci când este folosit în articulațiile osoase, are anumite limitări, deoarece aceste articulații sunt mai puțin elastice și sunt mai susceptibile la deteriorare. Includerea vanadiului în aliaj este o altă problemă, deoarece acesta are potențialul de a provoca reacții adverse la țesuturi și efecte citotoxice. Datorită contactului cu lichidele, ionii de vanadiu și aluminiu din aliaj au rol în apariția bolilor neurodegenerative pe termen lung, cum ar fi Alzheimer și Parkinson. Pe lângă bolile neurodegenerative, acești ioni pot avea un impact negativ asupra sistemelor respirator și reproductiv [8].

Anumite aliaje metalice au proprietăți de memorie a formei, ceea ce le face ușor de fabricat și de sterilizat. Cu toate acestea, utilizarea metalelor în corpul uman are unele dezavantaje, cum ar fi modulul lor elastic ridicat (care poate provoca stres excesiv asupra țesuturilor), capacitatea lor de a provoca citotoxicitate, vulnerabilitatea la coroziune în medii biologice și eliberarea de ioni metalici, care pot provoca reacții adverse în organism [8].

Polimerii sunt utilizați pentru a modifica arhitectura filmelor subțiri prin introducerea porozității în interiorul acestora. Structura, dimensiunea și morfologia filmelor sunt afectate de aceștia. Proprietățile de acoperire ale polietilenglicolului, sau PEG, permit formarea particulelor de dimensiuni mici. Acest polimer ajută și la prevenirea formării aglomeratelor. În plus, compoziția polimerilor influențează formarea porilor, ceea ce va duce la performanțe fotocatalitice îmbunătățite. Această structură crește suprafața specifică și stimulează transferul de electroni [9].

Hidrogelurile sunt biomateriale polimerice care sunt folosite pe scară largă pentru a trata o varietate de afecțiuni. Acestea pot fi create artificial sau pot veni din natura. Chitosanul, fibrina și alginatul sunt polimeri naturali utilizați pentru a produce hidrogel, în timp ce alcoolul polivinilic este un polimer sintetic. Hidrogelurile au fost folosite ca transportori pentru a transporta molecule biologice precum ARNm, ADN, proteine sau citokine în tratamente precum imunoterapia și chimioterapia cancerului datorită capacității lor de gelificare [8].

Materialele anorganice și cele pe bază de lipide pot fi utilizate pentru a produce dispozitive medicale [8]. Comportamentul celular poate fi afectat direct de biomaterialele anorganice. Acest lucru include interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice. Ionii eliberați de aceste materiale pe bază de minerale contribuie la definirea fenotipului celular și la controlul anumitor funcții ale țesuturilor. Capacitatea de a elibera ioni bioactivi poate fi folosită pentru a provoca schimbări fenotipice celulare sau pentru a modifica micromediul imun pentru a promova regenerarea tisulară. Încorporarea de micro- și nanoparticule anorganice în rețele polimerice poate modifica caracteristicile biofizice ale acestor biomateriale, cum ar fi topografia, sarcina electrică, dimensiunea, interacțiunile electrostatice și rigiditatea [10].

Datorită potențialului lor remarcabil ca sisteme purtătoare în terapii medicamentoase, lipozomii au fost utilizați cu succes în studiile clinice. Între numeroasele avantaje ale sistemelor de livrare pe bază de lipide se numără îmbunătățirea profilului farmacocinetic și farmacodinamic al substanțelor active, asigurarea unei eliberări controlate a medicamentelor și reducerea toxicității asociate. Modificările la nivelul suprafeței lipozomilor au crescut circulația sistemică, acumularea în țesuturile țintă și livrarea substanțelor terapeutice specifice [11].

Sursa de origine este ultima clasificare a biomaterialelor. Astfel, pot fi hibride, sintetice sau naturale. Colagenul este proteina cea mai abundentă din țesuturile conjunctive ale animalelor. Până în prezent, au fost identificate cel puțin șaisprezece tipuri diferite de colagen. Tipurile I, II și III reprezintă aproximativ 80 până la 90% din toate tipurile. Deși fibroblastele produc cel mai mult colagen, celulele epiteliale pot secreta și ele colagen [12].

Gelatina are multiple utilizări medicale, fiind folosită ca adeziv în intervenții chirurgicale, material pentru pansamente și tampon absorbant. Spre deosebire de collagen, gelatina poate avea potențial antigenic. Aceasta posedă capacitatea de a stimula macrofagele și de a avea un efect hemostatic. Principalul avantaj al utilizării gelatinei este costul scăzut de obținere [12].

Datorită proprietăților sale mecanice excepționale, mătasea produsă de *Bombyx mori* a fost folosită ca material de sutură de secole. Probleme anterioare cu biocompatibilitatea au fost atribuite contaminării cu sericină, mai degrabă decât fibroinei în sine. Sericina poate provoca reacții alergice sau inflamații dacă nu este purificată bine. Studiile arată că fibroina de mătase are biocompatibilitate comparabilă cu collagenul și PLA, ceea ce o face o potențială candidată pentru schele în ingineria tisulară. Abilitatea sa de a fi modificată genetic și versatilitatea chimică o fac ideală pentru utilizare în viitor [13].

Celuloza, un polimer natural abundent, este găsită în plante și are o varietate de utilizări, inclusiv în domeniul biomedical. Celuloza bacteriană (BC), care este produsă de bacterii, are caracteristici remarcabile, cum ar fi retenția apei, rezistența mecanică și o structură nanofibroasă tridimensională. Aceste caracteristici o fac un biomaterial atractiv. Cu toate acestea, izolarea celulozei vegetale și producția lentă a BC împiedică utilizarea sa la scară largă în scopuri medicale [14].

Polimerii sintetici, metalele și ceramicele sintetice sunt biomaterialele sintetice care sunt utilizate. Datorită temperaturii sale scăzute de topire și a excelentelor sale proprietăți vâscoelastice, PCL este unul dintre polimerii sintetici care se distinge prin ușurința de prelucrare și modelare a diferitelor forme și dimensiuni [15]. Un alt polimer sintetic utilizat este PLA. Acesta este utilizat în fabricarea dispozitivelor de fixare în intervenții chirurgicale. Astfel sunt obținute șuruburi, știfturi, șaibe și capse. O altă utilizare a acestui polimer o constituie repararea meniscului [16]. Doua aliaje care pot fi utilizate sunt Ti-6Al-4V și Co-Cr [8]. Cele mai întâlnite ceramici utilizate sunt zircona, alumina și compozitele acestora [17].

I.2. BIOMATERIALE UTILIZATE PENTRU TRATAREA RĂNILOR INFECTATE

Pentru tratarea rănilor infectate sunt folosite diverse biomateriale, selectate în funcție de natura infecției și de tipul plăgii. Astfel, pentru tratarea rănilor infectate se pot folosi filme, hidrogeluri, nanofibre electrofilate, bureți, materiale spongioase sau scaffold-uri printate 3D [18].

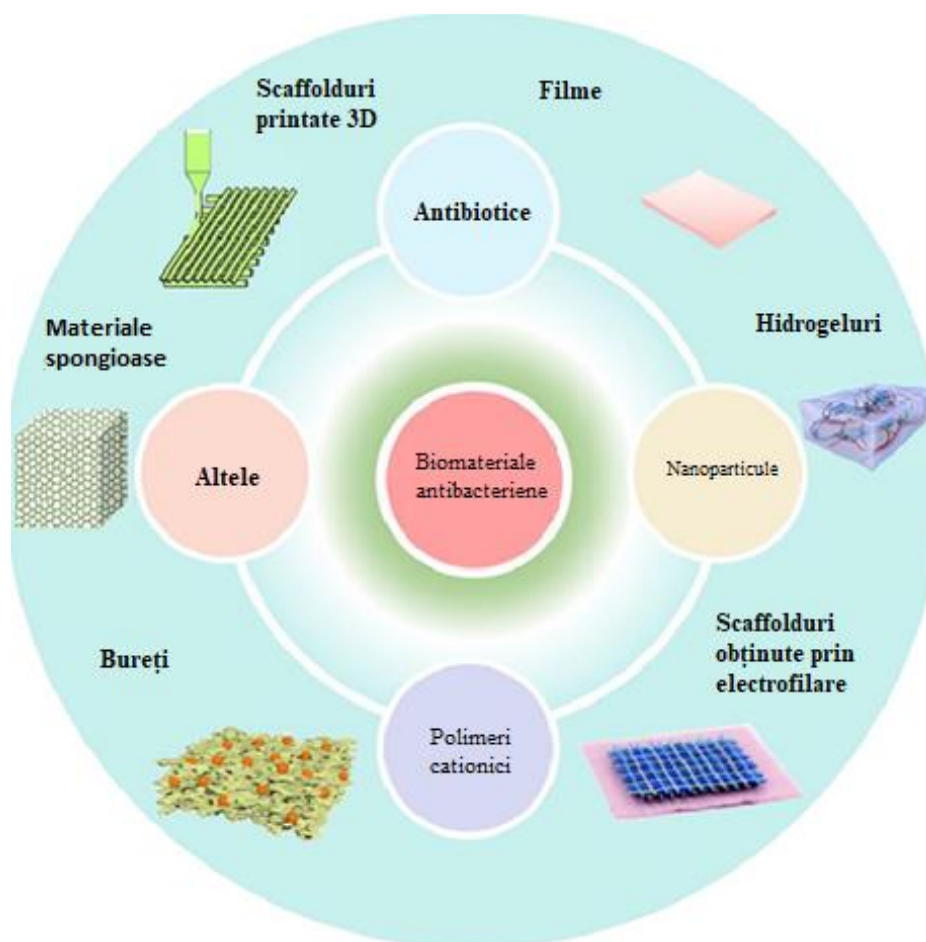


Figura I.2.1. Tipuri de biomateriale [18]

Filmele sunt polimeri subțiri, flexibili, frecvent utilizați ca pansamente semipermeabile datorită capacității de a proteja rana de factorii externi. Ele vor permite trecerea oxigenului și a vaporilor de apă, dar blochează pătrunderea bacteriilor. Un avantaj al acestor biomateriale îl reprezintă capacitatea de a fi suport pentru agenți activi, precum sunt antibioticele și nanoparticulele. Acestea vor fi ușor de sterilizat și devin maleabile prin hidratare, păstrându-și rezistența mecanică. Au fost realizate filme pe bază de poliuretan din PCL, PEG și AT, fiind încărcate cu vancomicină. Acestea au dus la o vindecare accelerată datorită capacității de eliberare controlată [18].

Un alt material folosit la obținerea filmelor îl reprezintă chitosanul (CS). Acesta prezintă proprietăți antibacteriene și mai este utilizat frecvent în realizarea pansamentelor. Curcumina prezintă efecte antioxidante și antiinflamatoare, jucând un important în refacerea și regenerarea țesuturilor cutanate [18].

Hidrogelurile prezintă structură tridimensională poroasă, obținută prin reticulare. Acestea prezintă capacitatea de a absorbi exsudatul, menține umiditatea și permite difuzia oxigenului. Structura acestora permite încorporarea substanțelor active. Acestea prezintă și dezavantaje, cum ar fi creșterea riscului de infecții. Pentru a contracara acest efect s-au folosit agenți antimicrobieni. Hidrogelurile nanocompozite care conțin nanoparticule de Ag sau ZnO mențin o activitate antimicrobiană pe termen lung. Alt exemplu de hidrogel este hidrogelul compozit cu structură metal-organică încorporat într-o membrană hidrogel PVA. Acest pansament rezistent la toate tipurile de lichide, deși derivat din polimeri hidrofilii prezintă proprietăți de prevenire a depunerilor biologice și activitate bactericidă și antiinflamatoare, datorită eliberării de ioni Zn^{2+} . Datorită activității fotocatalitice a nanomaterialelor pot fi generate specii active de oxigen, eficiente împotriva bacteriilor [18].

Un alt tip de hidrogel este hidrogelul antibacterian injectabil și resorbabil. Acesta are rol în fototerapie, strategie minim invazivă, care poate distruge patogenii prin reacții fotochimice. Acestea s-au bazat pe bazat pe copolimer de poli(glicerol sebacat)-co-poli(etilen glicol)-catecol (PEGSD) și gelatină modificată (GTU) cu UPy-hexametilendiizocianat (HDI). Hidrogelul poate servi și ca suport pentru livrarea fotosensibilizatorilor (PS). Un astfel de hidrogel a fost compus din sinoporfirină sodică (PS) și nanosfere PLGA cu factori de creștere. S-au și dezvoltat hidrogeluri cu activitate antibacteriană intrinsecă, dar cu efecte secundare minime. Astfel de hidrogeluri au fost realizate din PVA, un copolimer de 1-vinil-3-butilimidazoliu bromură și acrilamidă. Proprietățile antibacteriene sunt date de sarcina pozitivă prezentă [18].

Fibrele cu diametru nono- și micrometric pot fi obținute prin electrofilare, prin aplicarea unor tensiuni ce depășesc tensiunea superficială a soluției polimerice. Prin modificarea parametrilor se pot regla proprietățile, permițând obținerea materialelor cu suprafață specifică mare, raport mare lungime-diametru și porozitate crescută. Aceste caracteristici favorizează absorbția exsudatului și permeabilitatea pentru apă și oxigen. Structura poroasă fină împiedică pătrunderea microorganismelor patogene. Un exemplu îl reprezintă nanofibrele din policaprolactonă (PCL) și fibroină de mătase modificată care prezintă efect antibacterian împotriva *E. coli* și *S. aureus*, stimulând proliferarea celulelor epiteliale și procesul de revascularizare. Nanofibrele din PCL și

chitosan combinat cu polianilină reduc inflamația. Prin metoda de electrofilare, nanofibrele pot fi încărcate cu ușurință cu antibiotic [18].

Nanofibrele din PCL și gumă Tragacanta încărcate cu curcumină s-au dovedit utile în tratarea rănilor șobolanilor bolnavi de diabet datorită proprietăților antiinflamatoare, antioxidante și antibacteriene ale curcuminei. Fibrele de PCL/gelatină ce conțin Albastru Egiptean și chelați de quercetină-cupru stimulează regenerarea foliculilor piloși și vindecarea tegumentelor. Nanofibrele de alginat reticulat cu stronțiu și dopat cu ZnO au prezentat proprietăți mecanice bune, aderență celulară similară collagenului comercial și rezistență la contaminare microbiană [18].

Pansamentele spongioase utilizate în tratamentul rănilor prezintă o structură poroasă interconectată care le conferă capacitate de izolare termică și o abilitate de absorbție a exsudatului remarcabilă. Dimensiunea porilor și gradul de interconectivitate pot fi ajustate prin modificarea concentrației, tipului și gradului de reticulare al polimerilor. Datorită caracterului lor hidrofil și capacității de a interacționa cu celulele, pansamentele spongioase sunt utilizate frecvent ca agenți hemostatici și în tratamentul arsurilor. Rezistența mecanică redusă, activitatea antibacteriană insuficientă și riscul de macerație a plăgii limitează aplicabilitatea lor. Aceste pansamente nu sunt recomandate pentru arsuri severe. Majoritatea acestor sisteme au fost pe bază de chitosan și obținute prin tehnica de liofilizare. Pentru a îmbunătăți proprietatea antimicrobiană au fost adăugați agenți bactericizi precum antibioticele, nanoparticulele de Ag și derivații acestora, nanoclusteri de Au/Ag activați prin terapie fotodinamică, nanoparticule de ZnO, polimeri cationici și alți compuși [18].

Un exemplu de pansament utilizat este cel din chitosan reticulat cu polidopamină (PDA), prezentând activitate antioxidantă și eficiență hemostatică ridicată, destinat hemoragiilor letale necompresibile sau asociate coagulopatiilor. Un pansament din chitosan ce conține nanoparticule de ZnO/N-halamine, obținut prin liofilizare în vid, a reușit să inactiveze 99,93% din *S. Aureus* și 88,01% din *E. Coli*. Pansamentele pe bază de gelatină prezintă capacitatea de a reține umiditatea, pot absorbi exsudatul și favorizează aderența și proliferarea celulară în procesul de vindecare. Un pansament de gelatină reticulat cu polidopamină ce prezintă structură microporoasă interconectată permite încărcarea antibioticelor prin rehidratare, ceea ce conferă activitate antibacteriană. Pansamentele de poli(L-leucină)/PEG/poli(L-leucină) în care a fost încorporată sulfadiazină de argint asigură o activitate antibacteriană eficientă ce promovează vindecarea arsurilor [18].

Nanocompozitele poroase pot fi utilizate la realizarea pansamentelor destinate tratării ulcerelor diabetice infectate cu bacterii rezistente la antibiotice. Aceste biomateriale, în general, au în componență chitosan-acid hialuronic și nanoparticule de Ag. Concentrația de Ag trebuie ajustată astfel încât acesta să nu fie toxic. Acestea acționează împotriva bacteriilor *Escherichia coli* și

Staphylococcus aureus [19]. Pansamentele obținute prin amestecarea poliacrilatului de Na (PAAS), sărurilor de amoniu cuaternare conjugate cu chitosan (QAS-CS) și colagenului (COL) prezintă porozitate ridicată, un modul de compresie moderat, rezistență la tracțiune și capacitate mare de umflare. Aceste biomateriale poartă denumirea de pansamente PQC și au o capacitate de hemostază superioară față de cele pe bază de chitosan. De asemenea, prezintă o activitate antibacteriană mai bună, stimulează proliferarea celulară, grăbește regenerarea rănilor infectate și îmbunătățește angiogeneza [20].

Pansamente pe bază de collagen încărcate cu gentamicină sunt folosite pentru eliberarea controlată a substanței active. Matricea polimerică este biodegradabilă, degradarea acesteia poate dura de la câteva zile la câteva săptămâni. Aceste pansamente au dus la o reducere cu 70% a infecțiilor de la nivelul plăgii chirurgicale, comparativ cu cele cărora nu li s-au aplicat pansamentele [21].

Staphylococcus aureus rezistent la metilicină reprezintă o provocare pentru vindecarea rănilor. Pentru combaterea acestei probleme a fost dezvoltat un material din chitosan, pululan și acid citric în care a fost încorporat un sistem pe bază de zinc (ZnMOF). Acesta prezintă capacitatea de a stimula contracția plăgii, de a accelera depunerea de collagen, de a inhiba factorii inflamatori și de a promova angiogeneza. Datorită acestor proprietăți, aceste materiale reprezintă o soluție pentru a accelera vindecarea rănilor infectate [22].

Un alt tip de biomaterial utilizat în tratarea rănilor infectate îl reprezintă materialele spongioase. Acestea sunt protectoare, absorbante, izolatoare termic și capabile să se muleze pe piele [18]. Pansamentele din săruri de calciu și sodiu ale acidului alginic sunt disponibile sub formă spongioasă, iar în contact cu pielea formează geluri. Mecanismul acesta este activat datorită fenomenului de schimb ionic între alginat și exsudat sau sânge. Stratul obținut sub formă de spongioasă asigură condiții optime de umiditate și temperatură pentru regenerare. Pentru administrarea curcuminei, alginatul a fost utilizat ca matrice pentru eliberare controlată sub formă de matrice spongioasă topică, activată de lumină. Aceste materiale sterile permit o administrare eficientă a substanței, minimizând reacțiile adverse precum durerea sau iritațiile locale la nivelul pacientului [23].

Pansamentele spongioase sunt realizate în special din poliuretan sau materiale pe bază de silicon sunt semipermeabile și pot fi hidrofile sau hidrofobe. Pentru stimularea vindecării, în aceste materiale sunt încorporate antibiotice, nanoparticule de Ag, oxidul de Zn, polimerii cationici, extracte din plante, bio-sticlă și molecule bioactive. Argintul și hidroxiapatita au fost adăugate în spuma de poliuretan. Acestea au susținut reepitelizarea și depunerea de collagen în zona rănilor. Nanoparticule



de Ag și factori de creștere au fost adăugați pentru o activitate eficientă împotriva *E. coli* și *S. aureus* [18].

Tehnologia de imprimare 3D a adus o schimbare majoră în ingineria tisulară, făcând posibilă crearea unor structuri complexe, cu funcții biologice, prin depunerea stratificată și controlată a celulelor și a materialelor bioactive [18]. Aceste scaffold-uri trebuie să fie biocompatibile și să prezinte porozitate adecvată [24]. Scaffold-urile biocompatibile trebuie să permită încorporarea eficientă a substanțelor bioactive sau a celulelor vii. Un polimer modificat chimic utilizat pentru obținerea plasturilor este gelatina metacrilată (GelMA). În aceste materiale au fost încorporate microparticule tetrapodale de oxid de zinc (t-ZnO) încărcate cu VEGF (factor de creștere endotelială vasculară). Particulele t-ZnO au fost tratate cu peroxid de hidrogen pentru a induce defecte și a reduce banda energetică în domeniul luminii verzi. Aceste defecte generează goluri de oxigen, care induc o polaritate variabilă, facilitând interacțiunea fizică puternică dintre t-ZnO și VEGF. Sub acțiunea luminii ultraviolete sau vizibile, eliberarea VEGF este controlată prin formarea de electroni și goluri, ceea ce conferă scaffold-ului proprietăți antibacteriene și angiogenice superioare [18].

I.3. POLIMERI NATURALI UTILIZAȚI PENTRU OBTINEREA BIOMATERIALELOR CU APLICAȚII ÎN TRATAREA RĂNILOR INFECTATE

I.3.1. Gelatina

I.3.1.1. Metode de obținere/extracție a gelatinei

Gelatina este o substanță proteică obținută prin denaturarea colagenului. Aceasta se prepară prin procese ce implică hidroliza parțială a colagenului extras din piele, oase și țesut conjunctiv alb. În urma acestui proces, structurile: secundară și terțiară a colagenului sunt distruse. Gelatina rezultată este o polipeptidă cu masa moleculară mare și reprezintă un hidrocoloid important. Spre deosebire de majoritatea hidrocoloizilor, care sunt polizaharide, gelatina este o proteină digerabilă, ce conține toți aminoacizii esențiali, cu excepția triptofanului. Principala sursă din care este extrasă gelatina comercială sunt pielea și oasele bovine. Colagenul provenit din mamifere din care este extrasă gelatina este componentul principal al țesuturilor conjunctive și oaselor animalelor vertebrale [25].

Studiul a două tipuri de gelatină de origine animală — de bovine (tip B) și de porcine (tip A) — a evidențiat prezența unor componente cu greutate moleculară diferite. Astfel, a fost demonstrat faptul că există o legătură între rezistența gelatinei și masa moleculară medie. Punctele izoelectrice și temperaturile de topire sunt ridicate. Datorită factorilor culturali, religioși și preocupărilor legate de sănătate pot apărea rețineri în cazul utilizării acesteia, deși este cel mai utilizat tip de gelatină existent. [25].

Gelatina de pește poate fi produsă din pielea și oasele acestuia, care reprezintă o parte semnificativă a deșeurilor generate în urma procesului de filetare — până la 75% din masa totală a peștelui. Dintre acestea, aproximativ 30% sunt constituite din piele și oase cu un conținut ridicat de colagen, ce pot fi valorificate eficient pentru obținerea gelatinei. Acest tip de gelatină prezintă mai puține bariere culturale. Peștii care sunt des utilizați pentru obținerea gelatinei sunt codul, merluciu și tilapia. Randamentul și calitatea gelatinei depind nu doar de specia sau tipul de țesut utilizat, ci și de parametrii procesului de extracție, care variază în funcție de pH, temperatură și timpul aplicat în etapele de pretratare și extracție propriu-zisă [25].

Gelatina extrasă din insectele *Aspongopus viduatus* și *Agonoscelis* conținea 16 aminoacizi cunoscuți, inclusiv toți aminoacizii esențiali. Deși conține toți aminoacizii esențiali, proteina obținută din această sursă este considerată ca fiind de calitate medie, conform FAO/MAS, datorită conținutului



moderat al acestora. Gelatina din *Aspongopus viduatus* și *Agonoscelis pubescens* a fost extrasă prin trei metode diferite: extracție cu acid slab în combinație cu apă distilată, extracție doar cu apă distilată și extracție cu apă fierbinte. Dintre acestea, metoda cu apă fierbinte a generat cel mai ridicat randament, de până la 3,0%, fiind urmată de metoda cu acid slab (1,5%) și cea cu apă distilată (1,0%) [25].

Pe lângă piei, gelatina mai poate fi obținută din inimile bovinelor. Acestea pot fi limitate datorită calității slabe sau a cantității obținute redusă. Țesutul conjunctiv umed degresat (CT) provenit de la 32 de inimi de bovine (BH) a fost combinat, apoi împărțit în 15 porții a câte 100 g fiecare. Acestea au fost supuse mai multor procese pentru obținerea gelatinei [26].

În figura I.3.1 sunt prezentate etapele extracției de gelatină din țesut conjunctiv (inimi bovine) prin tratamente acide, enzimatic și bazice.

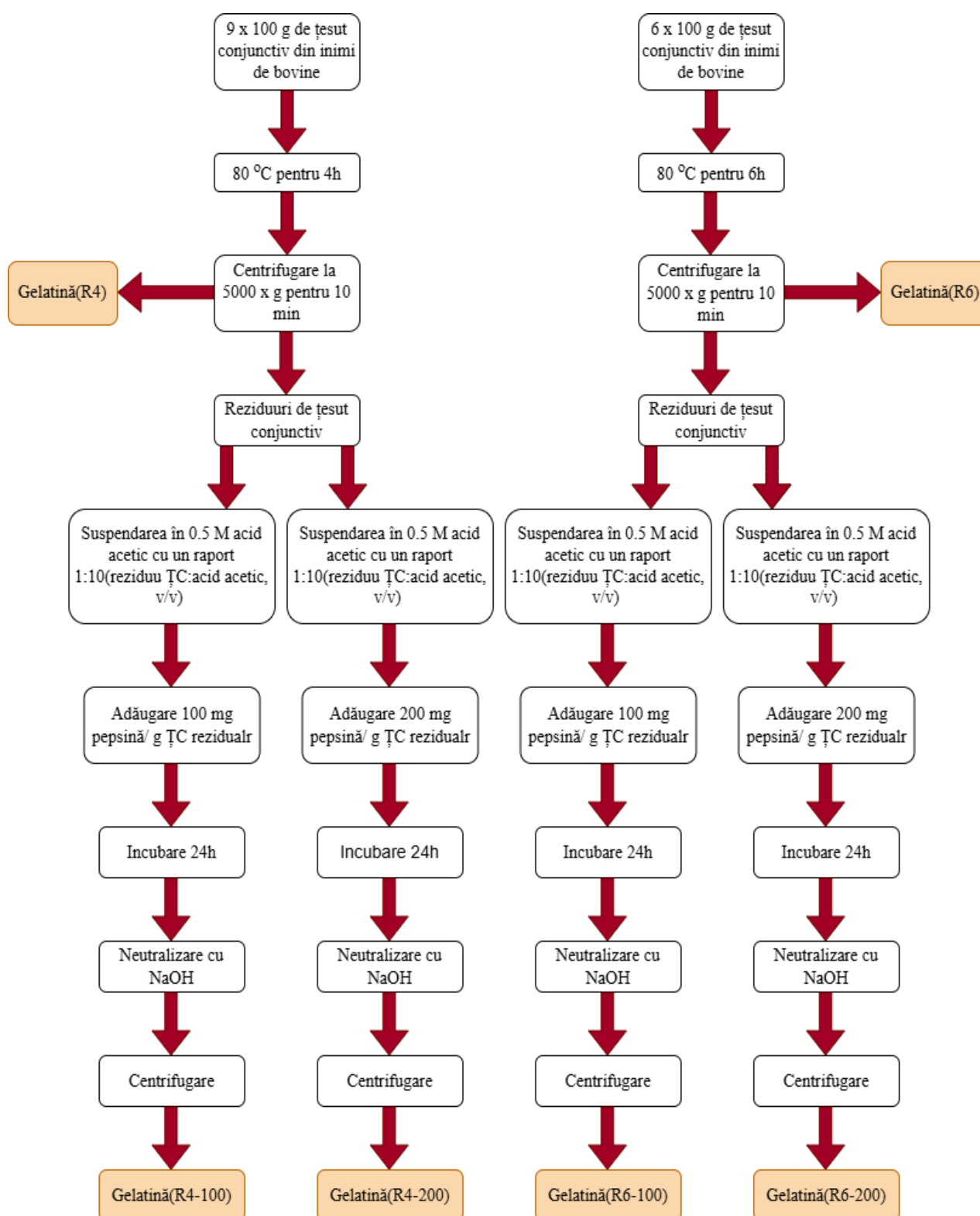


Figura I.3.1. Extracția gelatinei [26]

Pentru obținerea gelatinei, țesutul conjunctiv umed a fost suspendat în apă distilată (raport 1:10, masă/volum), iar extracția acestuia s-a realizat la 80 °C, timp de 4 ore în cazul R4 sau 6 ore în cazul R6. După finalizarea extracției și răcirii, amestecul a fost filtrat pentru a îndepărta reziduurile

nedorite. Asupra reziduurilor obținute s-a utilizat pepsina pentru a rupe legăturile peptidice din collagen. Rezultatul din urma procesului de filtrare a fost colectat și supus dializării. Pentru dializare s-au utilizat membrane de dializă până la atingerea unei conductivități mai mici de 50 μ Siemens. Pentru determinarea randamentului reacției, aceasta a fost cântărită în urma purificării, congelării la -80°C și liofilizării [26].

Pentru extragerea gelatinei din pește sunt utilizate trei metode. Acestea sunt clasificate ca fiind metode alcaline, acide sau enzimatic. Metoda acidă implică tratamente acide atât ușoare, cât și agresive. Pielea de pește este spălată timp de o oră pentru a îndepărta impuritățile sub jet de apă, apoi înmuiată într-o soluție de NaOH timp de 4h, la temperatura camerei. Raportul dintre NaOH și materialul utilizat este 7:1. După etapa aceasta s-a neutralizat materialul și amestecat cu apă distilată în raport 1:2. Acesta a fost supus extracției la 70°C timp de 1,5 ore. Gelatina obținută a fost filtrată prin tifon dublu și uscată ulterior într-un cuptor la 50°C [27].

Spre deosebire de gelatina obținută prin tratament acid, cea obținută prin tratament alcalin prezintă un punct izoelectric diferit (pH-ul la care proteina precipită). Datorită acestor modificări pot apărea în gelatina obținută modificări chimice sau la nivelul structurii. Trei specii de apă dulce sunt folosiți pentru a extrage gelatina — somn dungat, somn mergător și tilapia roșie— printr-un proces de alcalinizare (liming) care va dura două săptămâni. Asemenea procesului acid, pielea peștelui a fost spălată sub jet de apă. În urma spălării, aceasta este uscată și înmuiată într-o soluție saturată de hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), într-un raport de 1:2, timp de 14 zile, la 20°C . Excesul de var stins rezultat în urma reacției cu hidroxidul de calciu a fost îndepărtat prin spălare, menținând un pH de aproximativ 10. Pentru a se solubiliza gelatina, pielea a fost înmuiată timp de 24h în apă distilată la 48°C . Pentru a obține produsul final, se va produce o filtrare cu ajutorul unei hârtii de filtrare și se va trece substanța filtrată printr-o rășină care permite schimbul de cationi. Datorită acestui schimb se va reduce pH-ul la o valoare apropiată de 5 [27].

În cadrul extracției enzimatic, au fost folosite diferite enzime proteolitice pentru a transforma collagenul în gelatină. În urma testelor s-a observat faptul că pentru solzii de crap, parametrii optimi pentru extracție sunt: concentrație de pepsină 547 U/g, pH 4, temperatură de $46,98^{\circ}\text{C}$ și durată de 1,27 ore. Randamentul reacției a fost mai mic decât în cazul celorlalte metode de extracție, însă rezistența gelatinei obținute este mai mare [27].

În figura I.3.2. sunt prezentate metodele de extracție ale gelatinei din pește folosind tratamente acide, alcaline și enzimatic.

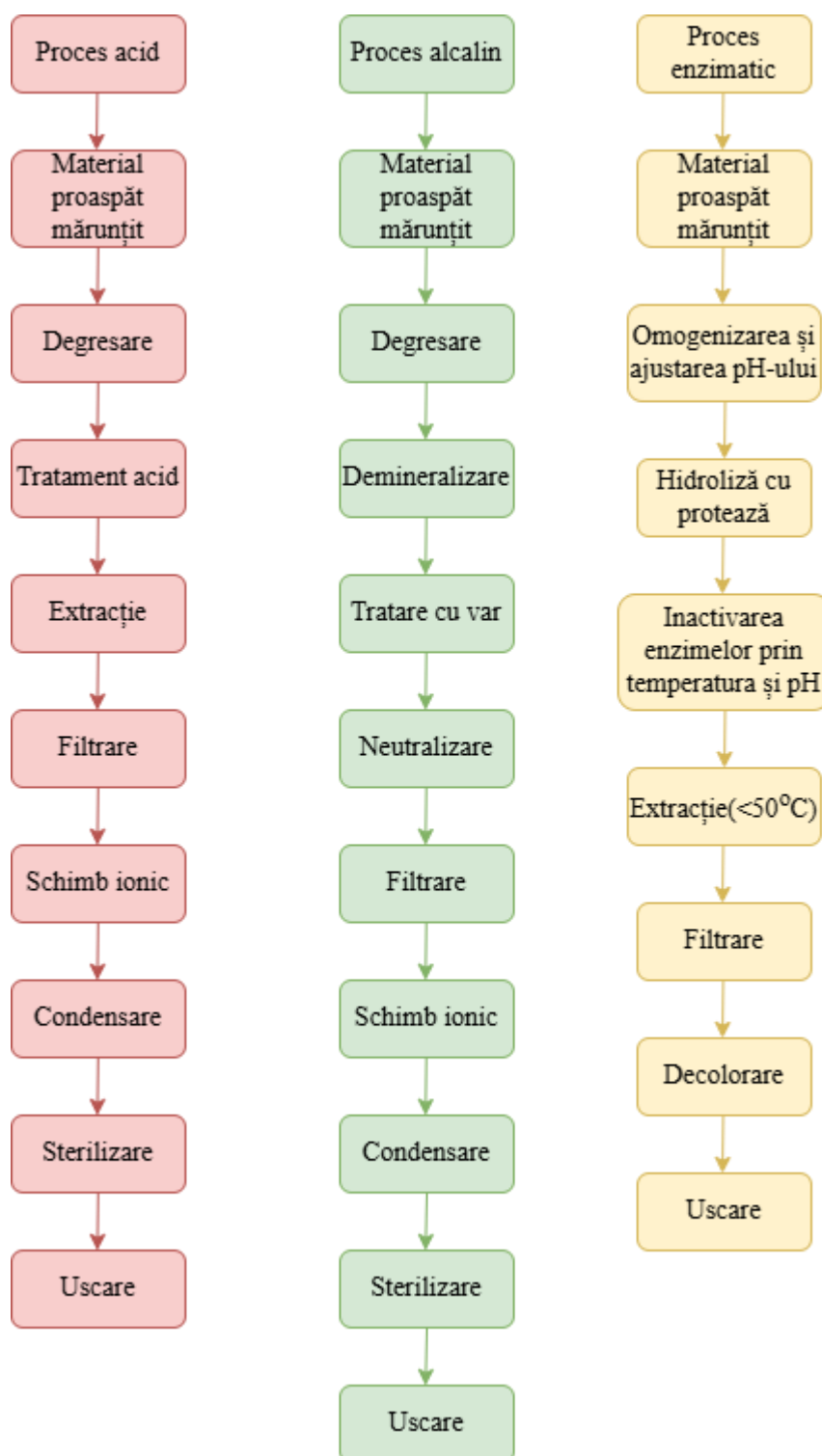


Figura I.3.2. Metodele de extracție a gelatinei din pește [27]

Sonicarea, sonicarea combinată cu acidifierea, sonicarea combinată cu enzime, folosirea microundelor, a apei subcritice, presiunilor ridicate și combinații ale acestora prezintă alte metode de obținerea a gelatinei [28].

I.3.1.2. Aplicații și proprietăți ale gelatinei

Gelatina este un ingredient esențial în industria alimentară, utilizat pentru capacitatea sa de gelifiere. Aceasta modifică textura, claritatea și stabilitatea structurii produselor, astfel fiind utilizată în industria alimentară. În produse precum salate de fructe, înghețată, spume și brânză de vaci mai putem găsi gelatină. Gelatina poate fi utilizată ca material comestibil pentru filme și acoperiri. În industria cosmetică și a produselor de îngrijire personală, este folosită ca agent gelifiant în săruri de baie, șampoane, creme solare, loțiuni de corp, fixativ și creme faciale. O altă utilizare importantă a acesteia o reprezintă realizarea hidrogelurilor, nanomicrosferelor, nanofibrelor, aditivilor farmaceutici și a sistemelor de transport celular pentru transplanturi. Pentru a încapsula medicamentele, aceasta trebuie să fie obținută sub formă micro sau macro, o altă utilizare importantă a acesteia. Servește drept matrice în infuzii intravenoase, microsferi injectabile și implanturi [29].

Un alt scop important pe care îl are aceasta îl reprezintă oprirea sângerărilor. Combinația dintre gelatină și trombină permite formarea unui cheag stabil la locul leziunii, iar particulele de gelatină pot susține mecanic formarea cheagului de fibrină, contribuind la controlul hemoragiei. În plus, au fost dezvoltate microcriogeluri injectabile din gelatină (GMs) pentru a îmbunătăți terapia celulară în tratamentul rănilor profunde. Gelatina poate fi utilizată în filtre de aer pentru analiza microorganismelor purtate de aer, reținerea acestora și identificarea agenților care provoacă reacții alergice. Tot în industria alimentară, este folosită ca emulgator și agent de legare. În criminalistică, investigatorii folosesc benzi flexibile cu un strat gros de gelatină aplicat pe un material textil pentru prelevarea urmelor, în special amprentelor [29].

Proprietățile reologice ale gelatinei, precum rezistența gelului și vâscozitatea, alături de stabilitatea sa termică (temperatura de topire și de gelificare), sunt esențiale pentru evaluarea calității acesteia, completând caracteristicile fizico-chimice de bază cum ar fi solubilitatea, compoziția, transparența, culoarea, mirosul și gustul [30]. În tabelul I.3.1. sunt prezentate caracteristicile standard pentru gelatina comercială.

Tabelul I.3.1. Calitatea standard a gelatinei [31]

Caracteristici	Condiții
Culoare	Gălbui-pal
Gust, miros	Normal
Conținut de umezeală	Maxim 16%
Conținut de pulbere	Maxim 3.25%
Metale grele	Maxim 50 mg/kg

Arsenic	Maxim 2 mg/kg
Cupru	Maxim 30 mg/kg
Zinc	Maxim 100 mg/kg
Sulfizi	Maxim 1000 mg/kg

Valoarea „Bloom” va defini rezistența, aceasta scăzând sub pH 5 și peste pH 9, rămânând constantă între pH 5 și 9. Valori între 4,6 și 7 sunt ideale pentru determinarea valorii Bloom. Vâscozitatea este influențată de factori precum concentrația gelatinei, temperatura și pH-ul. Aceasta crește odată cu concentrația și scade pe măsură ce temperatura și pH-ul cresc [30]. În timpul procesului de gelificare va crește vâscozitatea, iar când va atinge temperatura de formare a gelului, vâscozitatea va crește brusc, valoarea părând infinită [32]. În tabelul I.3.2. sunt prezentate proprietățile gelatinei în funcție de tratamentul (acid/alcalin) utilizat în procesul de extracție.

Tabelul I.3.2. Proprietăți în funcție de fabricarea gelatinei [31]

Caracteristici	Gelatină de tip A	Gelatină de tip B
Vâscozitate	15-75	20-75
pH	3.8-5.5	5-7.5
Valoare Bloom	50-300	50-300

Stabilitatea termică a gelatinei depinde, la rândul ei, de factori precum concentrația polimerului, distribuția masei moleculare și valoarea Bloom. Punctul de topire pentru gelatina rezultată din mamifere se situează între 28 și 31 °C, iar pentru cea de pește între 11 și 28 °C. Gelatina de mamifer are valori tipice între 100–300 Bloom pentru rezistență, 20–25 °C pentru temperatura de gelificare și 28–31 °C pentru topire, în timp ce gelatina de pește are valori de 70–270 Bloom, 8–25 °C și 11–28 °C, respectiv. La temperaturi scăzute, lanțurile de gelatină trec dintr-o formă dezordonată într-una ordonată, formând rețele prin legături de hidrogen [30].

Temperatura de răcire depinde de natura gelatinei. Temperatura de formare a gelului depinde de raportul gelatină:apă din soluție. Din punct de vedere al suprafeței specifice, gelatina prezintă o suprafață mare. Aceasta formează soluții coloidale cu apa datorită dimensiunii moleculelor [32].

I.3.2. Polivinilpirolidona

I.3.2.1. Metode de obținere/extracție polivinilpirolidonă

Polivinil pirolidona (PVP) se mai numește și povidonă. Pentru a obține 1,4-Butandiolul, acetilena și formaldehida vor reacționa. Acesta va hidrogena în butandiol. Pentru a obține pirolidona se va produce o ciclizare oxidativă a butandiolului în butirolactonă, reacționând ulterior cu amoniacul și eliminând apa. Pentru a forma N-vinilpirolidona-2 se va adăuga vinilul. Pentru obținerea polivinilpirolidonei se va polimeriza vinilpirolidona (figura I.3.3.) [33].

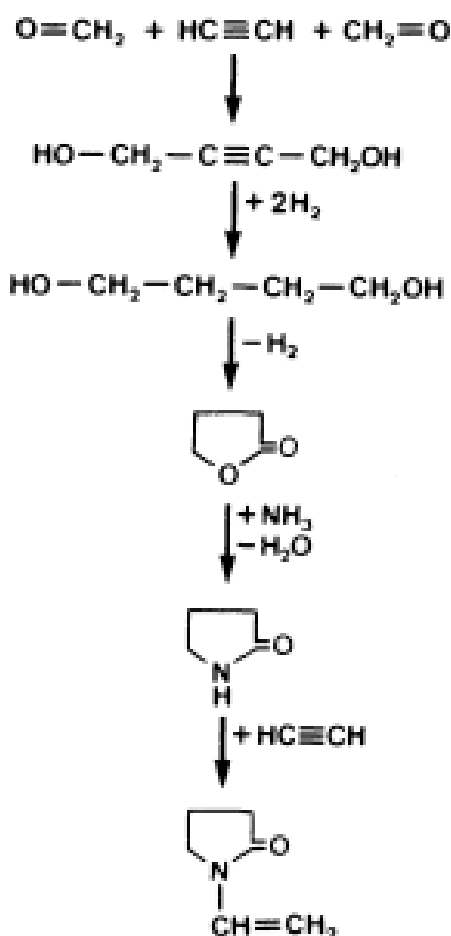


Figura I.3.3. Sinteza polivinilpirolidonei [33]

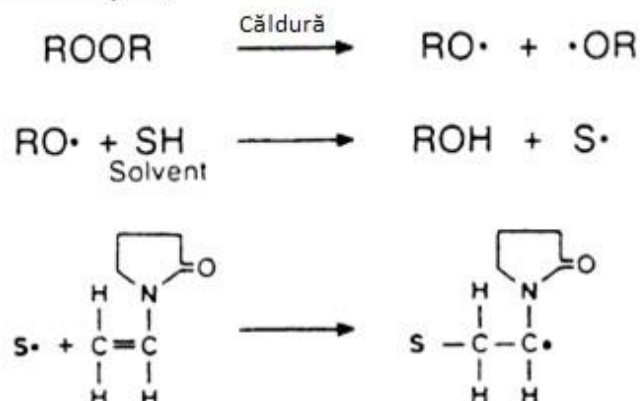
Polimerizarea (figura I.3.4.) se realizează în general în soluție apoasă folosind peroxid de hidrogen ca inițiator. Cantitatea de peroxid de hidrogen va influența masa moleculară, astfel încât cu cât cantitatea de peroxid este mai mare, cu atât este masa moleculară mai mică. Datorită peroxidului apar radicali hidroxil. O grupare de tip aldehydă este prezentă la celălalt capăt. Astfel, conținutul de pirolidonă din polivinilpirolidona obținută în soluție apoasă este mic [33].

Figura I.3.4. Polimerizare în soluții apoase [33]

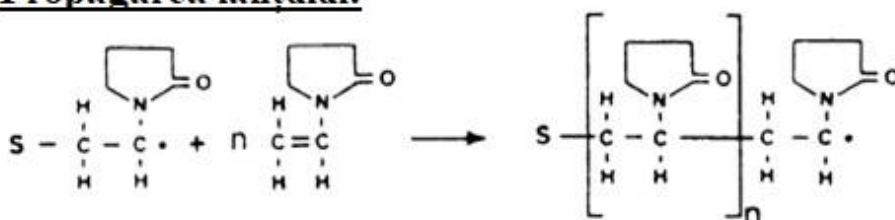
Polimerizarea polivinilpirolidonei se poate realiza și în solvenți organici, cum ar fi toluenul sau alcooli. În acest mediu, utilizarea peroxizilor organici determină formarea de radicali alcoxilici, care generează ulterior radicali de solvent prin abstragere de hidrogen – un proces prin care un radical extrage un atom de hidrogen dintr-o altă moleculă. Radicalul astfel rezultat inițiază reacția de polimerizare [33].

PVP-ul obținut în solvenți organici, în prezența peroxizilor (figura I.3.5), prezintă la capetele lanțului un grup derivat din solvent și un atom de hidrogen, rezultat din terminarea lanțului prin mecanism de transfer. Spre deosebire de polimerizarea în mediu apos, în acest caz nu se produce desprinderea de pirolidonă, ceea ce face ca produsul final să fie mai pur și mai stabil la acțiunea agenților oxidanți, datorită absenței grupărilor terminale de tip aldehydă. Totuși, reacțiile de transfer determinate de solvent conduc la obținerea unor mase moleculare mai mici. Utilizarea exclusivă a peroxidului de hidrogen duce la mase moleculare medii, în timp ce prezența inițiatorilor organici contribuie la formarea unor polimeri cu masă moleculară mare [33].

Inițierea reacției:



Propagarea lanțului:



Terminarea reacției:

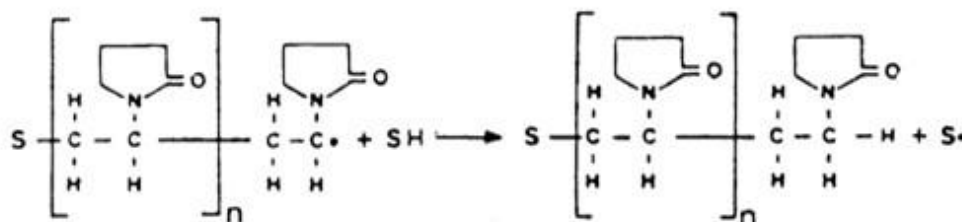


Figura I.3.5. Polimerizare în solvenți organici [33]

I.3.2.2. Aplicații și proprietăți polivinilpirolidonă

Polivinilpirolidona este un polimer biocompatibil și prezintă capacitatea de a forma complexe stabile cu substanțe active. Alte proprietăți importante ale **PVP-ului** sunt solubilitatea în solvenți, legarea altor particule, aderare bună la suprafață, afinitatea la suprafețe hidrofile sau hidrofobe, protejarea substanțelor împotriva înghețului și în timpul liofilizării, proprietatea de îngroșare și prezintă rolul de inhibitor al recristalizării [34]. Acest polimer este incolor, inert chimic, rezistent la temperaturi ridicate, stabil la variații ale pH-ului [35].

În timpul celui de al II-lea Război Mondial, PVP a fost utilizat ca înlocuitor al plasmiei sanguine și agent de expansiune. Datorită masei moleculare mici ale PVP apare proprietatea de sorbție și este utilizat pentru formarea agenților de eliminare a toxinelor. Acesta mai poate fi utilizat pentru fabricarea medicamentelor, capsulelor moi, gelurilor, hidrogelurilor, filmelor și acoperirilor,



membranelor, substraturilor din nanofibre, pulberi, siropuri, soluțiilor administrate oral sau injectabile, lentilelor de contact, în stomatologie și ortopedie [34].

Datorită proprietăților electrice bune, PVP-ul este utilizat pentru fabricarea ecranelor, plăcilor de circuite imprimate, tuburi catodice, dispozitive de stocare a energiei, celule solare. Mai mult, acesta poate fi folosit drept material fotorezistiv. O altă aplicație o constituie utilizarea compozitelor de PVP dopate cu nanoparticule de Au/Ag. În cazul sintezei nanoparticulelor este utilizat PVP pentru a preveni formarea aglomerarea particulelor și controlarea dimensiunii acestora. Acesta este utilizat ca material activ în realizarea dispozitivelor de memorie de tip WORM. Membranele de ultrafiltrare, macrofiltrare, microfiltrare și nanofiltrare din PVP au rol în purificarea apelor, tratarea apelor reziduale, desalinizare, procesarea alimentelor, separarea gazelor, permeabilitatea selectivă și membrane de tip fibră goală. Hidrofilicitatea PVP-ului îl face potrivit pentru fabricarea lentilelor de contact, întrucât umectabilitatea este un factor important care sporește confortul în timpul utilizării, prin menținerea umidității și reducerea coeficientului de frecare [34].

PVP, în combinație cu iodul, formează complexul iod povidonă, utilizat pe scară largă în produse precum soluții, săpunuri lichide, unguente, scruburi chirurgicale și ovule, datorită proprietăților sale antiseptice. Acesta oferă protecție pielii și mucoaselor în timpul intervențiilor chirurgicale și este folosit ca agent antibacterian și antimicrobian în diverse dispozitive medicale. Sub denumiri comerciale precum Pyodine, Betadine sau Wokadine, PVP-iodul este utilizat și în procedura de pleurodeză, fiind preferat în locul talcului în cazurile de revărsate pleurale persistente. Polimerul este utilizat ca agent de învăluire pentru prepararea unui electrod de contra-electrod (CE) din nanotuburi de carbon cu un singur perete. PVP este utilizată la obținerea hârtiei [34].

I.4. MEDICAMENTE UTILIZATE ÎN TRATAREA RĂNILOR INFECTATE

Doxiciclina face parte din clasa antibioticelor tetraciclinice și este utilizată de peste 40 de ani. A fost produsă de compania Pfizer ca un derivat semisintetic al oxitetraciclinei și a devenit disponibilă pe piață pentru prima dată în anul 1967. Acesta prezintă acțiune bacteriostatică, este bine tolerată și funcționează prin inhibarea ribozomilor bacterieni. O dată sau de două ori pe zi sunt administrate doze de 100 mg, iar doza maximă admisă este de 300 mg pe zi. În cazul în care infecția este gravă, doza recomandată este crescută, aceasta fiind de 200 mg de două ori pe zi timp de trei zile. Dozajul și durata tratamentului variază în funcție de pacient și de gravitatea problemei. Aceasta poate fi administrată și în doze mici de 20 mg de două ori pe zi în cazul acneei sau a rozaceei. Aceasta este folosită și pentru tratarea parodontitei. Administrarea medicamentului se va face oral sau intravenos. În urma administrării orale este recomandat ca pacientul să rămână în poziție verticală 30 de minute pentru a evita iritația esofagului [36].

Doxiciclina poate provoca efecte adverse, atât la nivel gastrointestinal, cât și la nivel hepatic. Administrarea sa este contraindicată la femeile gravide și la copii din cauza riscului de colorare permanentă a dinților în timpul dezvoltării și din cauza posibilelor efecte asupra formării oaselor. Acesta poate interacționa cu metotrexanul și contraceptivele orale, iar absorbția sa este redusă dacă este administrat simultan cu antiacide sau suplimente ce conțin fier. Medicamentul are efect asupra bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. Prezintă utilizări în diverse infecții, cum ar fi cea respiratorie, urinară, cele produse de spirochete și de bacterii rezistente la alte medicamente. În plus, este indicată în unele boli autoimune, precum sclerodermia și artrita reumatoidă [36]. În figura I.4.1. este prezentată structura chimică a doxiciclinei.

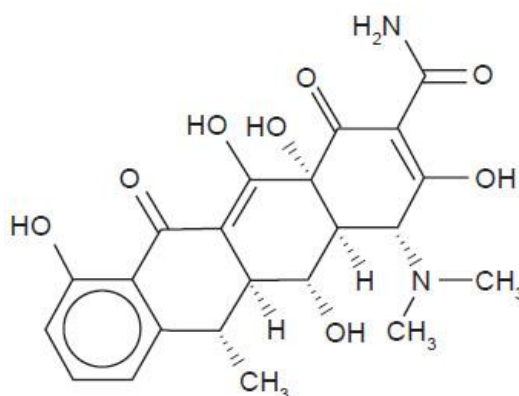


Figura I.4.1. Structura chimică a doxiciclinei [36]



Doxiciclina se va lega reversibil de subunitatea 30S a ribozomului și împiedică atașarea aminoacil-ARNt-ului la ribozom, astfel inhibând sinteza proteică bacteriană. Pentru a completa această acțiune, se va produce o inhibare suplimentară a sintezei proteice la nivelul mitocondriei, prin interacțiunea cu ribozomii 70S. Prin porii hidrofilii localizați la nivelul membranei externe și printr-un sistem activ de transport dependent de pH în membrana citoplasmatică internă se va realiza pătrunderea în celulă [36].

Alte avantaje importante ale doxiciclinei sunt inhibarea procesului de angiogeneză și apoptoză, stimularea fixării fibroblastelor la nivelul gingiilor și accelerarea procesului de vindecare a rănilor. Mai mult, acesta poate bloca activitatea metaloproteinazelor matriceale (MMP), ceea ce oferă un potențial terapeutic în tratarea unor afecțiuni cu caracter antiinflamator și antitumoral. În managementul parodontitei, utilizarea doxiciclinei în doze sub-antimicrobiene s-a dovedit eficientă în limitarea degradării colagenului și în inhibarea efectelor dăunătoare ale metaloproteinazelor matriceale (MMP) asupra țesutului gingival [36].

II.STUDIUL EXPERIMENTAL

II.1. SCOPUL LUCRĂRII

Lucrarea urmărește obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri din **gelatină** de tip B și **polivinilpirolidonă** încapsulate cu doxiciclină cu scopul de a prezenta potențial în tratarea rănilor infectate. În cazul în care pacienții prezintă comorbidități sau imunitate scăzută, utilizarea acestor materiale ce eliberează medicament este esențială.

Gelatina este aleasă datorită biocompatibilității, biodegradabilității și capacității de absorbție. Polivinilpirolidona, un polimer sintetic, este utilizată pentru a îmbunătăți stabilitatea structurală și pentru a controla proprietățile de gonflare și degradare. Doxiciclina este un antibiotic selectat pentru capacitatea de a inhiba proliferarea bacteriilor gram-pozitive și gram-negative, frecvent implicate în infecțiile cutanate.

Au fost realizate patru probe care conțin diferite concentrații de gelatină și doxiciclină pentru a observa diferențele datorate acestor modificări compoziționale. Acestea au fost obținute prin hidratare, omogenizare, reticulare și liofilizare. Metoda a fost aleasă datorită eficienței de a obține materiale poroase, stabile și biocompatibile.

Astfel, s-a urmărit efectul concentrațiilor diferite asupra stabilității și capacității de gonflare, caracterizarea chimică a interacțiunilor dintre componente prin spectroscopie FTIR, modificarea porozității în funcție de compoziția folosită, efectul antibacterian și viabilitatea celulelor pe suprafața materialelor obținute.

II.2. OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE HIDROGELURI PE BAZĂ DE GELATINĂ-POLIVINILPIROLIDONĂ-DOXICICLINĂ

II.2.1. Obținere hidrogeluri

II.2.1.1. Materiale

Materialele utilizate pentru obținerea hidrogelurilor sunt:

- Gelatina
- Polivinilpirolidona
- Doxiciclina
- Apa ultrapură
- Glutaraldehida

Gelatina este un amestec eterogen de proteine solubile în apă, extrasă din collagen. Proteinele sunt extrase prin fierberea pielii, tendoanelor, ligamentelor, oaselor în apă. În acest caz, gelatina a fost obținută prin proces alcalin. Gelatina de tip A și cea de tip B se deosebesc prin valoarea pH-ului izoelectric. De asemenea, secvența N-terminală specifică gelatinei bovine este distinctivă și permite identificarea sa. Gelatina bovină de tip B a fost aleasă datorită biocompatibilității oferite, capacității de absorbție, bioresorbabilității, capacității de a fi ușor de procesat și capacității de a obține structuri poroase din aceasta. Aceasta a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich. Aceasta este sub formă de pulbere. Această gelatină este superioară, prezentând o rezistență de 225 g Bloom. Culoarea este slab galbenă și adăugată în apă prezintă aspect ușor tulbure. Atunci când este încălzită la 100 °C în prezența aerului, aceasta se umflă, devine moale și se descompune. Prețul a 100 g de gelatina de tip B este de 81 € [37].

Polivinilpirolidona aleasă este cea cu indicele K86-95 și o masă moleculară medie de 1300000. Ea a fost achiziționată de la Fisher Scientific și prețul a 500 g este de 162.15 €. Polimerul prezintă culoare crem-alb spre albă și este sub formă de pulbere. Aceasta este solubilă în apă și prezintă pH între 4 și 7. Formula moleculară este $(C_6H_9NO)_n$. Masa moleculară este de 111,14 g/mol [38]. Acesta a fost ales datorită biocompatibilității, proprietății de a reține apă și stabilității mecanice oferite scaffold-ului.

Doxiciclina folosită este cumpărată de pe Sigma-Aldrich, iar un gram costă 91.5 €. Aceasta prezintă colorație galbenă și este eficientă împotriva bacteriilor Gram-negative, bacteriilor Gram-pozitive, a microplasmelor și a paraziților [39].

Glutaraldehida a fost cumpărată de pe Sigma-Aldrich, prețul a 500 mL soluție fiind 258 €. Aceasta este folosită pentru a stabili structura hidrogelului și a oferi o rezistență mecanică mai bună. Manipularea acesteia trebuie să fie realizată cu atenție sub nișă, deoarece este toxică și provoacă iritații și colorarea pielii pentru o perioadă de timp (câteva zile - o săptămână în funcție de persoană) [40].

Apa ultrapură a fost obținută folosind sistemul TRITON 12. Acesta este conectat la rețeaua de apă. Acesta va filtra apa, apoi elimină ionii și compușii organici folosind cartușe de purificare, procesul fiind monitorizat de senzori de presiune și debit. Apa este recirculată în permanență pentru a evita contaminarea și cu scopul de a menține puritatea. Aparatul va elimina urmele de ioni și substanțe organice. Apa va trece prin lămpi UV și va fi ultrafiltrată pentru a reduce cantitatea de carbon provenită din compușii organici, eliminarea microorganismelor, reținerea endotoxinelor, proteinelor, dezoxiribonucleazelor și a ribonucleazelor. Ultimul pas înainte de eliberarea apei îl reprezintă microfiltrarea sterilă. Apa obținută prezintă o conductivitate de $0.055 \mu\text{S/cm}$.

II.2.1.2. Sinteza hidrogeluri

Pentru obținerea hidrogelului pe bază de gelatină și polivinilpirolidonă, primul pas îl reprezintă cântărirea gelatinei și polivinilpirolidonei folosind tăvițe și o balanță. S-au realizat 4 hidrogeluri cu diferite concentrații de gelatină și doxiciclină conform tabelului II.2.1.

În figurile II.2.1. și II.2.2. sunt ilustrate în detaliu etapele efectuate pentru sinteza hidrogelurilor.

Tabelul II.2.1. Compoziția probelor

Proba	Gelatină, %	Polivinilpirolidonă, %	Doxiciclină, %	Glutaraldehydă, %
D1	10	5	0,2	0,5
D2	15		0,4	
D3	10			
D4	15			

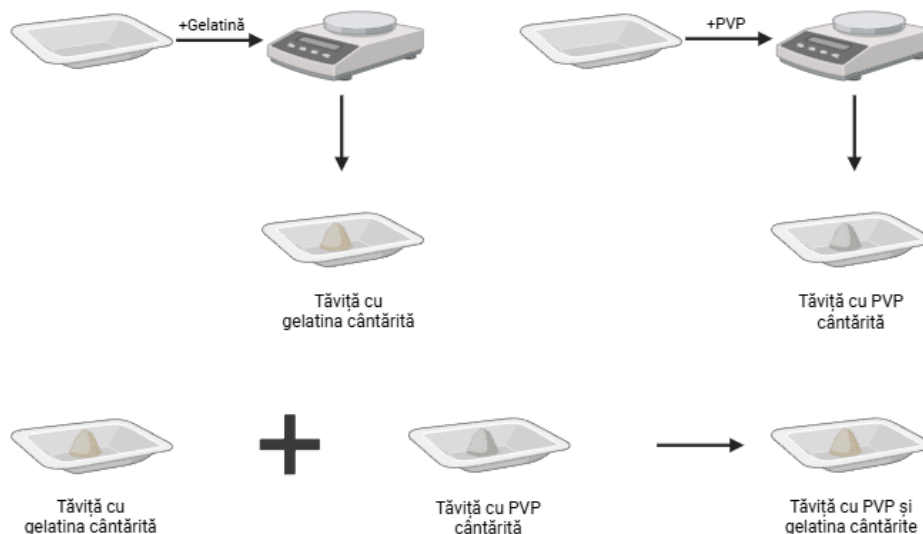


Figura II.2.1. Dozarea gelatinei și polivinilpirolidonei

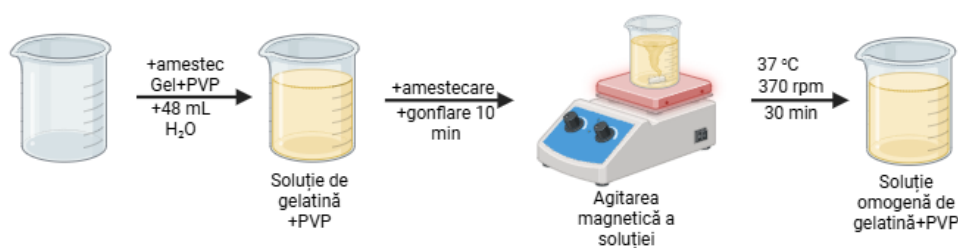


Figura II.2.2. Obținerea soluției de gelatină

Gelatina și polivinilpirolidona pentru fiecare hidrogel au fost amestecate în 4 tăvițe. Pentru fiecare amestec s-au folosit 48 mL apă distilată. Amestecul a fost introdus în apă și agitat, apoi lăsat la gonflat timp de 10 minute. În paharul cu amestecul a fost introdus un magnet, iar apoi paharul a

fost așezat pe o plită magnetică la o temperatură de 37 °C și o viteză de rotație de 370 rpm timp de 30 de minute.

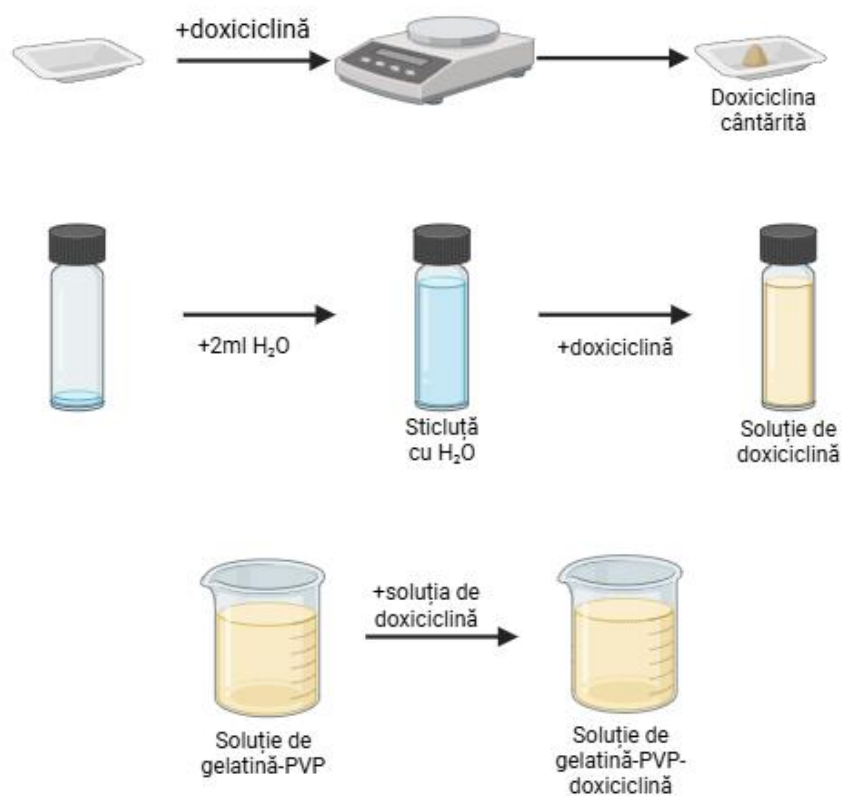


Figura II.2.3. Obținerea soluției de gelatină-PVP-doxiciclină

În acest timp au fost realizate soluțiile de doxiciclină (figura II.2.3). Au fost realizate 4 soluții, două soluții conțin 0,1 g doxiciclină și 2 mL apă distilată, iar celelalte două soluții conțin 0,2g doxiciclină și 2 mL apă distilată. Când amestecul de gelatină-PVP s-a omogenizat s-a adăugat soluția de doxiciclină în amestec.

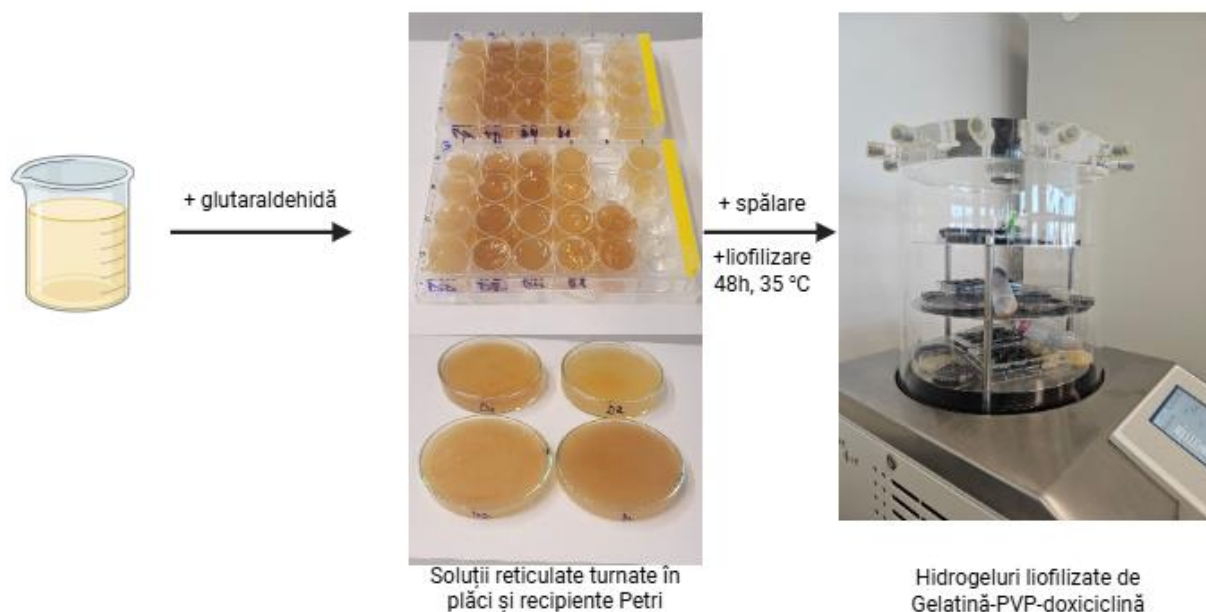


Figura II.2.4. Obținerea materialelor liofilizate

După introducerea medicamentului în sistemul polimeric s-a adăugat glutaraldehida ca agent de reticulare. Soluțiile au fost turnate rapid în plăci sterile și vase Petri și introduse în congelator în vederea liofilizării ulterioare. Probele congelate au fost liofilizate timp de 48 h. Liofilizarea este compusă din două etape: înghețarea în prealabil a probelor și sublimarea gheții cu ajutorul vidului înaintat. Acest proces a fost realizat cu ajutorul liofilizatorului tip Martin Christ Alpha 2-4 LSCbasic, produs în Osterode am Harz, Germania.

Hidrogelurile au fost așezate pe suporturile liofilizatorului și răcite la $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de o oră și jumătate. În urma acestei răciri s-a produs liofilizarea conform timpului stabilit.

Tabelul II.2.2 Etapele liofilizării

Nr.	Etapa	Timp, ore	Temperatura, $^{\circ}\text{C}$
1	Pre-răcirea suporturilor	1,5	-30
2	Încărcarea aparatului	0,5	-30
3	Procesul propriu-zis	46	+35

II.2.2. Caracterizarea hidrogelurilor

II.2.2.1. Spectroscopie în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR)

Pentru a determina grupele funcționale și legăturile moleculare dintre compușii chimici ai probelor sau materialelor analizate se folosește spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier. Analiza realizată poate fi calitativă sau cantitativă. Analiza calitativă este reprezentată de identificarea componentelor chimice prin interpretarea benzilor de absorbție din spectru. Analiza cantitativă evaluează cantitatea unei substanțe prezentă într-o probă pe baza intensității benzilor de absorbție din spectru. Acestea sunt calculate cu ajutorul legii Lambert-Beer :

Ecuatia II.2.1. Legea Lambert-Beer

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

unde A reprezintă absorbanța, ε reprezintă absorbivitatea molară, l este grosimea stratului, iar c reprezintă concentrația speciilor absorbante.

Spectrofotometrul cu transformata Fourier este aparatul care determină spectrul de absorbție. Principalul avantaj al acestui aparat îl constituie timpul scurt de realizare al spectrului față de alte spectrofotometrele. Un astfel de sistem este compus din sursă, interferometru, probă, detector, interferogramă și computer. Fasciculul produs de sursă trece prin interferometru. Razele sunt împrăștiate, reflectate și recombinate, creând interferență. Moleculele din probă absorb selectiv radiația la anumite frecvențe în funcție de tipurile de legături chimice. Fasciculul rezultat ajunge la detector. Acesta măsoară diferențele de energie și se va obține o interferogramă. Aceasta este trimisă către computer, care aplică transformata Fourier. Semnalul este convertit în funcție de frecvență și este generat spectrul. Fiecare bandă va reprezenta absorbția unei anumite grupări funcționale din moleculă [41].

În general, spectrul IR obținut cu ajutorul unui spectrometru FTIR se situează în regiunea infraroșu mediu, cuprinsă între 4000 și 650 cm^{-1} . În acest interval se regăsesc tranzițiile energetice asociate modificărilor stării vibraționale ale multor grupe funcționale [41].

Există patru regiuni specifice în care se regăsesc legături:

- 4000-2500 cm^{-1} - legături simple (O-H, C-H, N-H)
- 2500-2000 cm^{-1} - legături triple (ex: C \equiv C, C \equiv N)
- 2000-1500 cm^{-1} - legături duble (ex: C=C, C=O)
- 1500-650 cm^{-1} - amprenta moleculară

Pentru înregistrarea analizei FTIR a biomaterialelor obținute s-a folosit spectrometrul FTIR Bruker, Vertex 70. Spectrul FTIR a fost înregistrat în modul ATR – FTIR în intervalul 4000-500 cm^{-1} , rezoluție 4 cm^{-1} și pentru fiecare probă au fost realizate 32 de achiziții.

În figura II.2.5. sunt prezentate spectrele de absorbție ale probelor analizate și ale polimerilor constituenți. În acest spectru se observă benzile caracteristice ale materialelor în domeniul spectral $4000\text{ cm}^{-1} - 500\text{ cm}^{-1}$. Spectrul de culoare roz este spectrul probei D1 ce conține 10% gelatină și 0,2% doxiciclină. Spectrul de culoare portocalie este spectrul probei D2 ce conține 15% gelatină și 0,2% doxiciclină, cel de culoare roșie este spectrul probei D3 ce conține 10% gelatină și 0,4% doxiciclină, iar cel colorat cu albastru deschis reprezintă spectrul probei D4 cu 15% gelatină și 0,4% doxiciclină. Spectrul verde și cel albastru închis sunt spectrele gelatinei și polivinilpirolidonei.

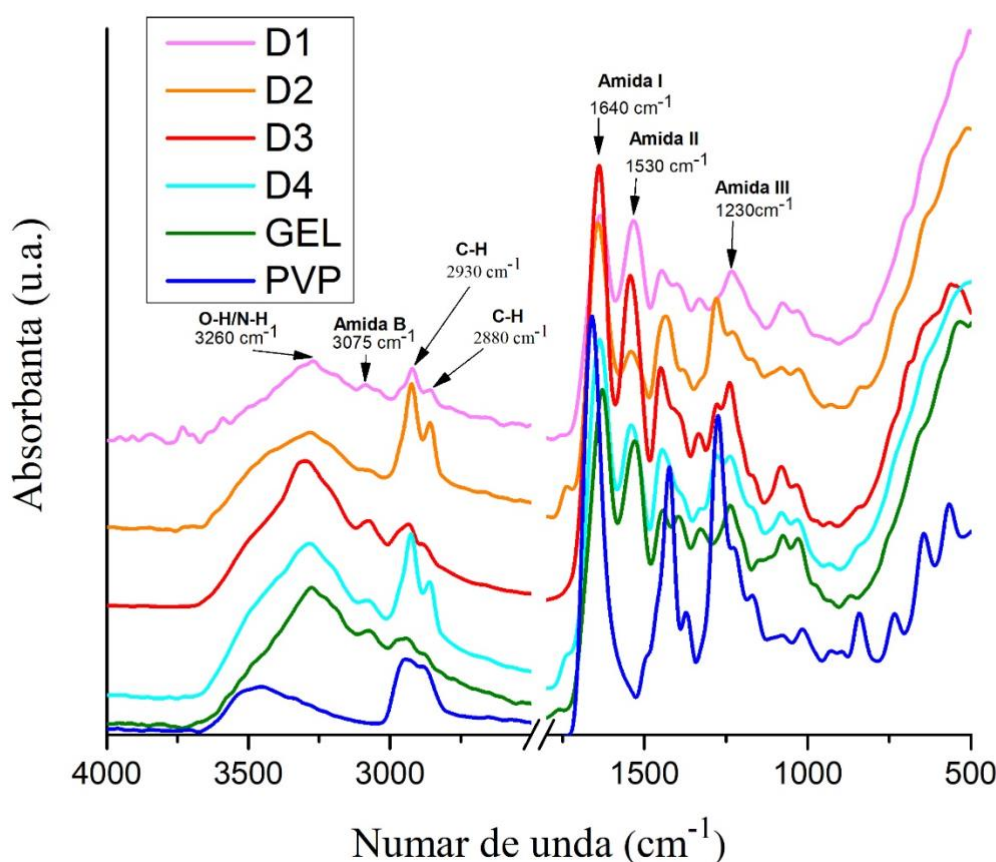


Figura II.2.5. Spectrele ATR-FTIR caracteristice hidrogelurilor Gel-PVP

În urma analizei spectrelor s-a observat faptul că gelatina este componenta principală a materialelor realizate. Prima bandă specifică este cea observată la 3260 cm^{-1} , sub forma unui vârf larg, asociat cu vibrațiile suprapuse ale O-H și N-H care pot proveni din grupările hidroxil și moleculele de apă implicate în legături de hidrogen și grupări amino primare [42]. Un vârf de intensitate mică poate fi observat la 3075 cm^{-1} asociat Amidei B [43]. La 2930 cm^{-1} și 2880 cm^{-1}

apar vârfuri specifice vibrațiilor de întindere asimetrice și simetrice C-H. Benzile de la 1640 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} și 1230 cm^{-1} sunt asociate Amidei I, Amidei II și Amidei III [42].

Se observă și prezența benzilor specifice polivinilpirolidonei, aceasta fiind componenta minoritară. Vârfurile caracteristice ale PVP întâlnite în probe sunt cele de la 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , specifice vibrațiilor de întindere asimetrice și simetrice C-H și la 1640 cm^{-1} asociate vibrației C=O din inelul lactanic [42]. Nu se observă benzi specifice glutaraldehydei, ceea ce arată că a fost eliminată din material.

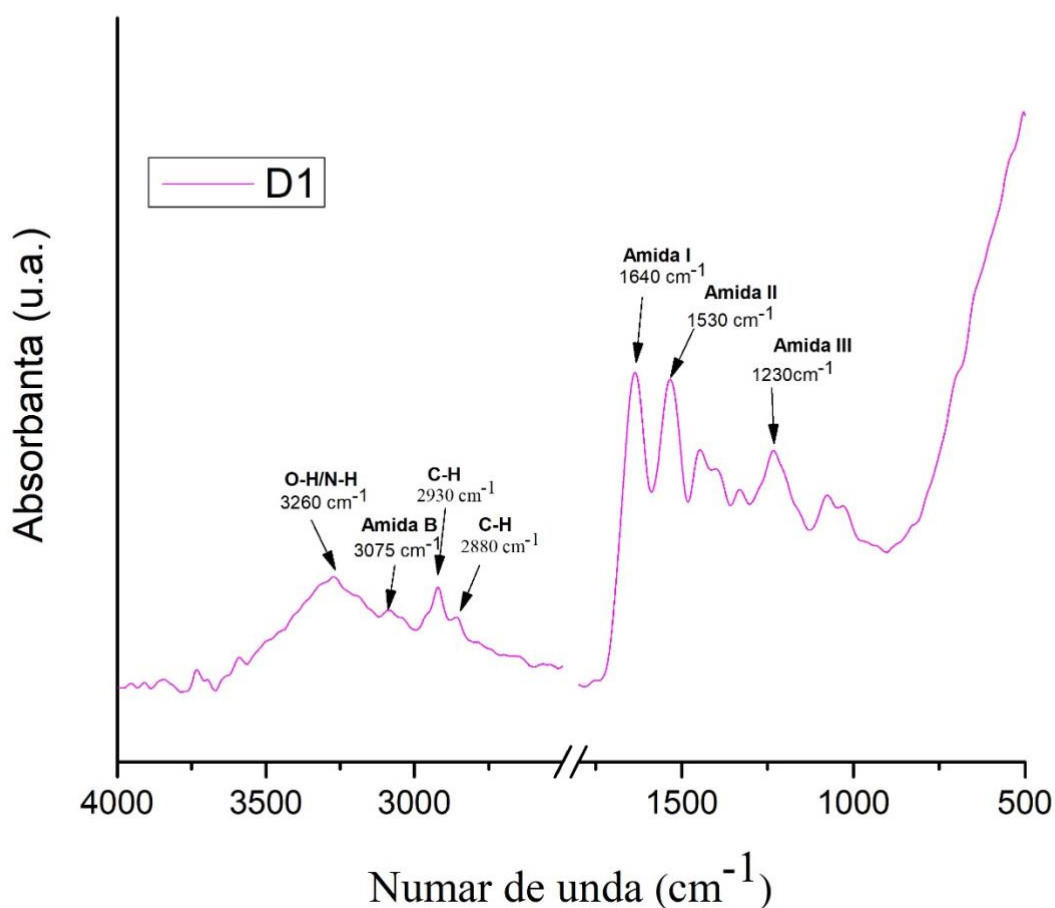


Figura II.2.6. Spectrul ATR-FTIR al probei D1

În figura II.2.6. se observă spectrul FTIR al probei D1. Aceasta conține benzile specifice gelatinei la 3260 cm^{-1} , 3075 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} și 1230 cm^{-1} și ale polivinilpirolidonei la 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} și 1640 cm^{-1} .

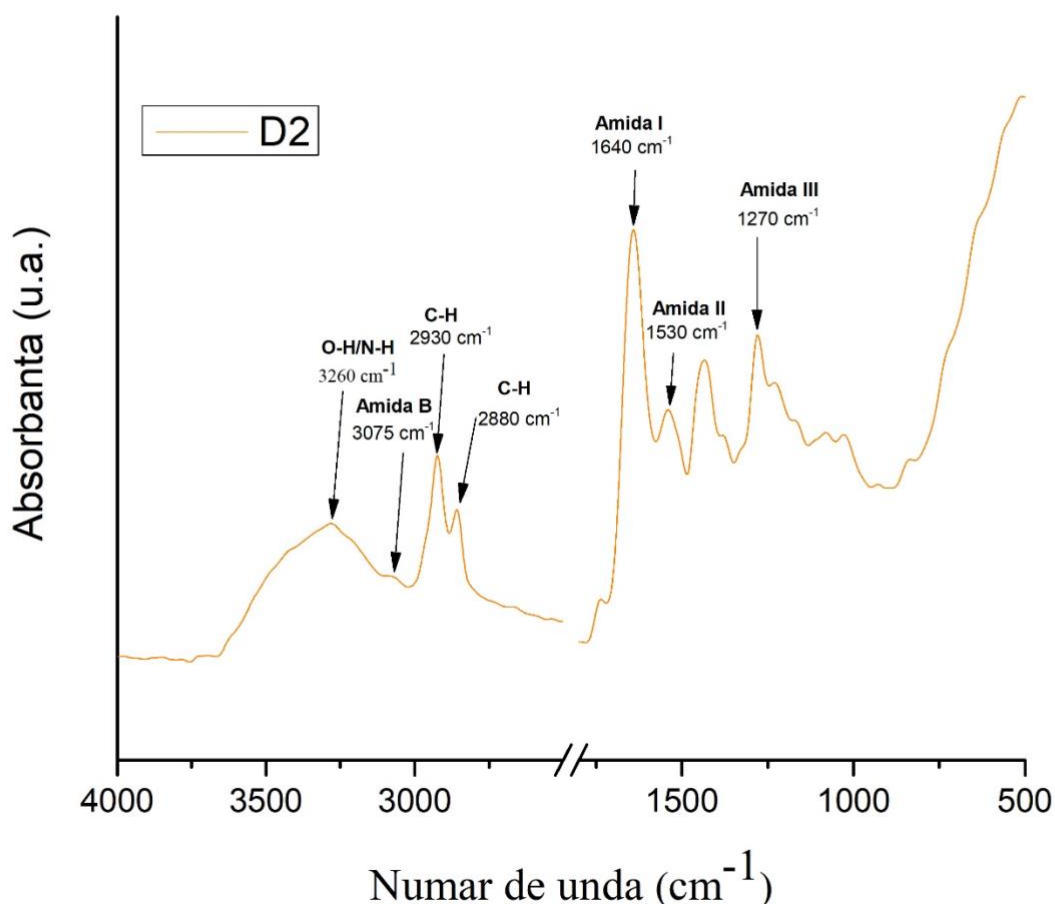


Figura II.2.7. Spectrul ATR-FTIR al probei D2

În figura II.2.7. se observă spectrul FTIR al probei D2. Aceasta conține benzile specifice gelatinei la 3260 cm^{-1} , 3075 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} și 1270 cm^{-1} și ale polivinilpirolidonei la 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} și 1640 cm^{-1} . Deplasarea benzii care corespunde Amidei III se poate datora formării legăturilor de hidrogen. PVP și doxiciclina pot forma legături cu grupările amidice ale gelatinei, rigidizând lanțurile. O altă cauză a modificării poziției poate fi reticularea. Glutaraldehida formează punți între lanțurile de gelatină. Modificarea umidității sau polarității mediului pot influența poziția benzii de absorbție.

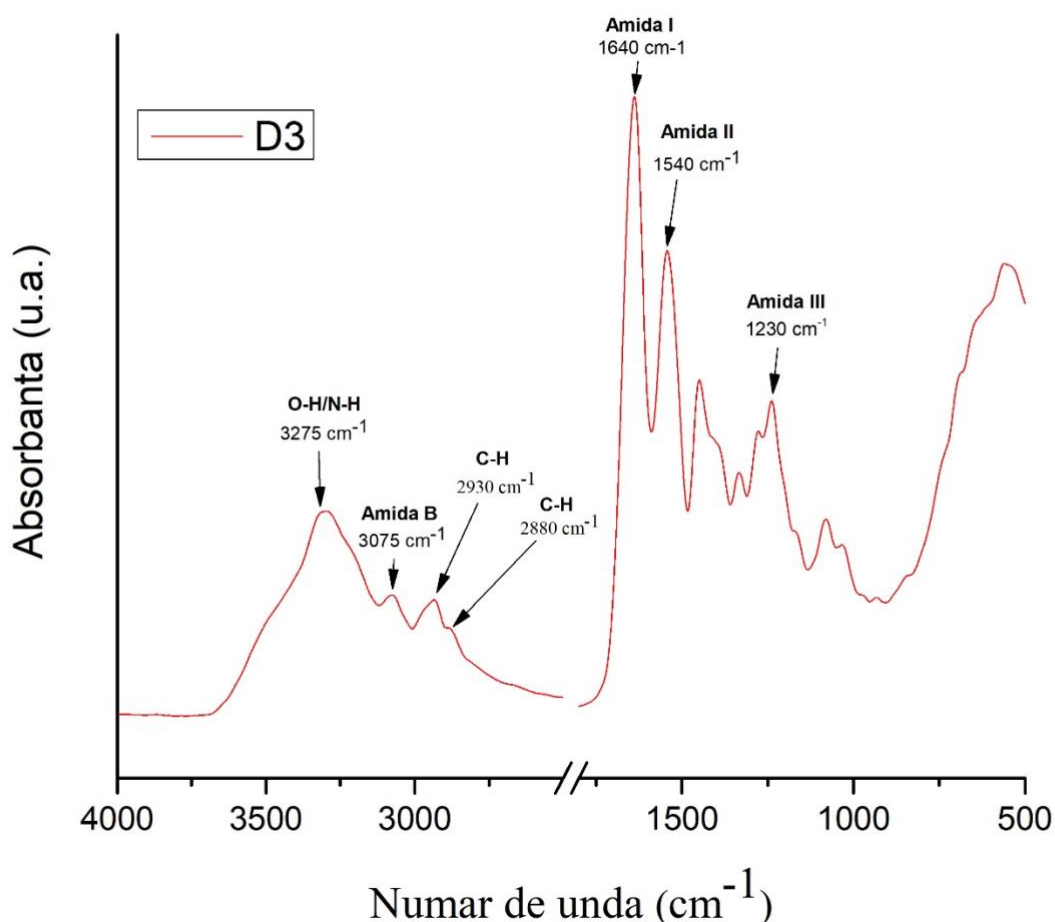


Figura II.2.8. Spectrul ATR-FTIR al probei D3

În figura II.2.8. se observă spectrul FTIR al probei D3. Aceasta conține benzile specifice gelatinei la 3275 cm^{-1} , 3075 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} și 1230 cm^{-1} și ale polivinilpirolidonei la 2930 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} și 1640 cm^{-1} . Apar modificări la nivelul benzii de la 3260 cm^{-1} corespunzătoare vibrațiilor O-H/N-H la 3275 cm^{-1} și la nivelul benzii de la 1530 cm^{-1} la 1540 cm^{-1} corespunzătoare Amidei II. Modificarea primei benzi poate fi datorată legăturilor de hidrogen mai slabe obținute prin modificări de temperatură în timpul sintezei sau prin reducerea numărului de -NH_2 în urma reticulării. O altă consecință pe care o poate avea consumul unei cantități mai mari de -NH_2 o reprezintă mișcarea benzii corespunzătoare Amidei II.

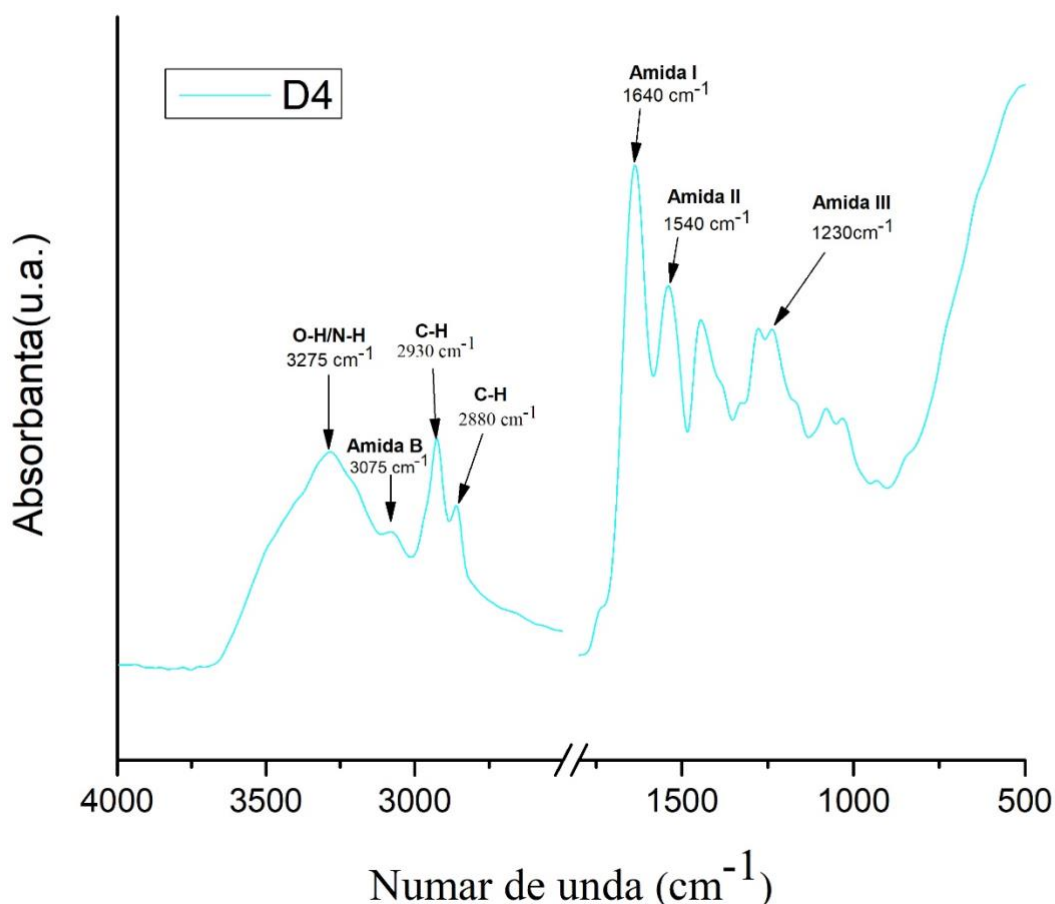


Figura II.2.9. Spectrul ATR-FTIR al probei D4

În figura II.2.9. se observă spectrul FTIR al probei D4. Aceasta conține benzile specifice gelatinei la 3275 cm⁻¹, 3075 cm⁻¹, 2930 cm⁻¹, 2880 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹ și 1230 cm⁻¹ și ale polivinilpirolidonei la 2930 cm⁻¹, 2880 cm⁻¹ și 1640 cm⁻¹. Apar aceleași modificări ale benzilor de la 3275 cm⁻¹ și 1540 cm⁻¹ care apar în cazul probei D3. Astfel, cantitatea de doxiciclină poate fi explicația acestor deplasări ale benzilor, acestea crescând numărul de grupări capabile să formeze legături de hidrogen. O altă explicație a mișcării benzii o reprezintă mărirea cantității de gelatină din compoziție. Prezența cantității ridicate de gelatină duce la mai multe grupări N-H, ceea ce crește rigiditatea rețelei polimerice. Datorită cantității mari de doxiciclină se pot produce mai multe interacțiuni cu grupările amidice din gelatină.

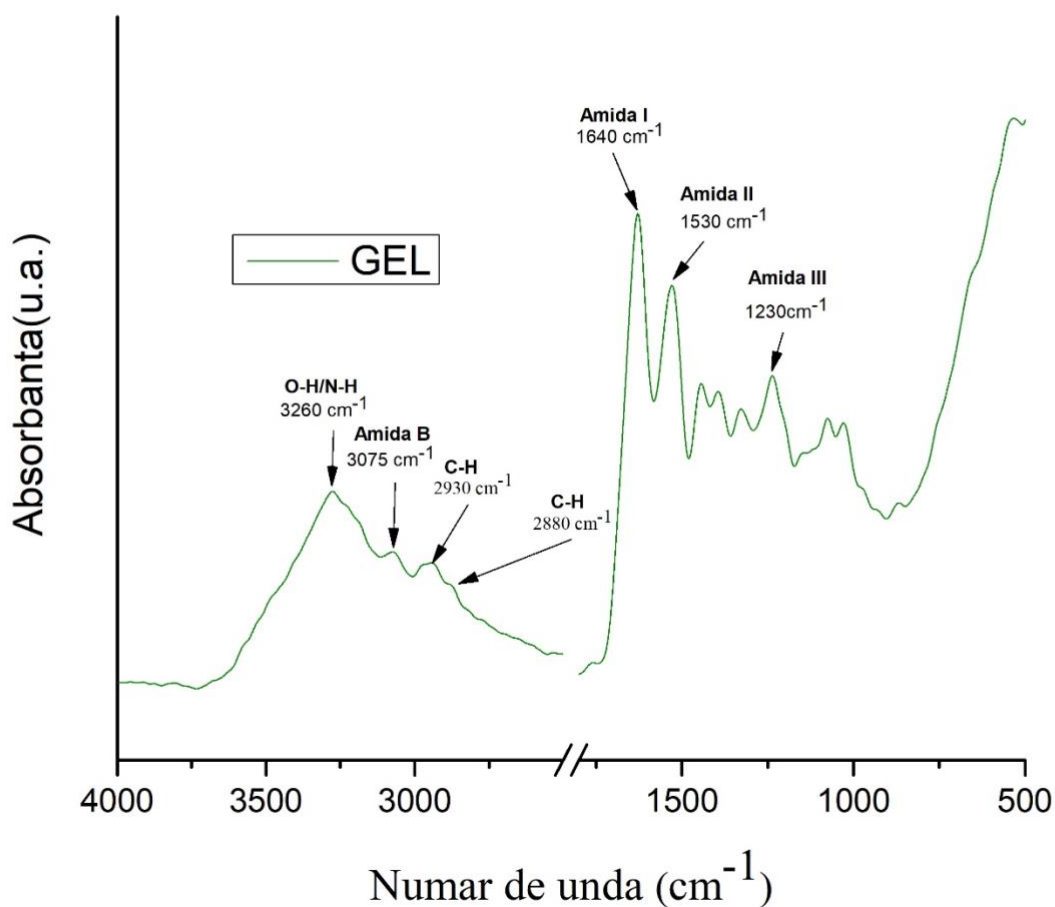


Figura II.2.10. Spectrul ATR-FTIR al gelatinei

În figura II.2.10. este prezentat spectrul gelatinei. Se pot observa benzile specifice acestora de la 1640 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} și 1230 cm^{-1} ce corespund amidei I, amidei II și amidei III. Amida I este generată de vibrația de întindere a legăturii $\text{C}=\text{O}$. Amida II este atribuită combinării vibrației de deformare N-H și vibrației de întindere C-N . Amida III este asociată cu vibrațiile legăturilor C-N și N-H . Se observă și prezența O-H/N-H la 3260 cm^{-1} , amidei B la 3075 cm^{-1} și a C-H la 2930 cm^{-1} , respectiv 2880 cm^{-1} [42].

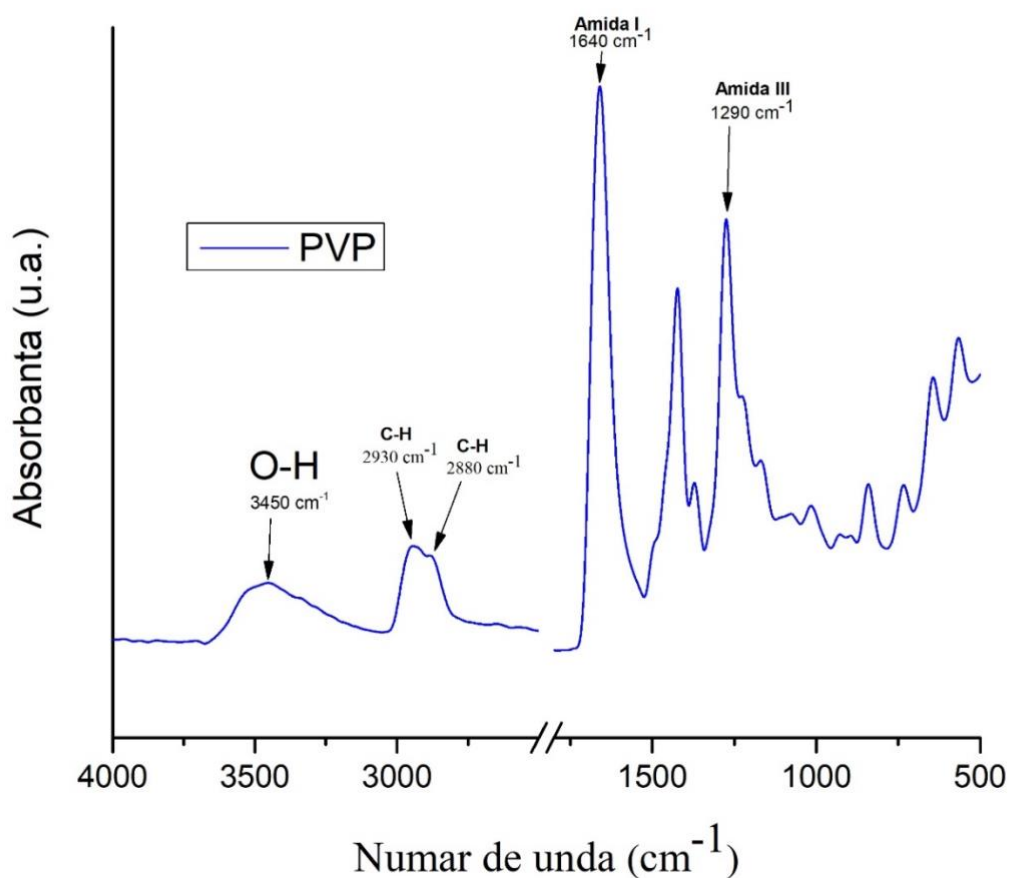


Figura II.2.11. Spectrul ATR-FTIR al polivinilpirolidonei

În figura II.2.11. este reprezentat spectrul polivinilpirolidonei. Se observă o bandă largă la 3450 cm^{-1} atribuită vibrațiilor de întindere O-H, benzi la 2930 cm^{-1} și 2880 cm^{-1} specifice vibrațiilor C-H și benzi specifice vibrației de întindere C=O și vibrației de întindere C-N la 1640 cm^{-1} și 1290 cm^{-1} [42].

Tabelul II.2.3. Comparația benzilor materialelor obținute

Proba	OH-NH, cm^{-1}	Amida B, cm^{-1}	C-H, cm^{-1}	Amida I, cm^{-1}	Amida II, cm^{-1}	Amida III, cm^{-1}
D1	3260	3075	2930, 2880	1640	1530	1230
D2	3260	3075	2930, 2880	1640	1530	1270
D3	3275	3075	2930, 2880	1640	1540	1230
D4	3275	3075	2930, 2880	1640	1540	1230
Gelatină	3260	3075	2930, 2880	1640	1530	1230
PVP	3450	-	2930, 2880	1640	-	1290

II.2.2.2. MicroCT

În anul 1957, Allan Cormack a dezvoltat metodele necesare de calcul pentru reconstrucția imaginilor interne ale corpului pe baza datelor obținute prin transmiterea razelor X din unghiuri multiple. [44]. În anii 1960, Godfrey Hounsfield a dezvoltat un sistem funcțional care utiliza fascicule multiple de raze X și algoritmi de reconstrucție pentru a obține modele tridimensionale ale structurilor interne [45]. Tomografia computerizată microscopică a apărut pentru prima dată la începutul anilor 1980. Dezvoltarea algoritmului de reconstrucție pentru fascicul conic propus de Feldkamp a permis extinderea și eficientizarea utilizării sistemelor micro-CT în laborator [46].

Componentele unui micro-CT sunt sursa de raze X, detectorul de raze X, sistemul de rotație al probei, sistemul de achiziție al datelor și software-ul de reconstrucție. În funcție de puterea radiației emise, dimensiunea punctului focal, tipului de filament sau geometriei fasciculului, sursele de raze X variază, aceste caracteristici având efect asupra calității imaginilor obținute [46]. Cu ajutorul sursei de raze X și detectorului se obțin imaginile 2D care pot fi combinate pentru a obține o imagine 3D.

Razele X sunt generate de tubul cu raze X care folosește un fascicul de electroni accelerați printr-o tensiune, focalizați pe un suport metalic (tungsten). Razele X sunt generate prin interacțiunea dintre suport și electroni. Aceste raze sunt direcționate prin probă și colectate pe un detector de raze X, sub forma unei imagini 2D, numită și imagine de proiecție. Fiecare voxel (pixel volumetric) este reconstruit pe baza proiecțiilor 2D obținute din multiple unghiuri, iar combinarea acestor perspective permite obținerea unei imagini care reflectă densitatea reală la raze X și intensitatea luminoasă [47].

Pentru a realiza procedura micro-CT, proba trebuie pregătită și montată și scannerul trebuie să fie configurat și parametrii trebuie să fie selectați. Apoi se vor realiza scanarea, reconstrucția imaginilor și vizualizarea acestora.

Echipamentul de înaltă rezoluție Bruker SkyScan μ CT 1272 a fost utilizat pentru a realiza analiza de micro-tomografie computerizată. Probele uscate au fost plasate pe suport și fixate cu ceară dentară pentru a caracteriza morfostructural materialele. Scanarea a fost realizată prin rotirea materialului în fața sursei (curent 130 μ A, tensiune 50 kV) la 190° cu un increment de rotație de 0,2°, fiecare cadru a fost generat prin medierea a trei proiecții individuale, fiecare având un timp de expunere de 300 ms. Acest proces a fost realizat la temperatura camerei. Pentru toate probele s-a folosit o rezoluție de scanare de 12 μ m (dimensiunea pixelului).

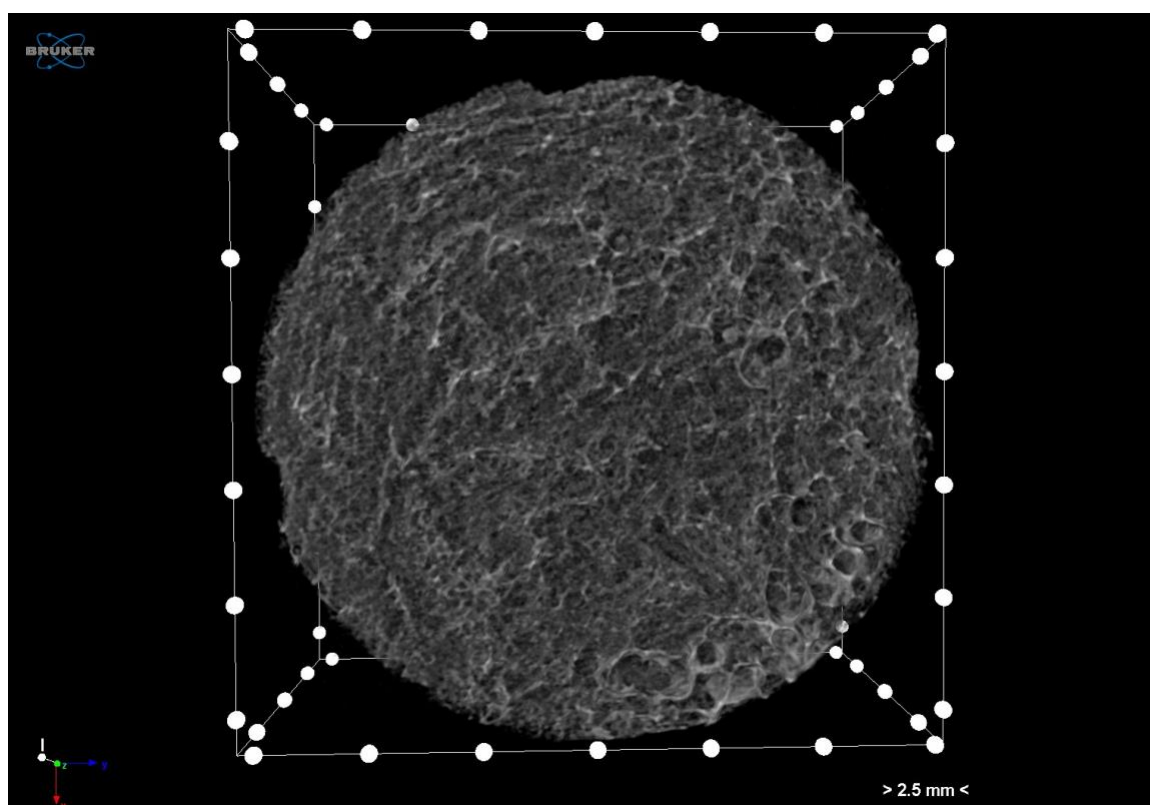


Figura II.2.12 Vederea de sus a probei D1

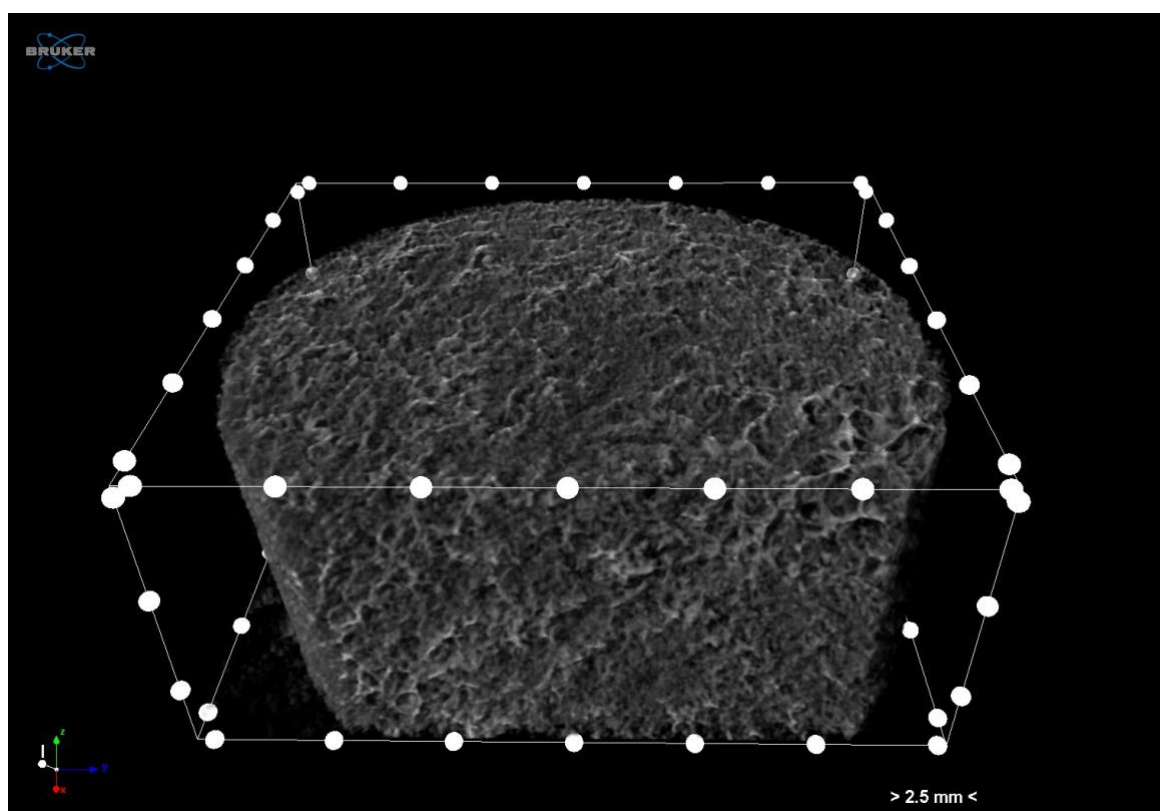


Figura II.2.13 Vederea din lateral a probei D1

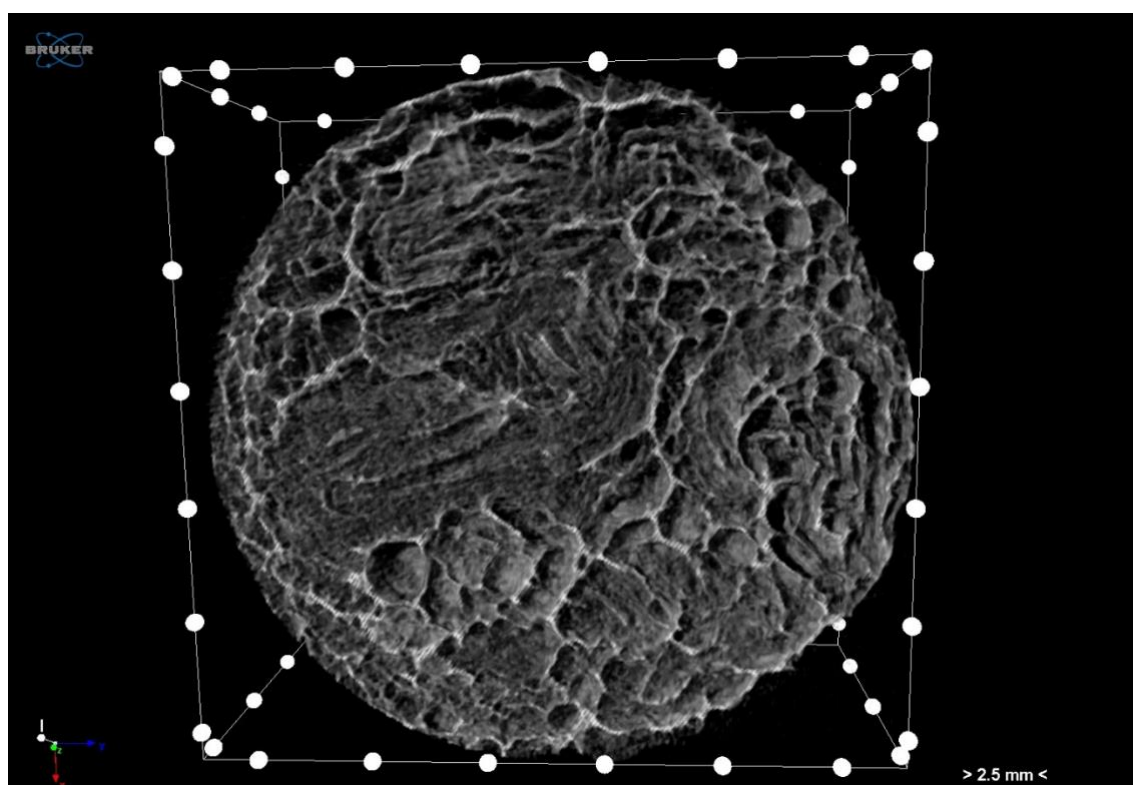


Figura II.2.14 Vederea de sus a probei D2

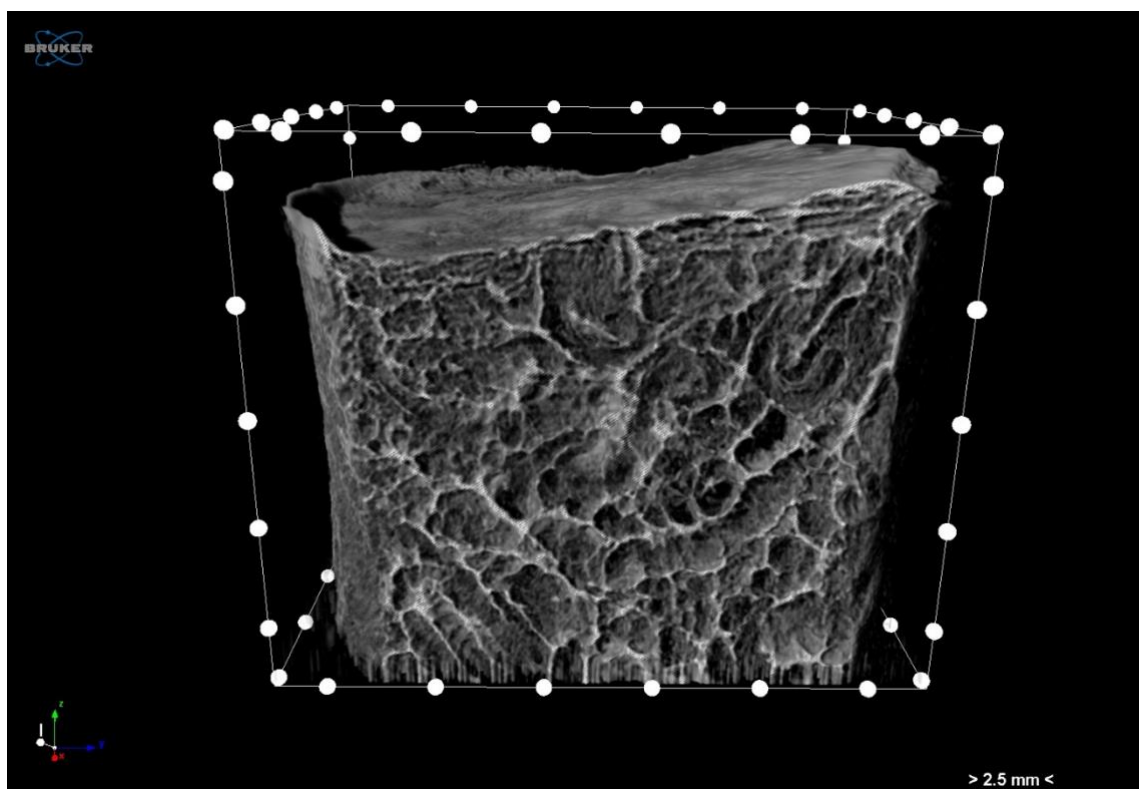


Figura II.2.15 Vederea din lateral a probei D2

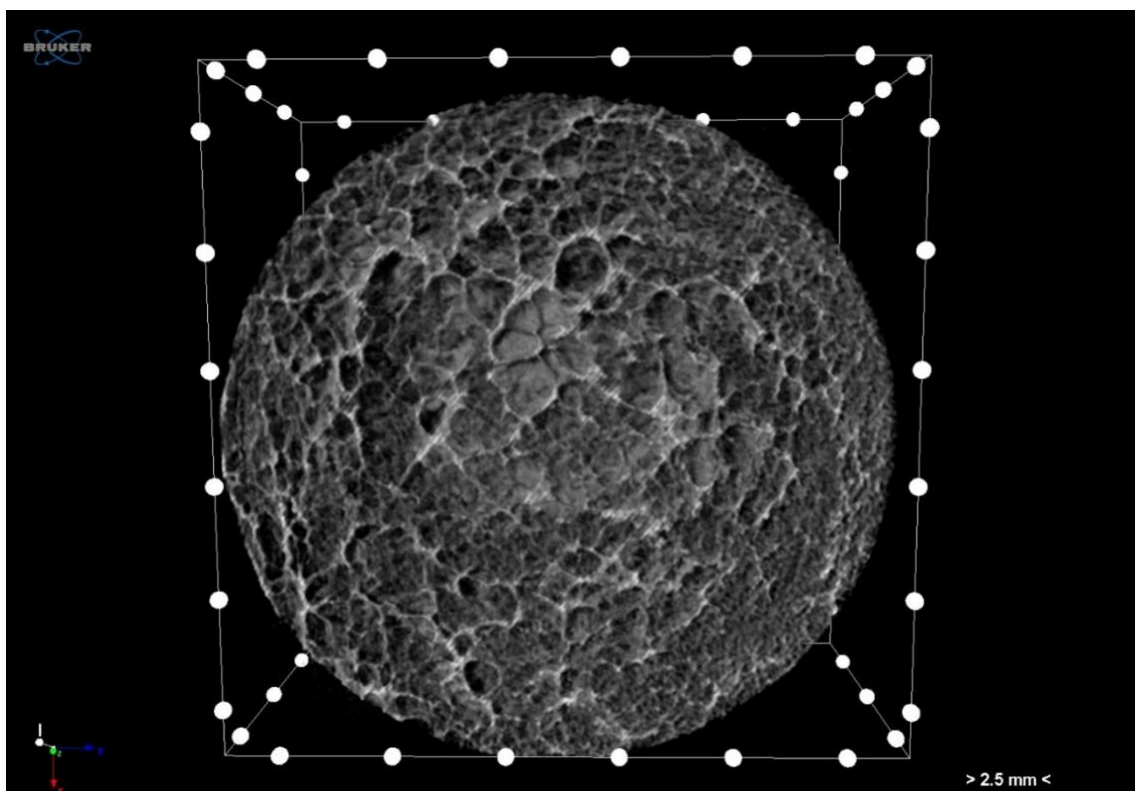


Figura II.2.16 Vederea de sus a probei D3

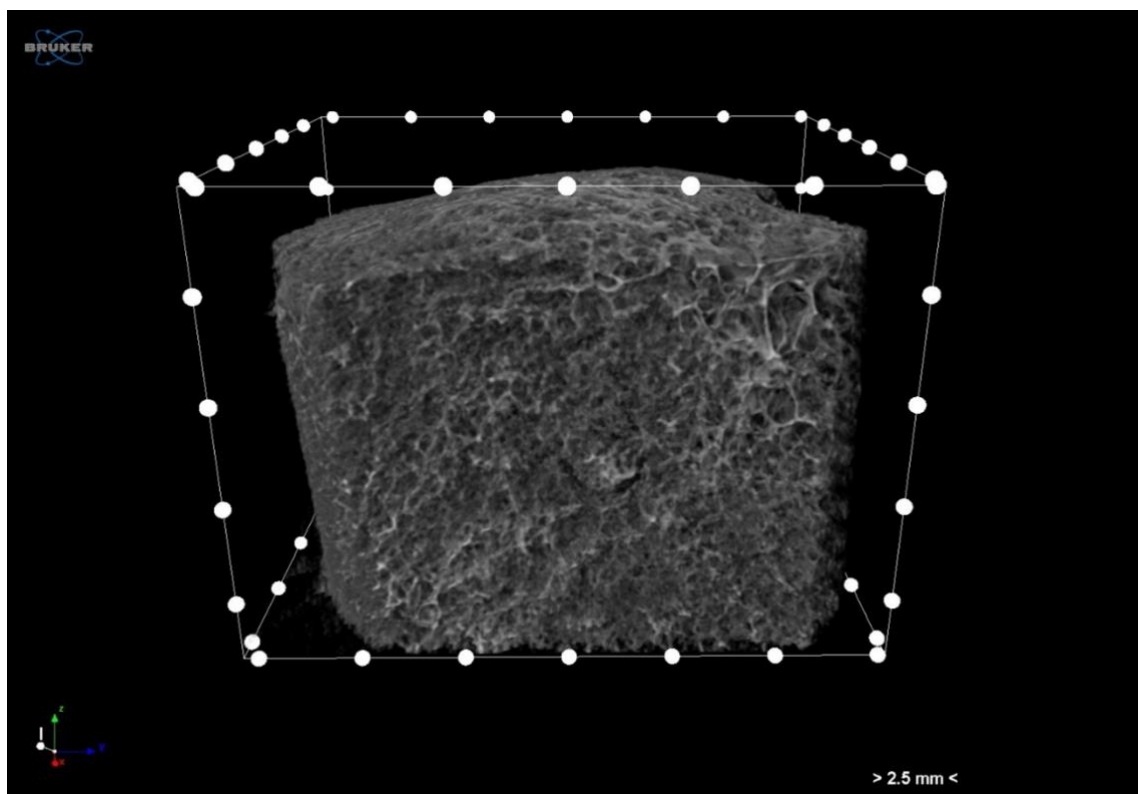


Figura II.2.17 Vederea din lateral a probei D3

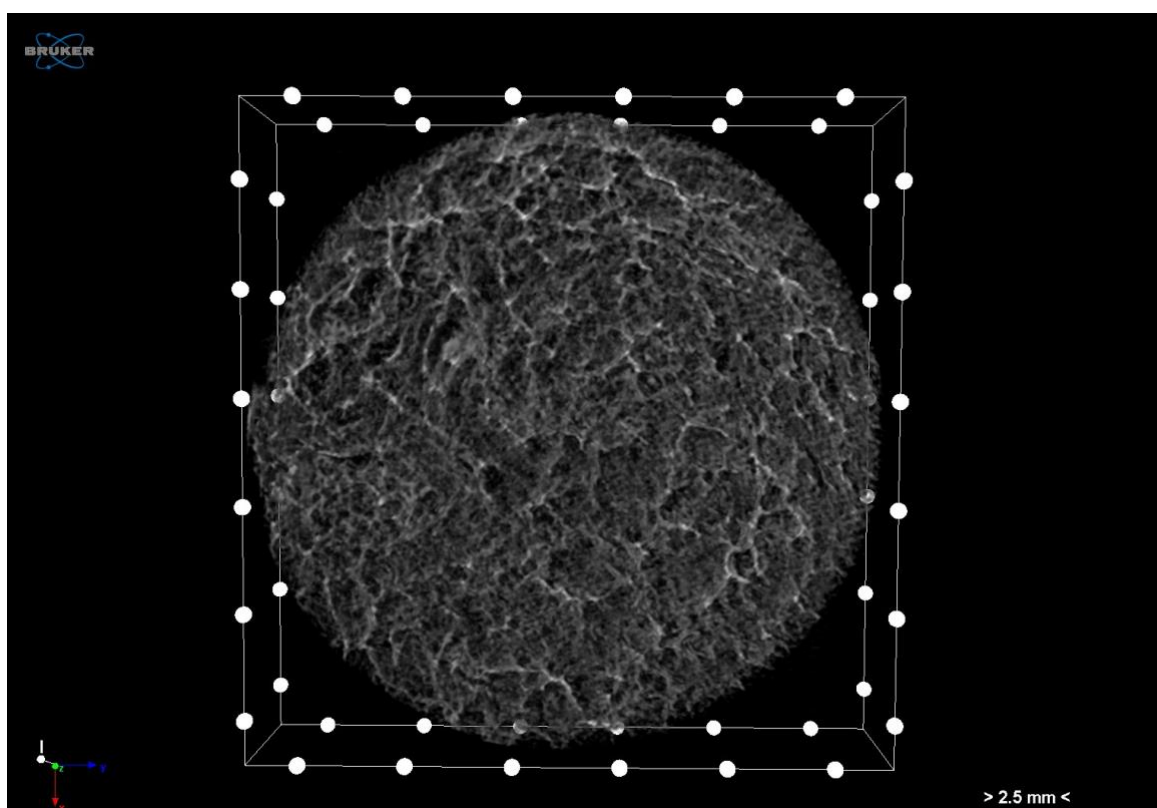


Figura II.2.18 Vederea de sus a probei D4

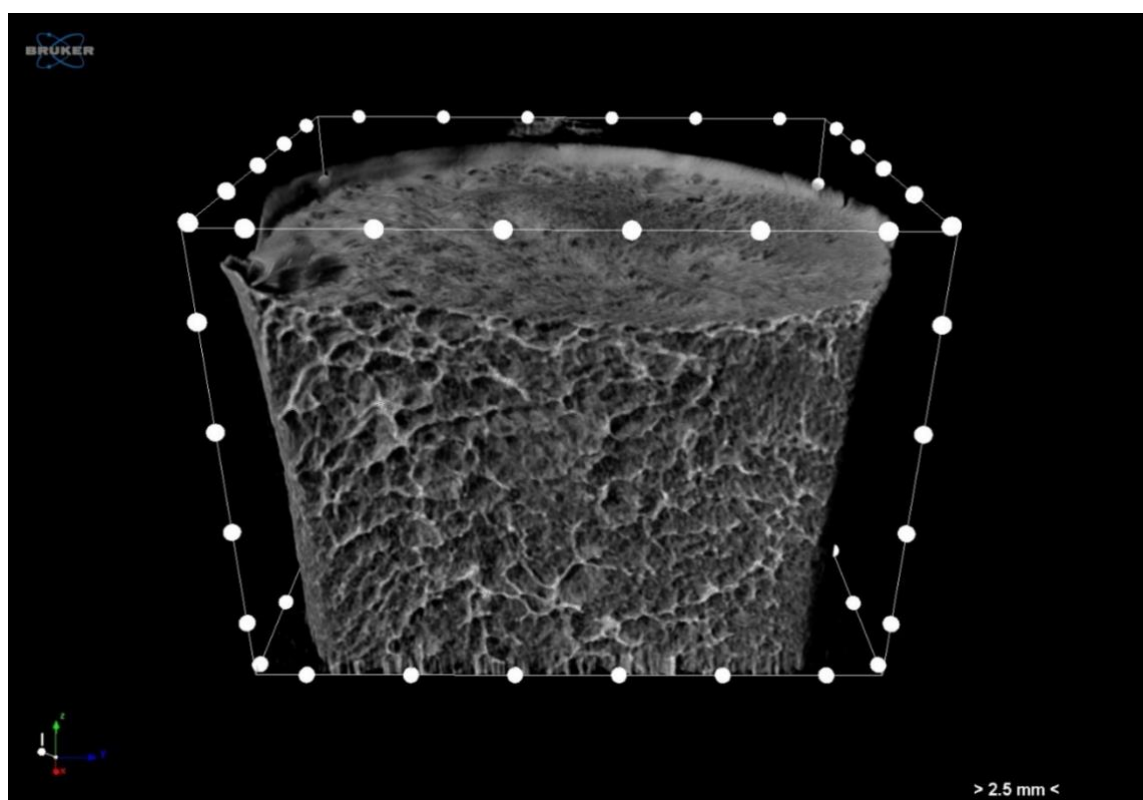


Figura II.2.19 Vederea din lateral a probei D4

În urma analizei imaginilor putem observa structura materialelor care diferă prin cantitățile de gelatină și doxiciclină folosite. Porozitatea este proprietatea afectată direct de aceste modificări, aceasta fiind diferită pentru cele patru probe.

Proba D3 este prezentată în Figura II.2.16 și Figura II.2.17. Aceasta prezintă cea mai mică porozitate, structura acesteia fiind densă, cu pori mici care nu sunt interconectați. Această probă conține o cantitate de 10% gelatină și 0,4% doxiciclină, componentele favorizând formarea unei rețele moleculare strânse, reducând spațiul disponibil pentru formarea porilor.

Proba D1 prezintă o porozitate mai mare decât D3, dar tot redusă. Aceasta se poate observa în Figura II.2.12 și Figura II.2.13. Aceasta conține aceeași cantitate de gelatină, dar o cantitate mai mică de doxiciclină, respectiv 0,2%. Structura rămâne totuși relativ compactă, cu pori mici și izolați din cauza cantității mici de gelatină care limitează volumul apei din rețea.

Proba D4 prezintă o porozitate ridicată, conținutul de gelatină fiind mai mare decât în cazul probelor D1 și D3. Proba D4 este prezentată în Figura II.2.18 și Figura II.2.19. Această modificare este datorată cantității mai mari de gelatină. Porii sunt de dimensiuni mai mari și sunt interconectați.

Proba ce prezintă cea mai mare porozitate este proba D2, prezentată în Figura II.2.14 și Figura II.2.15. Aceasta conține cantitatea cea mai mare de gelatină și cea mai mică de doxiciclină. Porii acestei probe sunt mari și interconectați, dar cu dimensiuni mai mici decât în cazul probei D2.

Probele D1 și D3 prezintă cele mai mici porozități și cele mai mici cantități de gelatină. Astfel, se observă efectul compoziției asupra proprietății materialelor obținute. Proba D3 conține o cantitate mai mare de doxiciclină, aceasta favorizând interacțiunile cu lanțurile de gelatină. Mai mult, prezența acesteia determină un conținut mai redus de apă reținută în rețea, ceea ce duce la o porozitate mai mică.

Probele D2 și D4 prezintă cele mai mari porozități, datorate cantității mărite de gelatină. Datorită acesteia, materialul reține mai multă apă care în urma liofilizării va duce la formarea unei porozități mai mari. Proba D2 care conține o cantitatea mai mică de doxiciclină decât D4 prezintă o porozitate mai mare decât aceasta (tabel II.2.4.).

Tabelul II.2.4. Influența concentrațiilor asupra porozității

Proba	Porozitate	Structură pori
D1	Scăzută	Mici Izolați
D2	Ridică	Mari Interconectați

D3	Scăzută	Mici Izolați
D4	Ridicată	Mari Interconectați

II.2.2.3. Teste gonflare

Gonflarea reprezintă capacitatea materialului de a absorbi lichid și de a-și mări volumul, menținându-și forma. Gradul de gonflare reflectă indirect porozitatea, structurile cu pori interconectați absorbând mai multă apă. Acestea oferă informații și despre capacitatea unui material de a menține forma și a nu se degrada (figura II.2.20).



Figura II.2.20 Probele în urma gonflării

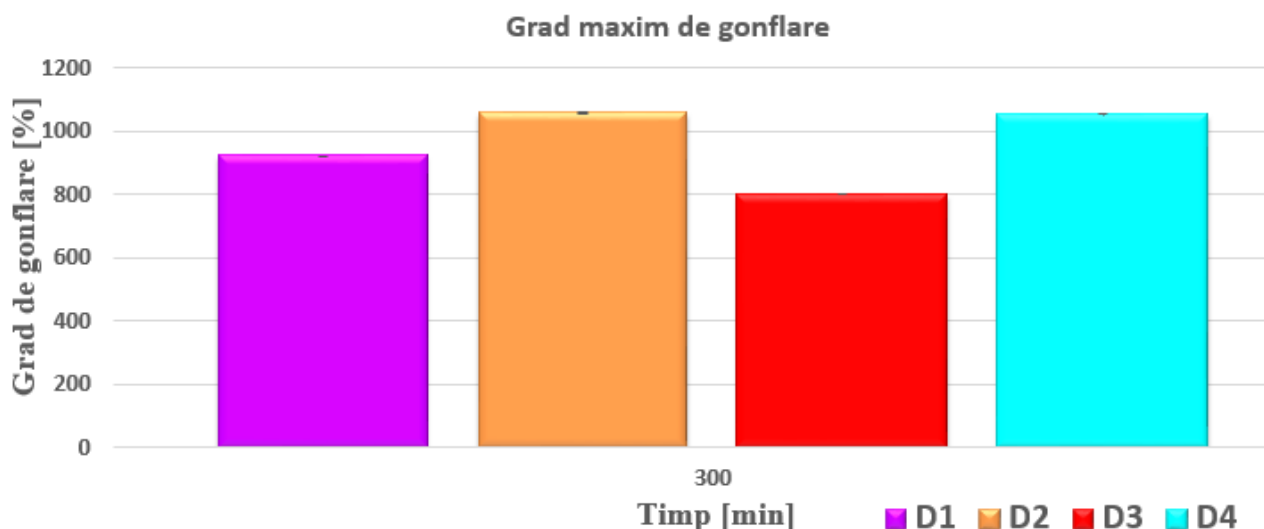


Figura II.2.21 Gradul maxim de gonflare

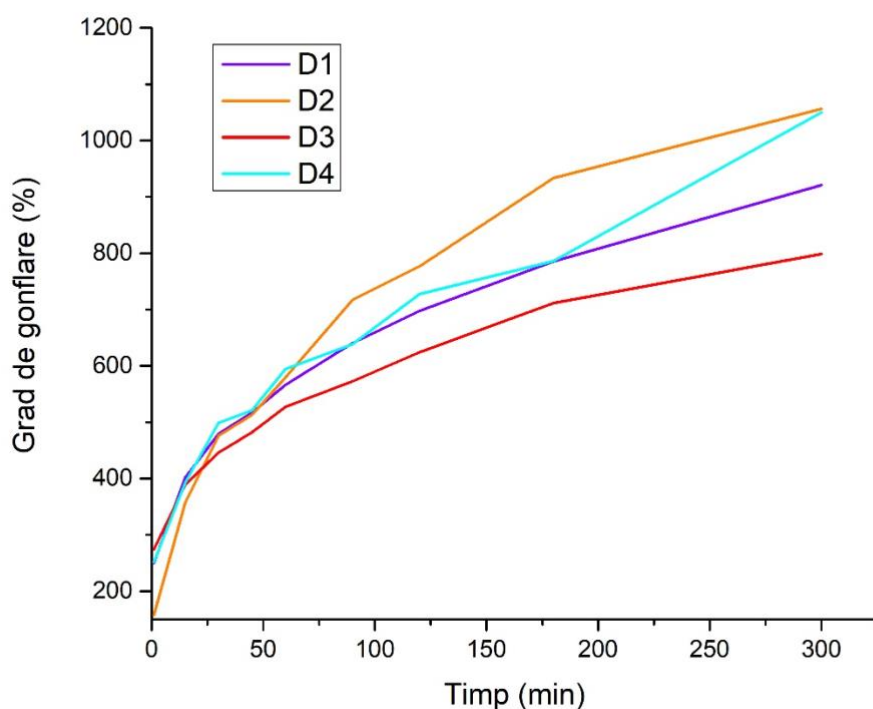


Figura II.2.22 Evoluția gonflării în timp

În figurile II.2.21 și II.2.22 sunt evidențiate valorile maxime atinse ale gonflării și evoluția în timp a acestora de la contactul inițial până la 5h. Astfel, în urma analizei Figurii II.2.21 se evidențiază efectul pozitiv al creșterii nivelului de gelatină și efectul negativ al creșterii nivelului de doxiciclină asupra gonflării probelor. Rețelele mai poroase D2 și D4 rețin mai multă apă decât D1 și D3.

Pentru calcularea gradului de gonflare, probele au fost cântărite înainte de a intra în contact cu lichidul, apoi cântărite periodic pentru a afla evoluția probelor la perioade stabilite de timp. Valorile obținute au fost folosite pentru a determina gradul de gonflare, folosind formula:

Ecuția II.2.2. Gradul de gonflare

$$GG(\%) = 100 \cdot \frac{m_t - m_0}{m_0}$$

unde GG reprezintă gradul de gonflare, m_t reprezintă masa probei gonflate la timpul t , iar m_0 reprezintă masa înainte contactului cu lichidul.

În urma analizei Figurii II.2.22 se observă faptul că D2 prezintă cea mai rapidă și mare capacitate de absorbție a apei, atingând cel mai ridicat grad de gonflare (1055%). Acestea sunt corelate cu conținutul ridicat de gelatină (15%) și cantitatea redusă de doxiciclină (0,2%), ceea ce permite formarea unei rețele hidratate și flexibile. Deși conține aceeași cantitate de doxiciclină, D4 conține 0,4% doxiciclină care poate acționa cu rețeaua și reduce capacitatea de absorbție. Gradul de gonflare rămâne ridicat, ceea ce indică porozitatea ridicată a probei. D1 are o capacitate mai mică de absorbție decât cele 2 probe, datorită cantității scăzute de gelatină. D3 prezintă cea mai mică capacitate de absorbție (798%) datorită nivelului scăzut de gelatină și nivelului crescut de doxiciclină. Aceste probe prezintă cele mai mici porozități datorită accesului limitat al apei de a pătrunde proba.

Tabelul II.2.5 Influența compoziției asupra gonflării

Proba	Grad de gonflare, %	Porozitate	Observații
D1	920	Scăzută	Grad de gonflare mai mare decât D3 datorită % de doxiciclină scăzut
D2	1055	Ridică	Cel mai ridicat grad de gonflare datorită % mare de gelatină și % mic de doxiciclină
D3	798	Scăzută	Cel mai mic grad de gonflare datorat % de gelatină scăzut și % de doxiciclină ridicat
D4	1050	Ridică	Grad de gonflare mai mare decât D1 și D3 datorită % de gelatină ridicat

II.2.2.4. Teste de stabilitate

Testele de stabilitate sunt teste care măsoară capacitatea unui material de a-și menține proprietățile fizice sau chimice după expunerea la factori externi (umiditate, temperatură, lichide). Probele au fost scufundate în fluid simulat și păstrate în etuva la 37 °C. Masa probei a fost măsurată înainte și după 14 zile de incubare în etuvă. Formula folosită pentru aflarea stabilității este:

Ecuția II.2.3. Stabilitatea

$$S(\%) = 100 \cdot \frac{m_0 - m_{14}}{m_0}$$

unde S reprezintă stabilitatea probei, m_0 reprezintă masa probei uscate, iar m_{14} reprezintă masa rămasă după 14 zile.

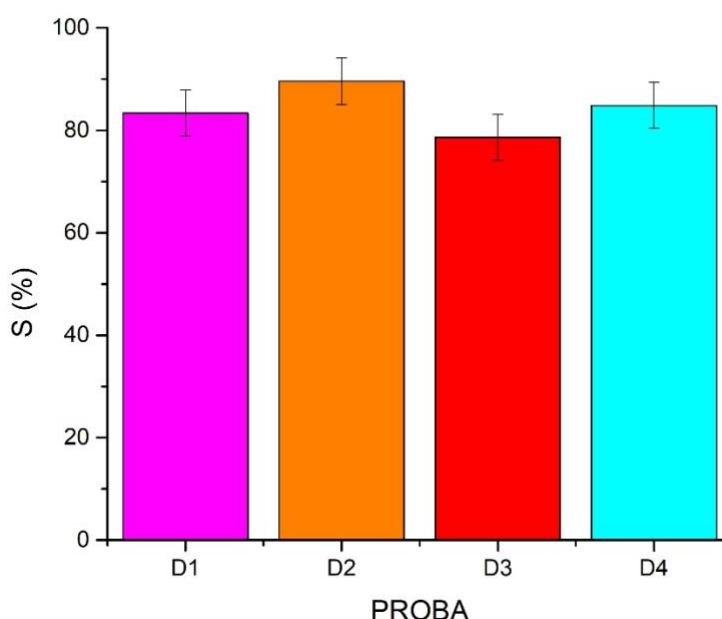


Figura II.2.23 Stabilitatea probelor

Acest test arată dacă materialul își păstrează forma după o incubare în condiții fiziologice simulate pe o perioadă de 14 zile. Un material stabil nu își va pierde masa semnificativ, nu se va fragmenta și nu se va fisura. Acesta va mai indica faptul că materialul poate fi folosit în medii biologice fără a se deteriora sau dacă deteriorarea este proprietatea dorită, atunci se urmărește cantitatea de material pierdută.

Testul de stabilitate este relevant pentru a evalua dacă un scaffold poate funcționa eficient și sigur în condițiile reale, fie în mediu biologic, fie în stocare sau manipulare clinică.

În figura II.2.23 este prezentată stabilitatea probelor D1-D4 după o perioadă de incubare în etuvă de 14 zile. D2 prezintă cea mai bună rezistență la degradare, păstrând 89% din masa inițială. După aceasta, proba cu cea mai mare stabilitate este D4 care păstrează 84% din masa inițială. Proba D1 va păstra 83% din masa inițială, iar D3 păstrează 78% din aceasta. În urma analizei acestor rezultate putem concluziona faptul că o cantitate ridicată de gelatină va oferi o stabilitate mai mare și o cantitate mai mare de doxiciclină oferă o stabilitate mai scăzută după cum se observă între probele D1 și D2 (tabel II.2.6.). Mai mult, probele cu porozitate mai mare au prezentat o stabilitate mai mare decât cele cu o structură compactă.

Tabelul II.2.6 Influența compoziției asupra stabilității

Proba	Stabilitate, %	Fragmentare	Modificări de culoare
D1	84	Nu	Nu
D2	82	Nu	Transparent
D3	78	Nu	Nu
D4	88	Nu	Nu

II.2.2.5. Teste antimicrobiene

Pentru testarea activității antimicrobiene s-au utilizat două tipuri de bacterii de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (bacterie gram-pozitivă) și *Escherichia coli* ATCC 10536 (bacterie gram-negativă). Culturile folosite au fost proaspăt repicate. Sterilizarea materialelor din laborator a fost realizată prin metoda uscată (la etuvă la 180 °C) sau prin metoda umedă (autoclavarea).

Pentru realizarea stratului inferior s-a preparat geloză sterilă fără bacterii. Din aceasta s-au distribuit câte $10 \pm 0,1$ mL în fiecare vas Petri, iar mediul a fost lăsat să se solidifice. Geloza a fost răcită până la 45 °C într-o baie de apă pentru a forma stratul superior. În 150 mL de geloză s-au adăugat 1 mL de suspensie bacteriană care conține $1-5 \times 10^8$ ufc/mL. Amestecul a fost agitat energic. Pentru asigurarea unei distribuții uniforme, amestecul a fost agitat energic. Din această compoziție s-au distribuit câte $5 \pm 0,1$ mL în fiecare vas Petri peste stratul deja solidificat. Probele au fost plasate la suprafața mediului nutritiv și toate vasele au fost incubate la 37 °C timp de 18-24 ore.

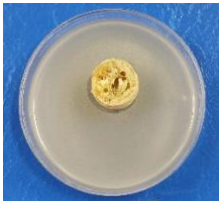
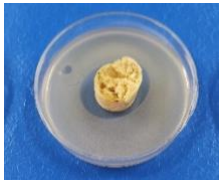

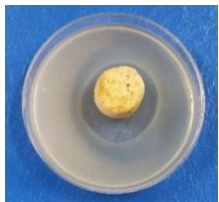
Pentru a evalua rezultatele s-a observat prezența sau absența unei zone de inhibiție bacteriană în jurul probelor. Dacă înmulțirea bacteriilor în zona de contact dintre probă și geloză nu a fost observată, a fost indicată existența unei activități antimicrobiene. În cazul în care a apărut o zonă clară de inhibiție, s-a măsurat lățimea zonei dintre marginea probei și frontul de creștere bacteriană. Valoarea măsurată a fost utilizată pentru calculul indicelui de inhibiție, conform formulei standard:

Ecuția II.2.4. Indicele de inhibiție

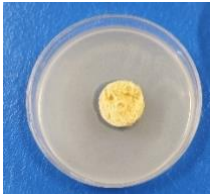
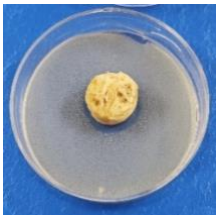
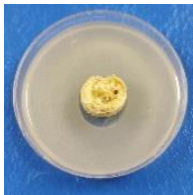
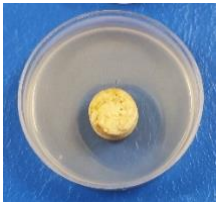
$$H = \frac{D - d}{2}$$

, unde H este zona de inhibiție, D este diametrul total al probei și al zonei de inhibiție, iar d este diametrul probei.

Tabel II.2.7 Efectul tratamentului cu *Saphylococcus aureus*

Nr. Probă	Zona de inhibiție (mm) <i>Saphylococcus aureus</i>	Descriere <i>Saphylococcus aureus</i>	Evaluare <i>Saphylococcus aureus</i>
D1 	$0-1$ $H = \frac{16-15}{2}$ $H = 0,5$ (mm)	Zona de inhibiție mai mare de 1 mm, fără nici o înmulțire	Efect satisfăcător
D2 	>1 $H = \frac{20-15}{2}$ $H = 2,5$ (mm)	Zona de inhibiție mai mare de 1 mm, fără nici o înmulțire	Efect satisfăcător
D3 	>1 $H = \frac{19-15}{2}$ $H = 1,5$ (mm)	Zona de inhibiție mai mare de 1 mm, fără nici o înmulțire	Efect satisfăcător
D4 	>1 $H = \frac{23-15}{2}$ $H = 4$ (mm)	Zona de inhibiție de 1 mm, nici o înmulțire	Efect satisfăcător

Tabelul II.2.8 Efectul tratamentului cu *Escherichia coli*

Nr. Probă	Zona de inhibiție (mm) <i>Escherichia coli</i>	Descriere <i>Escherichia coli</i>	Evaluare <i>Escherichia coli</i>
D1 	0-1 $H = \frac{17-15}{2}$ H= 1 (mm)	Zona de inhibiție de 1 mm, nici o înmulțire	Efect satisfăcător
D2 	0-1 $H = \frac{17-15}{2}$ H= 1 (mm)	Zona de inhibiție de 1 mm, nici o înmulțire	Efect satisfăcător
D3 	>1 $H = \frac{20-15}{2}$ H= 2,5 (mm)	Zona de inhibiție mai mare de 1 mm, fără nici o înmulțire	Efect satisfăcător
D4 	>1 $H = \frac{17-15}{2}$ H= 7,5 (mm)	Zona de inhibiție mai mare de 1 mm, fără nici o înmulțire	Efect satisfăcător

Probele au fost evaluate din punct de vedere al activității antimicrobiene utilizând metoda difuziunii pe mediu gelozat, fiind testate împotriva a două tulpini bacteriene de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (bacterie gram-pozitivă) și *Escherichia coli* ATCC 10536 (bacterie gram-negativă).

Rezultatul a fost considerat satisfăcător atunci când nu s-a observat creștere bacteriană în jurul probei testate. Chiar și în absența unei zone clare de inhibiție se poate interpreta un efect pozitiv, întrucât o astfel de zonă poate lipsi în cazul în care substanța activă are o capacitate redusă de difuziune prin mediu, fără a compromite eficacitatea sa locală.

Diferențele observate în gradul de inhibiție între cele două tipuri de bacterii pot fi atribuite variațiilor structurale ale peretelui celular, care influențează sensibilitatea bacteriilor la agenții antimicrobieni.

II.2.2.6. Testări celulare

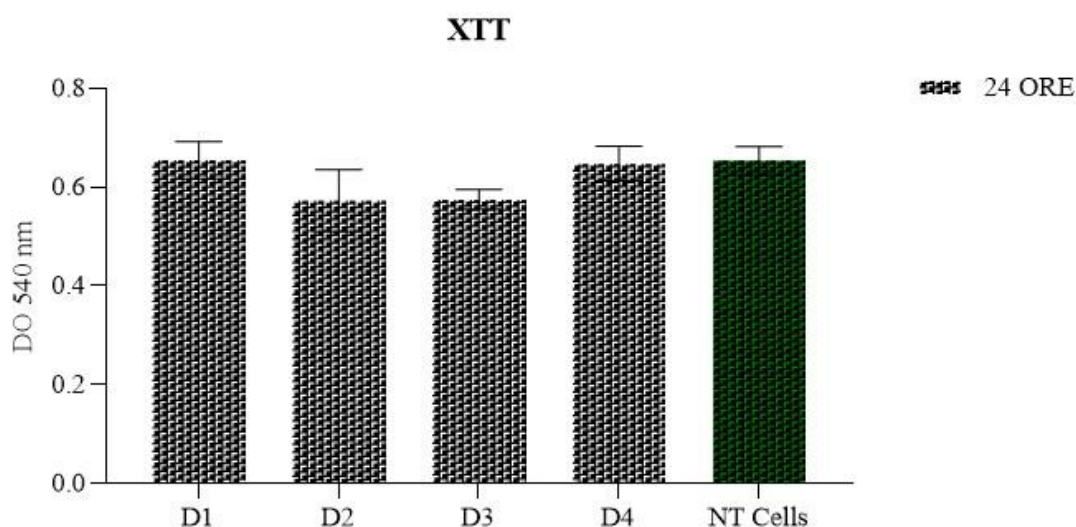
Pentru a evalua gradul de biocompatibilitate celulară a hidrogelurilor liofilizate din gelatină-pvp-doxiciclină s-au realizat teste de viabilitate celulară XTT și LDH.

Pe o linie celulară de fibroblaste umane stimulate cu factor de creștere epidermal (EGF-1) a fost evaluată biocompatibilitatea. Fibroblastele au fost cultivate în mediu de cultură Fibroblast completat cu 10% ser fetal bovin (FBS) și 1% antibiotic-antimicotic din penicilină și streptomycină. La o densitate de $1,5 \times 10^4$ celule/godeu, în 500 μ L de mediu de cultură, celulele au fost însămânțate într-o placă cu 24 godeuri. Acestea au fost incubate la 37 °C, într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂, timp de 24 de ore, în prezența biomaterialelor investigate.

Prin testul XTT a fost evaluată viabilitatea celulară, aceasta reprezentând o metodă colorimetrică de cuantificare a celulelor metabolice active. Reacția se bazează pe reducerea compusului XTT – 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid – de către enzimele mitocondriale ale celulelor viabile în prezența unui cofactor intermediar (fenazin-metosulfat, PMS). În urma reacției a rezultat un produs colorat (formazan) solubil în mediu apos.

Mediul de cultură rezidual a fost eliminat, iar suprafața celulelor a fost spălată cu PBS pentru îndepărtarea serului fetal bovin, care ar putea interfera cu reacția. S-au adăugat în fiecare godeu câte 250 μ L soluție XTT, concentrația finală a soluției XTT fiind de 0,3 mg/mL. Timp de 24 de ore, probele au fost incubate la o temperatură de 37°C și 5% CO₂. La finalul incubării, soluția obținută de culoare portocaliu-brun, culoare care diferă în funcție de intensitatea reacției, a fost transferată într-o placă de 96 de godeuri și citită cu un spectrofotometru Tecan la 540 nm. Intensitatea absorbției este direct proporțională cu numărul de celule viabile prezente în probă.

Testul LDH a fost utilizat pentru a determina citotoxicitatea materialelor. Acesta fost realizat prin măsurarea eliberării enzimei LDH din celulele deteriorate. Probele au fost incubate timp de 24 de ore cu fibroblaste într-o placă cu 24 godeuri și spălate cu PBS după îndepărtarea mediului de cultură. După spălare, peste acestea s-a adăugat soluția reactivă conform protocolului din kitul comercial utilizat. Culoarea soluției s-a intensificat spre roșu-vișiniu după 30 de minute de incubare la 37°C și 5% CO₂. Culoarea este proporțională cu cantitatea de LDH eliberat. Absorbția a fost măsurată la 492 nm cu ajutorul unui spectrofotometru de tip ELISA reader.

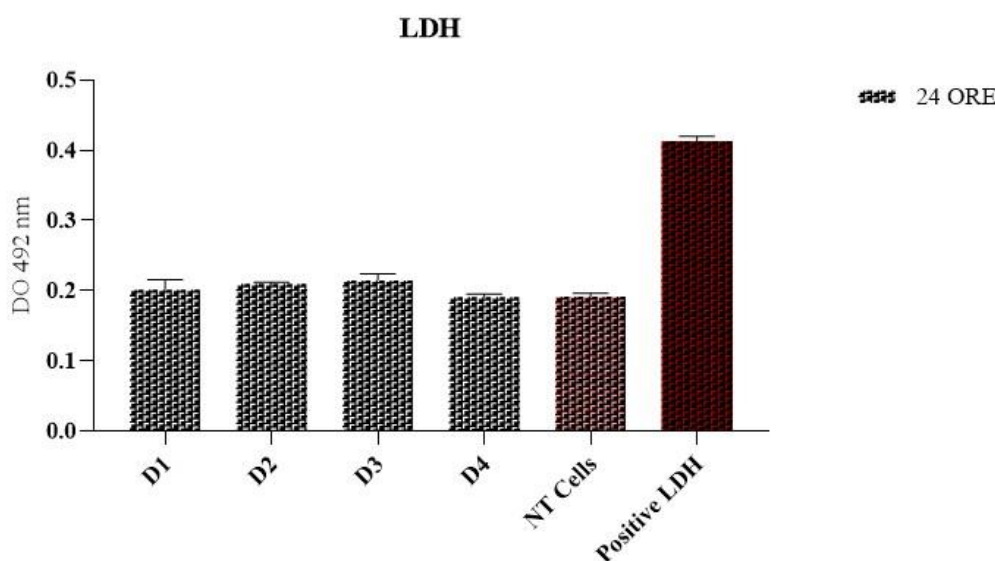


PROBA	% BIOCOMPATIBILITATE
D1	100.61 ± 10.17
D2	87.42 ± 5.76
D3	88.06 ± 0.71
D4	99.52 ± 9.68

Figura II.2.24 Biocompatibilitatea probelor

În urma analizei Figurii II.2.24 s-a observat faptul că toate probele prezintă un grad ridicat de biocompatibilitate ($> 85\%$), D1 și D4 având valori aproape identice cu martorul negativ (celulele netratate).

Testele *in vitro* de citotoxicitate reprezintă o ideală soluție de substituie a testelor de toxicitate *in vivo* (teste care utilizează un model animal). Evoluția posibilelor acțiuni toxice pe care acestea le pot exercita asupra unui țesut țintă sunt demonstrate prin utilizarea culturilor de celule specializate și specifice pentru aplicația finală a produsului testat.



PROBA	% CITOTOXICITATE
D1	5.28 ± 0.96
D2	8.40 ± 2.88
D3	10.64 ± 1.50
D4	0.59 ± 0.22

Figura II.2.25 Citotoxicitatea probelor

Citotoxicitatea este scăzută pentru toate probele, aceasta fiind sub 11%, D4 prezentând cel mai mic nivel de citotoxicitate. Acestea indică faptul că acest material, aproape inert biologic, nu prezintă risc de generare a unor reacții citotoxice la situsul de contact. D4 este cea mai promițătoare dintre toate probele pentru că prezintă biocompatibilitate ridicată și citotoxicitate minimă.

III. ANALIZĂ TEHNICO-ECONOMICĂ

Pentru obținerea materialului s-au folosit gelatină, polivinilpirolidonă, doxiciclină, apă ultrapură și glutaraldehydă. Au fost achiziționate 100 g de gelatină de tip B, un gram de doxiciclină și 500 mL de soluție de glutaraldehydă de pe Sigma-Aldrich și 500 g PVP de pe Fisher Scientific. Apa ultrapură a fost obținută în laborator folosind sistemul TRITON 12. Soluția finală a avut un volum de 50 mL. Soluția a fost turnată în 8 godeuri și un vas Petri. Gelatina de tip B a costat 81 €, doxiciclina 91,5 €, glutaraldehyda 258 €, iar PVP 162,15 €. Pentru realizarea unui volum de 150 mL apă ultrapură obținută cu ajutorul sistemului TRITON 12 s-au folosit aproximativ 500 mL apă. Aparatul va avea un consum de 0.15 Wh, ceea ce va duce la un cost mai mic de 0,01 €.

Cea mai potrivită probă cu scopul de a trata rănilor infectate este proba D2. Proba va avea un conținut de 7,5 g gelatină, 2,5 g PVP, 0,1g doxiciclină, 0,25 g glutaraldehydă și 40 mL apă ultrapură. Aceasta prezintă cea mai mare cantitate de a absorbi apa și cea mai mică pierdere de masă în urma acestui contact, permițând o eliberare a medicamentului pe o perioadă de timp îndelungată.

În tabelul III.1. sunt prezentate prețurile și cantitățile materialelor utilizate pentru obținerea hidrogelului.

Tabel III.1. Costuri materii prime utilizate

Proba	Materii prime	Cost pentru o probă	Masa folosită, g	Cost, €
D2	Gelatină	81 € per 100g	7,5	6,08
	PVP	162,15 € per 500 g	2,5	0,81
	Doxiciclină	91,5 € per g	0,1	9,15
	Glutaraldehydă	258 € per 500 g	0,25	0,13
	H ₂ O ultrapură	0,1 €	39,55	0,1
	COST MATERII PRIME PROBĂ D4			16,27

În tabelul III.2. este prezentat costul echipamentelor utilizate în obținerea hidrogelului și timpii de funcționare ai acestora. Prețul unui kWh este de 0,10 €.

Tabelul III.2. Consumul echipamentelor

Echipament	Consum, kWh	Timp de funcționare, min	Cost, €
Plită magnetică	1	30	0,03
Liofilizator	28,8	48	2,88
Cost total	2,91		



Pentru a realiza proba, costul de producție este de 19,18 €.

În prezent nu există materiale compuse din gelatină și polivinilpirolidonă pe piață, însă există materiale ce conțin câte un polimer. Un astfel de exemplu îl constituie gelatina metacrilată (GelMA). Aceasta poate fi găsită pe Sigma-Aldrich. Prețul unui gram de GelMa este de 357 € [48], fiind cu 337,82 € mai scump decât materialul obținut din gelatină și polivinilpirolidonă.

Un pansament realizat din polivinilpirolidonă, polietilenglicol (PEG) și agar este vândut de Stokmed la 2,83 € [49], fiind cu 16,35 € mai ieftin decât hidrogelul din gelatină și PVP.

CONCLUZII

Lucrarea a urmărit proiectarea și caracterizarea unor hidrogeluri cu potențiale aplicații în tratamentul rănilor infectate pe bază de gelatină și polivinilpirolidonă și încapsulate cu doxiciclină. Aceasta urmărește diferențele materialelor obținute în funcție de compoziția aleasă.

Prin utilizarea metodei alese, au fost obținute structuri poroase, omogene, capabile să absoarbă fluide și să se degradeze în timp, în funcție de compoziție. Testele au evidențiat o capacitate de gonflare mare și o degradare scăzută, iar prin testele antibacteriene a fost demonstrat faptul că doxiciclina inhibă dezvoltarea bacteriilor.

Aceste materiale reprezintă o alternativă în terapia locală a rănilor infectate prin proprietățile de stabilitate aduse de polivinilpirolidonă și a biocompatibilității și biodegradabilității aduse de gelatină. Aceasta poate reduce consumul în exces de antibiotice și favorizează regenerarea tisulară.

A fost arătată și importanța compoziției prin analiza micro-CT. Probele mai puțin poroase obținute conțin gelatină în concentrații mai mici, în timp ce probele cu porozitate ridicată prezintă o concentrație mai mare de gelatină în compoziție. Porozitatea a avut importanță în degradarea și gonflarea probelor, probele cu porozitate mai mare având o capacitate mai mare de gonflare și degradare.

În concluzie, rezultatele obținute confirmă potențialul acestui tip de hidrogel ca soluție eficientă în tratamentul rănilor infectate.

BIBLIOGRAFIE

1. Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A.M. An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management. *Polymers* **2022**, *14*, 421, doi:10.3390/polym14030421.
2. Zhang, X.; Shu, W.; Yu, Q.; Qu, W.; Wang, Y.; Li, R. Functional Biomaterials for Treatment of Chronic Wound. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 516, doi:10.3389/fbioe.2020.00516.
3. Marques, I.J.; Lupi, E.; Mercader, N. Model Systems for Regeneration: Zebrafish. *Development* **2019**, *146*, dev167692, doi:10.1242/dev.167692.
4. Kaiser, P.; Wächter, J.; Windbergs, M. Therapy of Infected Wounds: Overcoming Clinical Challenges by Advanced Drug Delivery Systems. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2021**, *11*, 1545–1567, doi:10.1007/s13346-021-00932-7.
5. Kaiser, P.; Wächter, J.; Windbergs, M. Therapy of Infected Wounds: Overcoming Clinical Challenges by Advanced Drug Delivery Systems. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2021**, *11*, 1545–1567, doi:10.1007/s13346-021-00932-7.
6. Yahia, Lh. History and Applications of Hydrogels. *J Biomed Sci* **2015**, *04*, doi:10.4172/2254-609X.100013.
7. Park, J.B.; Lakes, R.S. *Biomaterials*; SpringerLink Bücher; Springer Science+Business Media, LLC: New York, 2007; ISBN 978-0-387-37879-4.
8. Chong, E.T.J.; Ng, J.W.; Lee, P.-C. Classification and Medical Applications of Biomaterials—A Mini Review. *BIOI* **2023**, *4*, doi:10.15212/bioi-2022-0009.
9. Bartul, Z. *Advances in Nanotechnology. Volume 22*; Advances in Nanotechnology Ser; Nova Science Publishers, Incorporated: New York, 2019; ISBN 978-1-5361-5558-7.
10. Brokesh, A.M.; Gaharwar, A.K. Inorganic Biomaterials for Regenerative Medicine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 5319–5344, doi:10.1021/acsami.9b17801.
11. Rethi, L.; Mutalik, C.; Anurogo, D.; Lu, L.-S.; Chu, H.-Y.; Yougbaré, S.; Kuo, T.-R.; Cheng, T.-M.; Chen, F.-L. Lipid-Based Nanomaterials for Drug Delivery Systems in Breast Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 2948, doi:10.3390/nano12172948.
12. Bao Ha, T.L.; Minh, T.; Nguyen, D.; Minh, D. Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*; Andrades, J.A., Ed.; InTech, 2013 ISBN 978-953-51-1108-5.
13. Altman, G.H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R.L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D.L. Silk-Based Biomaterials. *Biomaterials* **2003**, *24*, 401–416, doi:10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
14. Hasanin, M.S. Cellulose-Based Biomaterials: Chemistry and Biomedical Applications. *Starch Stärke* **2022**, *74*, 2200060, doi:10.1002/star.202200060.
15. Mondal, D.; Griffith, M.; Venkatraman, S.S. Polycaprolactone-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Drug Delivery: Current Scenario and Challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2016**, *65*, 255–265, doi:10.1080/00914037.2015.1103241.
16. Narayanan, G.; Vernekar, V.N.; Kuyinu, E.L.; Laurencin, C.T. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *107*, 247–276, doi:10.1016/j.addr.2016.04.015.
17. Alizadeh-Osgouei, M.; Li, Y.; Wen, C. A Comprehensive Review of Biodegradable Synthetic Polymer-Ceramic Composites and Their Manufacture for Biomedical Applications. *Bioactive Materials* **2019**, *4*, 22–36, doi:10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
18. Liang, Y.; Liang, Y.; Zhang, H.; Guo, B. Antibacterial Biomaterials for Skin Wound Dressing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2022**, *17*, 353–384, doi:10.1016/j.ajps.2022.01.001.
19. Anisha, B.S.; Biswas, R.; Chennazhi, K.P.; Jayakumar, R. Chitosan–Hyaluronic Acid/Nano Silver Composite Sponges for Drug Resistant Bacteria Infected Diabetic Wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *62*, 310–320, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.09.011.
20. Liu, W.; Yang, C.; Gao, R.; Zhang, C.; Ou-Yang, W.; Feng, Z.; Zhang, C.; Pan, X.; Huang, P.; Kong, D.; et al. Polymer Composite Sponges with Inherent Antibacterial, Hemostatic, Inflammation-

- Modulating and Proregenerative Performances for Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* - Infected Wound Healing. *Adv Healthcare Materials* **2022**, *11*, 2201394, doi:10.1002/adhm.202201394.
21. Bennett-Guerrero, E.; Pappas, T.N.; Koltun, W.A.; Fleshman, J.W.; Lin, M.; Garg, J.; Mark, D.B.; Marcet, J.E.; Remzi, F.H.; George, V.V.; et al. Gentamicin–Collagen Sponge for Infection Prophylaxis in Colorectal Surgery. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 1038–1049, doi:10.1056/NEJMoa1000837.
 22. Jiang, F.; Li, Q.; Li, Y.; Lai, X.; Duan, Y.; McDowell, A.; Huang, Z.; Liu, S.; Wang, Y.; Zhang, C.; et al. 3D Electrospun Nanofiber Sponges of Insect Chitosan/Pullulan/Citric Acid Embedded with ZnMOF in Situ for Enhanced Healing of MRSA-Infected Wounds. *Chemical Engineering Journal* **2024**, *498*, 155388, doi:10.1016/j.cej.2024.155388.
 23. Trucillo, P.; Di Maio, E. Classification and Production of Polymeric Foams among the Systems for Wound Treatment. *Polymers* **2021**, *13*, 1608, doi:10.3390/polym13101608.
 24. Negut, I.; Dorcioman, G.; Grumezescu, V. Scaffolds for Wound Healing Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 2010, doi:10.3390/polym12092010.
 25. Mariod, A.A.; Adam, H.F. GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **2013**, *12*, 135–147.
 26. Roy, B.C.; Das, C.; Hong, H.; Betti, M.; Bruce, H.L. Extraction and Characterization of Gelatin from Bovine Heart. *Food Bioscience* **2017**, *20*, 116–124, doi:10.1016/j.fbio.2017.09.004.
 27. Mahmood, K.; Muhammad, L.; Ariffin, F.; Razak, H.K.Bt.A.; Sulaiman, S. Review of Fish Gelatin Extraction, Properties and Packaging Applications. **2016**, *56*, 47–58.
 28. Noor, N.Q.I.M.; Razali, R.S.; Ismail, N.K.; Ramli, R.A.; Razali, U.H.M.; Bahaudin, A.R.; Zaharudin, N.; Rozzamri, A.; Bakar, J.; Shaarani, S.Md. Application of Green Technology in Gelatin Extraction: A Review. *Processes* **2021**, *9*, 2227, doi:10.3390/pr9122227.
 29. Alipal, J.; Mohd Pu'ad, N.A.S.; Lee, T.C.; Nayan, N.H.M.; Sahari, N.; Basri, H.; Idris, M.I.; Abdullah, H.Z. A Review of Gelatin: Properties, Sources, Process, Applications, and Commercialisation. *Materials Today: Proceedings* **2021**, *42*, 240–250, doi:10.1016/j.matpr.2020.12.922.
 30. Milano, F.; Masi, A.; Madaghiele, M.; Sannino, A.; Salvatore, L.; Gallo, N. Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1499, doi:10.3390/pharmaceutics15051499.
 31. Siburian, W.Z.; Rochima, E.; Andriani, Y.; Praseptiangga, D. Fish Gelatin (Definition, Manufacture, Analysis of Quality Characteristics, and Application): A Review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* **2020**, *8*, 90–95.
 32. Mikhailov, O.V. Gelatin as It Is: History and Modernity. *IJMS* **2023**, *24*, 3583, doi:10.3390/ijms24043583.
 33. Haaf, F.; Sanner, A.; Straub, F. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses. *Polym J* **1985**, *17*, 143–152, doi:10.1295/polymj.17.143.
 34. Teodorescu, M.; Bercea, M. Poly(Vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **2015**, *54*, 923–943, doi:10.1080/03602559.2014.979506.
 35. Franco, P.; De Marco, I. The Use of Poly(N-Vinyl Pyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review. *Polymers* **2020**, *12*, 1114, doi:10.3390/polym12051114.
 36. Holmes, N.E.; Charles, P.G.P. Safety and Efficacy Review of Doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics* **2009**, *1*, CMT.S2035, doi:10.4137/CMT.S2035.
 37. <https://www.sigmaaldrich.com/ro/en/product/sigma/g9391> accesat la data 29.05.2025, ora 20:05.
 38. <https://www.fishersci.com/shop/products/polyvinylpyrrolidone-average-m-w-1-300-000-k85-95-thermo-scientific/ac227470250> accesat la data 29.05.2025, ora 20:15.
 39. <https://www.sigmaaldrich.com/ro/en/product/sigma/d9891> accesat la data 29.05.2025, ora 20:25.
 40. <https://www.sigmaaldrich.com/ro/en/product/mm/354400>, accesat la data 29.05.2025, ora 20:41.
 41. Mohamed, M.A.; Jaafar, J.; Ismail, A.F.; Othman, M.H.D.; Rahman, M.A. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In *Membrane Characterization*; Elsevier, 2017; pp. 3–29 ISBN 978-0-444-63776-5.
 42. Serafim, A.; Petre, D.G.; Moraru, L.; Cioflan, H.E.; Vasile, E.; Mastalier-Manolescu, B.; Petrutescu, M.; Stancu, I.C. Gelatin-PVP Hydrogels with Potential Skin Grafts Applications. *KEM* **2015**, *638*, 38–46, doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.638.38.



43. Dumitrașcu, M.; Meltzer, V.; Sima, E.; Virgolici, M.; Albu, M.G.; Fikai, A.; Moise, V.; Minea, R.; Vancea, C.; Scărișoreanu, A.; Scarlat, F. Characterization of Electron Beam Irradiated Collagen-polyvinylpyrrolidone (PVP) and Collagen-dextran (DEX) Blends. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2011**, 6, 1793–1803.
44. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1979/cormack/facts/>, accesat la data 29.05.2025, ora 21.
45. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1979/hounsfield/facts/>, accesat la data 29.05.2025, ora 21:30.
46. Ritman, E.L. Current Status of Developments and Applications of Micro-CT. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2011**, 13, 531–552, doi:10.1146/annurev-bioeng-071910-124717.
47. du Plessis, A.; Broeckhoven, C.; Guelpa, A.; le Roux, S.G. Laboratory X-Ray Micro-Computed Tomography: A User Guideline for Biological Samples. *Gigascience* **2017**, 6, 1–11, doi:10.1093/gigascience/gix027.
48. https://www.sigmaaldrich.com/ro/en/product/aldrich/900496?srsId=afmboorncb3axnflkebrwukxfinywn_eza5f8193g1no8_zijgm9ocq&utm=, accesat la 12.06.2025, ora 19:43
49. <https://stokmed.pl/gb/dressings-materials/363-6355-sterile-hydrogel-dressings-aqua-gel.html?>, accesat la 12.06.2025, ora 20:14.