

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA “ BUCUREȘTI**

**CARACTERIZAREA FIZICO –CHIMICĂ  
A UNOR FORME FARMACEUTICE OBȚINUTE DIN EXTRACTE DE  
COLAGEN FIBRILAR TIP I DE ORIGINE MARINĂ**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC  
PROF. UNIV. DR. RODICA SÎRBU**

**DOCTORAND  
FARMACIST PRIMAR MELAT CHERIM**

**BUCUREȘTI**

**2018**

## MULȚUMIRI

La finalizarea acestei Teze de Doctorat mulțumesc, cu această ocazie unică, D-nei. Prof. Univ. Dr. Rodica Sîrbu, coordonatorul meu științific, care mi-a îndrumat gândurile și activitățile în întreaga muncă de cercetare.

Tot în acest moment, aduc mulțumirile mele în mod special D-nului. Prof. Univ. Dr. Constantin Mircioiu, D-nei. Prof. Univ. Dr. Doina Drăgănescu și D-nului. Conf. Univ. Dr. Flavian Rădulescu, care m-au sprijinit să susțin prezenta Teză de Doctorat.

Mulțumesc Comisiei de cadre didactice universitare pentru analiza lucrării de față și pentru sugestiile făcute.

Mulțumesc băiatului meu Ergün și familiei mele care m-au încurajat și m-au susținut să realizez această lucrare.

# CUPRINS

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

PARTEA I-A STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I ASPECTE PRIVIND TRANSPORTUL MEDICAMENTELOR CU DESTINAȚIE TOPICĂ

I.1 PENETRAREA SUBȘTANȚELOR ACTIVE PRIN PIELE

I.2 ETAPELE PARCURSE DE SUBȘTANȚA ACTIVĂ ÎN STRATURILE DERMICE

I.3 FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ TRANSPORTUL PRIN DIFUZIE A  
MEDICAMENTELOR CU DESTINAȚIE TOPICĂ

CAPITOLUL II MODELĂRI ALE CINETICII PENETRĂRII FORMELOR SEMISOLIDE DUPĂ  
APLICARE TOPICĂ

II.1 DESCRIEREA CINETICII PENETRĂRII PRIN PIELE A MEDICAMENTELOR

II.2 DIFUZIUNEA

CAPITOLUL III CARACTERIZAREA GENERALĂ A COLAGENULUI

III.1 STRUCTURA MOLECULARĂ ȘI COMPOZIȚIA CHIMICĂ A COLAGENULUI

III.2 CARACTERISTICILE COLAGENULUI

III.3 FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE CU COLAGEN – HIDROGELURI

III.4 BIOMATERIALE COLAGENICE

III.5 SURSE DE COLAGEN – COLAGEN DIN MAMIFERE

III.6 VALORIFICAREA RESURSELOR MARINE PENTRU OBTINEREA  
COLAGENULUI DIN PEȘTE

PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE

MOTIVAȚIA CERCETĂRIILOR

CAPITOLUL IV STUDII PRIVIND OBTINEREA COLAGENULUI DIN PEȘTE DE MAREA NEAGRĂ ȘI  
CARACTERIZAREA SA FIZICO-CHIMICĂ

IV.1 STUDII PRIVIND EXTRACȚIA COLAGENULUI DIN PEȘTE DE MAREA NEAGRĂ

IV.1.1 INTRODUCERE

IV.1.2 MATERIALE ȘI METODELE FOLOSITE LA EXTRACȚIA COLAGENULUI DIN  
PIELE DE CHEFAL ȘI NISETRU DIN MAREA NEAGRĂ

IV.1.3 FAZELE PROCESUL BIOTEHNOLOGIC DE EXTRACȚIE A COLAGENULUI DIN  
PEȘTE MARIN

IV.1.4 REZULTATE ȘI DISCUȚII

IV.2 CARACTERIZAREA COLAGENULUI NATIV EXTRAS DIN CHEFAL

IV.2.1 ANALIZA FIZICO - CHIMICĂ A HIDROLIZATULUI COLAGENIC EXTRAS DIN  
*GREY MULLET*

IV.2.2 ANALIZA CROMATOGRIFICĂ

IV.2.3 DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HIDROXIPROLINĂ CU VALIDAREA  
METODEI DE ANALIZĂ

IV.2.4 ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE FT-IR

IV.2.5 ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE UV-DC

IV.2.6 ANALIZA TERMOGRAVIMETRICĂ

IV.2.7 ANALIZA DE MICROSCOPIE OPTICĂ ȘI ELECTRONICĂ SEM

IV.2.8 ANALIZA REOLOGICĂ

IV.2.9 STUDII COMPARATIVE IN VIVO PE HIDROLIZATELE COLAGENICE DIN  
PEȘTE ȘI DIN VIȚEL

IV.3 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL V STUDII PRIVIND FORMULAREA UNOR PREPARATE FARMACEUTICE PE BAZĂ  
DE COLAGEN DIN BIORESURSA MARINĂ DIN MAREA NEAGRĂ

- V.1 MOTIVAȚIA STUDIULUI
- V.2 INTRODUCERE
- V.3 FORMULAREA DE HIDROGELURI COLAGENICE PROVENITE DIN *GREY MULLET* CU DIVERSE SUBSTANȚE ACTIVE
  - V.3.1 MATERIAL ȘI METODE DE STUDIU
  - V.3.2 REZULTATE OBTINUTE LA FORMULAREA DE HIDROGELURI
    - V.3.2.1 HIDROGELURI COLAGENICE CU OXITETRACICLINĂ
    - V.3.2.2 HIDROGELURI COLAGENICE CU IODOFORM
    - V.3.2.3 HIDROGELURI COLAGENICE CU  $ZnCl_2$
    - V.3.2.4 HIDROGELURI COLAGENICE CU ALGE MARINE
    - V.3.2.5 HIDROGELURI COLAGENICE CU CHITOSAN ȘI ALGE MARINE
- V.4 FORMULAREA DE MEMBRANE(PELICULE) COLAGENICE CU DIVERSE SUBSTANȚE ACTIVE
  - V.4.1 MATERIAL ȘI METODĂ
  - V.4.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII
    - V.4.2.1 PELICULE DIN COLAGEN DE VIȚEL CU SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE
    - V.4.2.2 PELICULE DIN COLAGEN NATIV DE PEȘTE DE *GREY MULLET*
    - V.4.2.3 PELICULE DIN COLAGEN DE PEȘTE CU ALGE MARINE
    - V.4.2.4 COMPOZIT PE BAZĂ DE COLAGEN, CHITOSAN ȘI ALGE MARINE SUB FORMĂ DE MEMBRANE
- V.5 MATRICI COLAGENICE CU DIVERSE SUBSTANȚE ACTIVE
  - V.5.1 MATRICI POROASE DE COLAGEN CU ALGE MARINE
  - V.5.2 PREPARAREA MATRICILOR POROASE CU DIVERSE ALTE SUBSTANȚE ACTIVE
    - V.5.2.1 MATRICI COLAGENICE DIN COLAGEN NATIV
    - V.5.2.2 MATRICI COLAGENICE CU OXITETRACICLINĂ
    - V.5.2.3 MATRICI COLAGENICE CU IODOFORM
    - V.5.2.4 MATRICI COLAGENICE CU CLORURĂ DE ZINC
- V.6 CONCLUZIILE STUDIULUI
- CAPITOLUL VI STUDII REOLOGICE COMPARATIVE PE FORMULĂRI CU COLAGEN MARIN ȘI DE VIȚEL
  - VI.1 MATERIALE ȘI METODE.
  - VI.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND REOLOGIA PREPARATELOR PE BAZĂ DE COLAGEN.
    - VI.2.1 REZULTATELE STUDIILOR REOLOGICE PE FORMULĂRI CU COLAGEN DIN VIȚEL
      - VI.2.1.1 REOLOGIA HIDROGELURILOR DE VIȚEL CU IODOFORM.
      - VI.2.1.2 MODULII DE STOCARE ȘI DE PIERDERI PE FORMULĂRI COLAGENICE DIN VIȚEL CU IODOFORM
    - VI.2.2 REOLOGIA COLAGENULUI DE VIȚEL CU CLORURA DE ZINC
    - VI.2.3 REOGRAMELE OBTINUTE PENTRU PROBELE DE COLAGEN EXTRAS DIN PIELE DE PEȘTE
  - VI.3 STUDII DE MICROSCOPIE OPTICĂ A FORMULĂRILOR PE COLAGEN DIN PEȘTE CHEFAL (*Grey Mullet*)
  - VI.4 CONCLUZIILE CAPITOLULUI.
- CAPITOLUL VII CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A UNOR PREPARATE CU COLAGEN EXTRAS DIN PEȘTE *Grey Mullet* DIN MAREA NEAGRĂ
  - VII.1 DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A COLAGENULUI DIN PEȘTE PRIN CHEMILUMINESCENȚĂ
  - VII.2 DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A UNOR FORMULĂRI PE BAZĂ DIN COLAGEN DIN PEȘTE
  - VII.3 CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A UNUI PREPARAT OBTINUT DIN COLAGEN CHITOSAN ȘI ALGE MARINE
  - VII.4 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL VIII CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ ȘI STUDII  
COMPARATIVE IN VIVO PE FORMULĂRI FARMACETICE SEMISOLIDE PĂ BAZĂ DE COLAGEN

VIII.1 MATERIAL ȘI METODĂ

VIII.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A  
FORMULĂRILOR FARMACEUTICE PE *ESCHERICHIA COLI*

VIII.2.1 ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ PENTRU HIDROGELURI CU *ESCHERICHIA  
COLI*.

VIII.2.2 ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A HIDROGELURILOR CU  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

VIII.2.3 ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A PELICULELOR PE TULPINI DE  
*ESCHERICHIA COLI* ȘI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

VIII.2.4 ACTIVITATEA ANTIBACTERIANĂ A UNUI PREPARAT OBTINUT DIN  
COLAGEN - CHITOSAN - EXTRACT DE ALGE MARINE.

VIII.3 STUDII IN VIVO PE FORMULĂRI FARMACETICE - HIDROGELURI  
COLAGENICE DIN PEȘTE MARIN *Grey Mullet* DIN MAREA NEAGRĂ

VIII.3.1 MATERIALE ȘI METODĂ PENTRU STUDIILE IN VIVO PE HIDROGELURI  
COLAGENICE

VIII.3.2 REZULTATE SI DISCUȚII

VIII.4 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CAPITOLUL IX STUDII IN VITRO PRIVIND CINETICA DE CEDARE A OXITETRACICLINEI DIN  
HIDROGELURI COLAGENICE

IX.1 MATERIAL SI METODĂ

IX.2 REZULTATE SI DISCUȚII

IX.3 CONCLUZIILE CAPITOLULUI

CONCLUZII GENERALE

BIBLIOGRAFIE GENERALĂ

ANEXE: LUCRĂRI PUBLICATE

## INTRODUCERE

Evaluarea posibilităților de obținere a colagenului din resurse marine, reprezintă o problemă atent studiată în ultimele decenii, ca o alternativă la principalele surse de colagen cunoscute și utilizate până în prezent și anume colagenul de origine animală.

Interesul practic pentru colagen acoperă în timp o durată istorică începând cu prelucrarea pieilor, aplicațiile culinare, până la preocupările farmaceutice și biomedicale actuale. Desigur, la baza acestui interes au stat particularitățile specifice aplicative ale colagenului și de aici a decurs abundența informațională asupra subiectului în literatura de specialitate.

**Motivația temei** de cercetare a fost generată de această diversitate de date, care mi-a permis o abordare selectivă privind aspectele legate de caracterizarea, obținerea și valorificarea colagenului în domeniul biomedical - farmaceutic, domeniu care solicită în utilizare, conservarea anumitor caracteristici și atribute biologice active, native, ale colagenului.

Importanța alegerii temei este susținută de prezența colagenului în aproape toate țesuturile și organele, din particularitățile sale structurale și biochimice, din participarea la sanogeneza umană. Toate acestea justifică efortul oamenilor de știință în cunoașterea implicațiilor lui în diverse procese normale sau patologice din organismul uman.

**Extracția colagenului din peștii de Marea Neagră** a fost abordată de cercetătorii de la **Universitatea Ovidius Constanța** împreună cu cei de la **INCDM Constanța**. Noutatea constă în faptul că pentru prima dată însă, s-a concretizat posibilitatea extracției colagenului din piele de *Grey Mullet* (Chefal) din Marea Neagră. Față de argumentele descrise mai sus rezultă și importanța temei alese, fiind actuală, de mare complexitate ca studiu, și ancorată în cercetările la nivel național și mondial. Tema se încadrează în liniile de cercetare moderne cuprinse în Programele de cercetare europene și naționale, de valorificare a resurselor oferite de Marea Neagră. **Proiectul tezei este inclus într-un contract de cercetare mai amplu câștigat în 2017 în cadrul Proiecte Complexe - PCCDI. Proiectul se numește: Valorificare superioară, complexă a biomasei marine prezentă de-a lungul coastei românești a Mării Negre prin realizarea unor tehnologii inovatoare și emergente.**

Această lucrare a fost cuprinsă și într-un *Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin POSDRU 2007-2013 Axa prioritară 1 Educația și formarea în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere, Domeniul major de intervenție 1.5 Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării. CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN, Contract de finanțare: POSDRU/159/1.5/S/135760*

**Ipoteza** de la care am pornit în obținerea colagenului marin a fost aceea că se extrage mai ușor și cu randamente mai bune decât cel din pielea mamiferelor, prezintă risc relativ scăzut de a conține patogeni necunoscuți, iar matricile de colagen denaturat regenerează mai bine țesuturile decât cele de colagen nativ. Astfel, matricile reticulate obținute din colagen de pește este de așteptat să conțină structuri parțial denaturate din cauza temperaturii de denaturare mai scăzute. **Obiectivul general** îl constituie elaborarea unei metode optime de extracție a colagenului din surse marine, în vederea valorificării resurselor Mării Negre în scop terapeutic. Tot ca obiectiv general am avut în vedere ca hidrolizatul colagenic obținut, să îl introducem în forme farmaceutice pe care apoi să le caracterizăm fizico-chimic și farmacologic.

Pentru realizarea celor două **obiective generale** ne propunem următoarele **obiective specifice**:

- Stabilirea unui proces biotehnologic de extracție pentru prima dată a colagenului solubil din piele de *Grey Mullet* din Marea Neagră și caracterizarea acestuia. Selectarea posibilităților de utilizare în mai multe aplicații cum ar fi, obținerea de diverse formulări farmaceutice bazate pe hidrolizatul colagenic obținut din pește marin
- De asemenea, un alt obiectiv specific al tezei l-a reprezentat validarea metodei de determinare a hidroxiprolinei din pește marin și produse din pește, ca și indicator de prezență a colagenului în probele studiate.
- Realizarea formulărilor de biomateriale semisolidе, prin obținerea de hidrogeluri, pelicule și matrici poroase, cu utilizare topică, pentru administrarea unor substanțe active ca: oxitetraciclină, iodoform, clorură de zinc și extracte de alge. La toate aceste formulări semisolidе am testat acțiunea antimicrobiană, antiseptică și antiinflamatorie, ele putând reprezenta o alternativă la formele farmaceutice convenționale.
- Caracterizarea formulărilor realizate prin determinarea capacității antioxidante totale și a activității antimicrobiene.
- Realizarea de teste *in vivo* pentru a evidenția biocompatibilitatea formelor farmaceutice și stabilirea ratei de epitelizare.
- Realizarea de studii de cedare *in vitro* a substanței medicamentoase din preparate farmaceutice pe bază de colagen din pește *Grey Mullet* din Marea Neagră.

Prin **obiectivul general** propus, Teza de doctorat se încadrează în cadrul studiilor ecosistemului Mării Negre. Metodele de cercetare abordate și metodologia de obținere a hidrolizatului colagenic extras din pește marin din Marea Neagră și realizarea de noi preparate farmaceutice cu aplicație topică constituie noutatea temei acestei Teze de Doctorat. Au fost descrise cercetările efectuate pentru optimizarea unui proces de extracție a hidrolizatului colagenic din pește mari cu validarea metodelor de determinare a hidroxiprolinei care constituie markerul pentru determinarea procentului de colagen nativ din pește marin. De asemenea au fost dezvoltate cercetări pentru caracterizarea fizico-chimică, microbiologică și farmacologică a acestui hidrolizat colagenic din peștele *Grey Mullet* din Marea Neagră. O a doua serie de cercetări s-a bazat pe realizarea unor formulări farmaceutice semisolide cu destinație topică, care au avut ca bază hidrolizatului colagenic din pește marin în care au fost încorporate diverse alte substanțe cu acțiune terapeutică: antimicrobiene (oxitetraciclină), antiseptice (iodoform), antibacteriene (clorură de zinc), anticoagulante (heparină), precum și alte produse obținute din resurse marine din Marea Neagră (chitosan și extracte de alge marine). Pentru toate aceste noi formulări s-au dezvoltat cercetări pentru evidențierea caracteristicilor reologice, antioxidante și antimicrobiene. Întreaga Teză, prin rezultatele obținute, pune în evidență un caracter multidisciplinar al cercetărilor efectuate, îmbinând cunoștințele de efectuare și interpretare a analizelor fizico-chimice și microbiologice, cu noțiunile fundamentale de tehnologie farmaceutică, farmacologie *in vitro* și *in vivo*, farmacognozie pentru flora marină, analiză bio-statistică, tehnoredactare computerizată.

Teza de doctorat este structurată în două părți, care cuprind 9 capitole, însoțită de capitole de Introducere, Concluzii generale și Anexe.

Prima parte a lucrării, Stadiul actual al cunoașterii este alcătuit din trei capitolele.

În **Capitolul I - Aspecte privind Transportul Medicamentelor cu destinație topică**, sunt prezentate aspecte teoretice privind transportul transdermic al medicamentelor topice.

**Capitolul II - Modelări ale cineticii penetrării formelor semisolide după aplicare topică** tratează aspecte legate de cinetica penetrării substanțelor active prin piele și descrie ecuațiile matematice care caracterizează fenomenul de difuzie prin membrane.

**Capitolul III - Caracterizarea generală a colagenului** descrie structura moleculară și compoziția chimică a colagenului, biosinteza colagenului, subclasificarea tipurilor de colagen și caracteristicile colagenului. Sunt descrise formele farmaceutice semisolide pe bază de colagen, de tip hidrogeluri și biomaterialele colagenice cu aplicațiile lor biomedicale. Tot în acest capitol sunt prezentate din literatura de specialitate, sursele de colagen, clasificate în surse din mamifere și din resurse marine. Sunt detaliate aspectele privind valorificarea resurselor marine, ținând cont că în continuare, subiectul contribuțiilor personale în activitatea de cercetare cuprinsă în prezenta Teză se axează pe valorificarea colagenului din pește marin din Marea Neagră.

**Partea a II-a Contribuții personale** cuprinde 6 capitole.

Ce-a de-a doua parte este alcătuită din șase capitole în care sunt prezentate rezultatele contribuțiilor personale privind optimizarea unei biotehnologii de extracție colagenului din piele de chefal de Marea Neagră comparativ cu cele utilizate la extracția din piele de animale terestre și aplicațiile în realizarea unor noi preparate farmaceutice.

**Capitolul IV - Studii privind obținerea colagenului din pește de Marea Neagră și caracterizarea sa fizico-chimică** cuprinde în prima parte prezentarea cercetărilor efectuate pentru extracția colagenului nativ din pește din Marea Neagră. A fost extras pentru prima oară colagen din peștele *Grey Mullet* (chefalul) din Marea Neagră. Au fost efectuate studii pentru optimizarea procesului tehnologic de obținere a colagenului din resurse marine pentru obținerea celor mai mari randamente. Au fost realizate studii de caracterizare a hidrolizatului colagenic obținut prin studii fizico-chimice, prin analiză cromatografică a hidrolizatului colagenic, prin determinarea conținutului de hidroxiprolină cu validarea metodei de analiză, studii spectrale prin metode spectrofotometrice FT-IR, prin analiza dicroismului prin spectroscopie UV-DC, de microscopie optică și electronică scanată SEM și prin evidențierea comportării reologice și prin studii comparative *in vivo* pe hidrolizatele colagenice din pește și din vițel.

**Capitolul V - Studii privind formularea unor preparate farmaceutice pe bază de colagen din bioresursa marină din Marea Neagră** tratează posibilitățile de realizare a diferitelor formulări farmaceutice cu acțiune terapeutică. Au fost obținute hidrogeluri colagenice cu oxitetraciclină, cu iodoform, cu ZnCl<sub>2</sub>, cu alge marine, cu chitosan și alge marine. Pentru toate aceste hidrogeluri sunt prezentate aspectele esențiale privind obținerea lor. Un alt subcapitol conține studii privind formularea de membrane (pelicule) colagenice cu diverse substanțe active. În acest sens au fost realizate studii comparative pentru obținerea de pelicule din colagen de vițel cu substanțe antimicrobiene cu pelicule din colagen nativ de pește de *Grey Mullet* și cu pelicule din colagen de pește cu alge marine. Au fost realizate și cercetări pentru obținerea unui compozit pe bază de colagen, chitosan și alge marine sub formă de membrane. O altă formulare farmaceutică pe bază de colagen din resurse marine matrici colagenice cu diverse substanțe active dintre care se pot enumera: matrici colagenice din colagen nativ, matrici colagenice cu oxitetraciclină, matrici colagenice cu iodoform și matrici colagenice cu clorură de zinc. Au fost preparate sisteme matriciale de colagen cu alge marine. Sunt prezentate modalitățile de obținere și anumite caracteristici care țin de forma fizică, aspect, culoare.

**Capitolul VI** Studii reologice comparative pe formulări cu colagen marin și de vițel. S-au efectuat studii comparative de reologie, atât pe colagenul extras din piele de vițel, cât și pe colagenul extras din piele de Chefal (*Grey Mullet*). Reticularea colagenului s-a realizat cu acid tanic, în concentrație de 10% față de colagen. Caracterizarea reologică a vizat mai întâi proprietățile de curgere, apoi dinamica colagenului din pește de chefal și de vițel, în combinații cu diverse substanțe active cum sunt: iodoform, clorura de zinc, hidrogeluri colagenice cu alge, hidrogeluri colagenice cu chitosan și alge marine. Măsurătorile reologice în sistem staționar, afectează structura sistemelor disperse, datorită forțelor de forfecare la care acestea sunt supuse, pe când cele în regim dinamic, nu afectează sistemele, astfel încât parametrii reologici determinați, au valorile reale. Comportarea vâscoelastică se poate determina din măsurarea modulilor de elasticitate sau de stocare  $G'$  și a celor de pierderi sau de vâscozitate  $G''$  la amplitudini ale deformației suficient de mici, pentru ca materialele să prezinte răspuns vâscoelastic liniar. Astfel, valori mari ale lui  $G'$  indică preponderența proprietăților elastice, iar valori mari ale lui  $G''$ , predominanța proprietăților vâscoase. Din studiile realizate a rezultat că modulii de stocare sunt mai mari decât cei de pierderi pentru toate hidrogelurile pe întregul domeniu de frecvențe unghiulare pe care s-au făcut măsurătorile, deci în comportarea vâscoelastică a acestora predomină elasticitatea. Ambii moduli cresc practic liniar cu frecvența unghiulară. Dreptele care reprezintă cei doi moduli sunt practic aproape paralele pentru fiecare hidrogel, cu excepția celui care nu conține acid tanic, pentru care valorile devin mai apropiate pe măsură ce frecvențele unghiulare scad, ceea ce arată că este foarte slab reticulat. Din studiile de microscopie optică s-a putut evidenția menținerea structurii lamelare pentru peliculele obținute din hidrogelurile acide pentru cantitatea minimă de substanță activă, respectiv oxitetraciclină, clorură de zinc, iodoform sau extracte de alge marine, dar lamelele sunt mai groase și mai puțin distanțate decât pentru martor. La compozitele cu colagen, se observă că, comparativ cu imaginile peliculelor de colagen nativ, structura lamelară dispăre, apare o distribuție largă și aglomerate de fibrile, care conferă o structură complexă a peliculelor. Colagenul își păstrează fibrilele, se constată o încorporare uniformă a conținutului de extracte din alge, iar chitosanul conferă structura compactă a preparatului.

**Capitolul VII Cercetări privind capacitatea antioxidantă a unor preparate cu colagen extras din pește *Grey Mullet* din Marea Neagră** conține studii privind determinarea activității antioxidante totale a colagenului din pește prin chemiluminescență. Au fost analizate multiple soluții apoase și alcoolice de concentrații de 40% și respectiv 50% alcool etilic. Toate soluțiile de colagen au prezentat activitate antioxidantă. Se constată că hidrolizatul colagenic prezintă activitate antioxidantă mai mare în soluții de 40% alcool față de aceleași concentrații de colagen în soluții de 50% alcool etilic.

**Capitolul VIII Cercetări privind activitatea antimicrobiană și studii comparative *in vivo* pe formulări farmaceutice semisolide pe bază de colagen** prezintă rezultate privind activitatea antimicrobiană a formulărilor farmaceutice pe *Escherichia Coli* și pe *Staphylococcus Aureus* a hidrogelurilor și a peliculelor pe bază de colagen din resurse marine (din peștele *Grey Mullet*) cu diverse alte substanțe active. Din studiul activității antibacteriene ale Compozitului format din colagen - chitosan - extract de alge marine, se evidențiază faptul că acesta prezintă activitate antimicrobiană mărită mai mult decât dublul activității oricărui component individual din compozit.

Activitatea *in vivo*, s-a realizat într-un studiu pe animale de experiență, la Institutul Național Victor Babeș, care a urmărit profilul de cedare a substanțelor active încorporate, respectiv a eficacității lor terapeutice în tratamentul antimicrobian și antiseptic la animale de experiență. Hidrogelurile a căror activitate a fost îmbunătățită, prezintă și indici de vindecare accelerați față de colagenul nativ. Studiile comparative ale ratei de vindecare ale colagenului de vițel și cel din pește arată că un proces mai rapid de vindecare a prezentat colagenul din pește.

**Capitolul IX Studii *in vitro* privind cinetica de cedare a oxitetraciclinei din hidrogeluri colagenice** cuprinde studii de cedare *in vitro* a substanței medicamentoase din hidrolizatele colagenice obținute din pește de Marea Neagră. Din studiul profilelor de cedare și parametrii cinetici în funcție de compoziție, se evidențiază faptul că modelul Higuchi nu a fost aplicabil, ceea ce a demonstrat că procesul difuzional este însoțit de alte fenomene. Cel mai probabil, componente ale formulărilor, altele decât oxitetraciclina, sunt transferate prin membrana artificială și joacă rolul de agent solubilizant în mediul receptor. O posibilă explicație ar fi precipitarea oxitetraciclinei la nivelul porilor membranei. Astfel, cedarea *in vitro* nu mai este dominată de microstructura formulării semisolide. Limitanta cinetică (etapa limitativă de proces) a procesului global este dizolvarea lentă a oxitetraciclinei.

Finalul Tezei de Doctorat este marcat de un capitol distinct de Concluzii generale care centralizează cele mai importante aspecte legate de extracția hidrolizatelor de colagen din *Grey Mullet* din Marea Neagră, caracterizarea acestuia comparativ cu colagenul din vițel, obținerea de formulări din colagen din resurse marine sub forma de hidrogeluri, membrane (pelicule) și matrici și evidențierea proprietăților lor terapeutice.

Cercetările efectuate vor fi concretizate în continuare prin viitoare brevete de invenție, a cercetărilor originale.

În capitolul Anexe sunt prezentate articolele publicate în reviste de specialitate și în volumele conferințelor la care am participat.



## CONTRIBUȚII PERSONALE

### MOTIVAȚIA CERCETĂRILOR

Prezența colagenului în aproape toate țesuturile și organele vitale, particularitățile sale structurale și biochimice, au atras atenția cercetătorilor din întreaga lume asupra importanței acestei proteine. Obținerea colagenului din resurse marine constituie o alternativă viabilă care s-a extins în mod deosebit în zonele în care au fost disponibile aceste resurse, în zone costiere în care este dezvoltată cercetarea științifică în domeniul bio-medical. Extracția colagenului din peștii de Marea Neagră a mai fost abordată de cercetătorii de la Universitatea *Ovidius* din Constanța împreună cu cei de la INCDM Constanța.

Noutatea Tezei constă în faptul că pentru prima dată însă, s-a concretizat posibilitatea extracției colagenului din piele de *Grey Mullet* (Chefal) din Marea Neagră. Obiectivul Principal al Tezei de Doctorat impune mai întâi obținerea colagenului din resursa marină din Marea Neagră. În acest sens a fost extras pentru prima dată colagenul fibrilar tip I din *Grey Mullet* de Marea Neagră. Am extras colagen și din alți pești marini, cum este cazul nisetrului. Colagenul obținut din *Grey Mullet* a fost caracterizat prin analize fizico - chimice pentru a se stabili structura și principalele caracteristici fizico-chimice. Rezultatele pozitive obținute din testele fizico-chimice, reologice, microbiologice și farmacologice ne-au condus la stabilirea unui al doilea obiectiv important de a realiza formulări farmaceutice cu aplicație topică prin încorporarea în acest hidrolizat a diverse alte substanțe cu acțiune terapeutică cum sunt: cu acțiune antimicrobiană (oxitetraciclina), antiseptică (iodoform), antibacteriană (clorură de zinc), anticoagulantă (heparina), precum și alte produse obținute din resurse marine din Marea Neagră (chitosan și extracte de alge marine).

Pentru fiecare formulare nou preparată s-au realizat mai multe teste pentru stabilitatea formei farmaceutice destinată utilizării topice și pentru optimizarea acțiunii farmacologice a substanțelor active inițiale singulare. Pentru noile formulări farmaceutice au fost testate capacitatea antioxidantă totală, activitatea antimicrobiană și caracteristicile reologice. Au fost realizate teste de microscopie optică și electronică care au permis obținerea datelor privind structura lor. Pentru evidențierea acțiunilor farmacologice au fost realizate teste *in vivo* pe animale de laborator, care au evidențiat parametrii de epitelizare și rata de contracție a răni.

Întreaga activitate de cercetare a fost generată de ipoteza fundamentală de a valorifica resurse marine din Marea Neagră în scop terapeutic în scop de a realiza formulări farmaceutice semisolide cu destinație topică.

#### CAPITOLUL IV

#### STUDII PRIVIND OBȚINEREA COLAGENULUI DIN PEȘTE DE MAREA NEAGRĂ ȘI CARACTERIZAREA SA FIZICO-CHIMICĂ

##### IV.1.2. MATERIALE SI METODE FOLOSITE LA EXTRACȚIA COLAGENULUI DIN PIELE DE CHEFAL SI NISETRU DIN MAREA NEAGRA

Materiale folosite pentru extracția colagenului. Alegerea probelor pentru izolarea colagenului din pește, a avut ca obiectiv valorificarea resurselor din Marea Neagră. În studiul propus, extracția colagenului s-a realizat pe pești din specia *Grey Mullet*, (chefal) din Marea Neagră și *Acipenser Gueldenstaedtii* (nisetru).



Fig.IV.3 Pielea peștilor din specia *Grey Mullet*



Fig.IV.4 Pielea peștilor din specia *Acipenser gueldenstaedtii*

Metode folosite pentru extracția colagenului din piele de pește

Ca și metode de extracție, literatura de specialitate, indică diferite biotehnologii de izolare a colagenului, în funcție de tratamentele aplicate:

- tratamente alcaline și acide
- tratamente acide
- tratamente enzimatic

- tratamente combinate.

Pentru extracția collagenului din deșeurile de pește, cuprinzând pielea, solzii și aripioarele, s-au utilizat biotehnologiile de extracție prin tratament acid: cu acid acetic 0.5 M și acid clorhidric 0.1M. Pentru a obține randamente bune și collagen fibrilar tip I nedenumurat, extracția collagenului din pielea peștilor marini utilizați: chefal și nisetru a implicat mai multe operații.

**Metoda de extracție** a constat în două procese:

- Procesul 1. Obținerea materialului din care se va realiza obținerea hidrolizatei de collagen.
- Procesul 2. Extracția propriu-zisă prin care s-a izolat collagenul.

**Procesul 1.** În această etapă peștii au fost spălați cu apă distilată și apoi au fost desolzați. Au fost tăiate aripioarele, manual. Apoi s-a îndepărtat pielea prin jupuire. (Fig IV.2) Deșeurile colectate cuprinzând: pielea, solzii și aripioarele, au fost spălate de câteva ori cu apă distilată și cântărite. Operațiunile s-au desfășurat la temperatura camerei, de 21-23°C.

**Procesul 2** Extracția propriu-zisă a constat în succesiunea următoarelor etape:

- Pretratarea: demineralizarea și deproteinizarea pielii de pește,
- extracția collagenului solubil, ASC,
- filtrarea amestecului,
- precipitarea collagenului,
- centrifugarea probelor cu precipitat,
- reticularea

#### IV.1.4 REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma efectuării operațiilor de îndepărtare a solzilor și a pielii, s-au obținut următoarele cantități, prezentate în Fig IV.10, Fig.IV.11

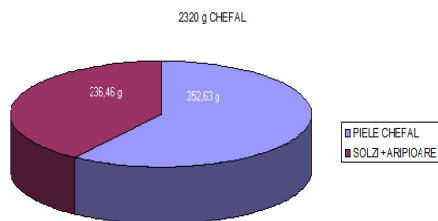


Fig.IV.10 Proportia pielii de Chefal din total masă probă

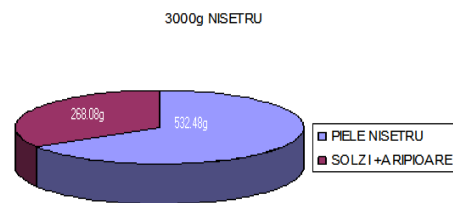


Fig.IV.11 Proportia pielii de Nisetru din total masă probă



Fig.IV.17. Hidrolizat de Collagen obținut din Chefal prin extracție cu acid clorhidric 0.1 M



Fig.IV.18 Hidrolizat de Collagen obținut din Chefal prin extracție cu acid acetic 0.5 M



Fig.IV.19 Collagen liofilizat

Precipitatul collagenic a fost separat prin **centrifugare**. A rezultat un hidrolizat alb collagenic cu aspect gelic în cazul extracției cu Acid acetic 0,5M și opac pentru extracția cu HCl 0.1M Fig IV.17, Fig.IV.18 și Fig IV.19.

**Liofilizarea:** Collagenul liofilizat se prezintă sub formă de burete spongios, denumit matrice, cu proprietăți similare matricei extracelulare. Liofilizarea a permis obținerea collagenului și sub formă de pulbere. A rezultat o pulbere albă.

**Calcularea randamentului de extracție**

Randamentul ASC și PSC a fost calculat din procentul din greutatea uscată a collagenului extras (Mo) în comparație cu greutatea umedă a pielii inițiale de pește utilizate (M):  $\text{Randamentul \%} = \text{Mo} / \text{M} * 100$

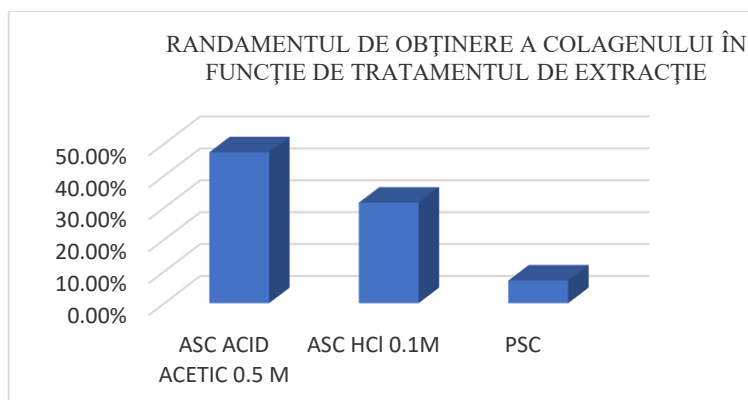


Fig.IV.23 Variația randamentului în funcție de modul de extracție

Rezultatele randamentului de obținere a colagenului din pielea de chefal, prin tratament acid cu acid acetic 0.5M și HCl 0.1 M, sunt prezentate în Fig. IV.23.

## IV.2 CARACTERIZAREA COLAGENULUI NATIV EXTRAS DIN CHEFAL

### IV.2.1 ANALIZA FIZICO - CHIMICĂ A HIDROLIZATULUI COLAGENIC EXTRAS DIN GREY MULLET

Pentru caracterizarea colagenului obținut din Chefalul de Marea Neagră s-au efectuat multiple analize fizico-chimice. Testele care au fost realizate pentru caracterizarea colagenului extras au fost selectate și adaptate astfel încât să putem obține rezultate de încredere care să ofere siguranța și asigurarea calității cercetărilor.

#### Rezultate și Discuții

Caracteristicile fizico-chimice ale colagenului nativ, obținut prin tratament acid, precum și rezultatele analizelor preliminare, sunt prezentate în Tabelul IV.5

Tabelul IV.5. Caracteristicile fizico-chimice ale hidrogelului de colagen

Caracteristici	Colagen extras cu acid acetic 0.5 M	Colagen extras cu 0.5M HCL 0.1 M	Colagen din vițel
Aspect	alb gelatinos	alb opac	Translucid gelatinos
Culoare	alb-galbui	alb-galbui	Alb galbui
Umiditate %	16.0	16.0	14.0
Substanță uscată %	1.68	1.16	1.85
Cenușă 600-800 OC %	0.05	0.08	0.10
Azot total mg (Kjieldal), %	9.71	6.73	15.76
Substanță proteică (N x 5,62) %	54.57	37.86	88.59
pH	3.5	2.5	2.39
Substanțe minerale	1.1	1.0	1.25

Reprezentarea grafică a valorilor procentuale ale caracterizării fizico- chimice comparative ale colagenului de vițel și pește obținut prin tratamente acide diferite, pentru conținutul de substanță uscată, de cenușă și umiditate sunt prezentate în Fig.IV.26.

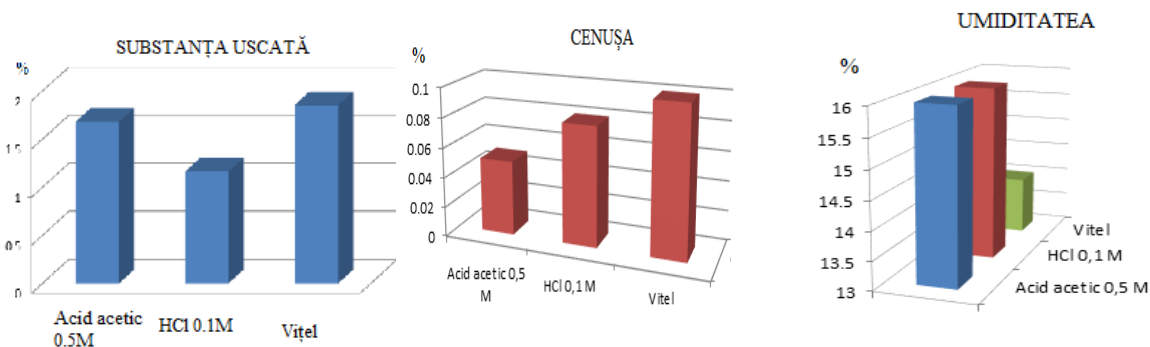


Fig.IV.26 Parametrii fizico –chimici comparativi ai colagenului de pește și vițel  
Conținutul de substanță uscată, de cenușă și umiditatea

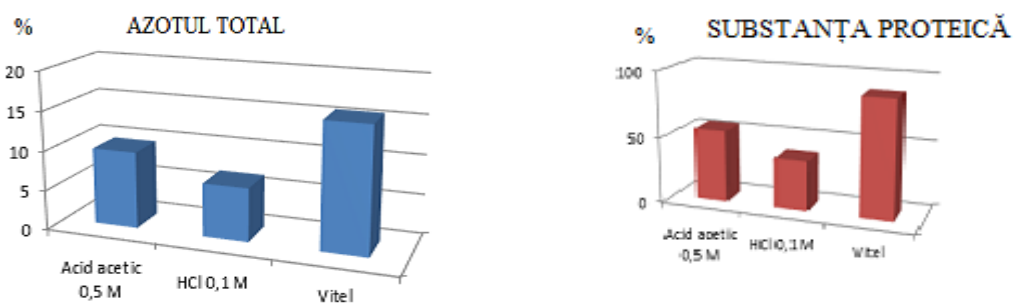


Fig.IV.27 Parametrii fizico –chimici comparativi ai colagenului de pește și vițel  
Conținutul de azot total și de substanță proteică

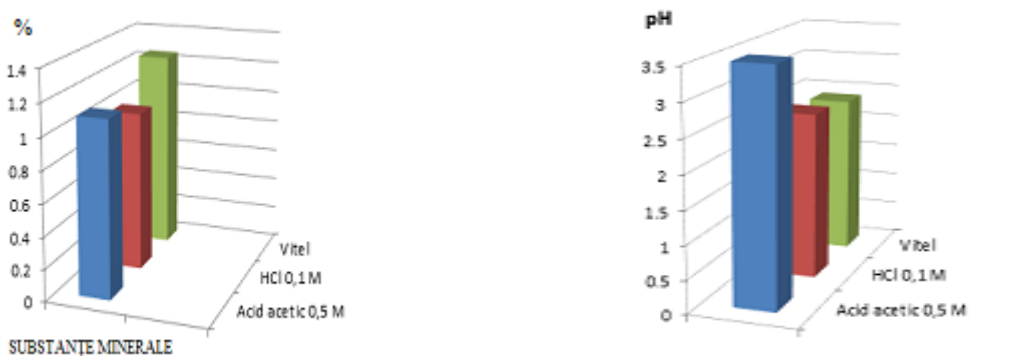


Fig.IV.28 Parametrii fizico –chimici comparativi ai colagenului de pește și vițel  
Conținutul de substanțe minerale și variația pH-ului.

În Fig.IV.27 sunt redate valorile comparative pentru conținutul de azot total și de substanță proteică. Valorile variației pH -ului și conținutul de substanțe minerale, pe cele 3 tipuri de hidrolizare colagenice, sunt reprezentate în Fig. IV.28. Valorile colagenului din pește, sunt similare cu ale celui din vițel, diferențieri evidente existând la substanța proteică, unde s-au înregistrat valori de 88, 59% la vițel, comparativ cu 54,57 % la pește.

#### IV.2.3 DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HIDROXIPROLINĂ

Hidroxi-prolina este un aminoacid care este sintetizat ireversibil din hidroxilarea post-tranlațională a prolinei de către prolin hidroxilază. În colagenul de Tip I, hidroxi-prolina este prezentă în proporție de aproximativ 11,3% în greutate. Măsurarea hidroxi-prolinei este utilizată pentru a identifica anumite boli care implică liza colagenului.

Tabelul IV.14 Rezultatele conținutului de Hidroxiprolină (Hpro) măsurat spectrofotometric pe hidrolizatul de collagen extras din *Grey Mullet*

Tip Collagen Pește	Conținut Hpro %	Conținut Collagen %	LOD	LOQ
Extractie cu Acid Acetic 0.5 M	0.119%	0.95%	0.018%	0.022%
Extractie cu HCL 0.1 M	0.085%	0.68%	0.018%	0.022%

Metoda s-a apreciat ca fiind validă pentru determinarea hidroxiprolinei din collagenul izolat din pielea de chefal. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul IV.14 și figurile Fig.IV.39 și Fig.40. Procentul de collagen se calculează, multiplicând cu 8, conținutul procentual de hidroxiprolină, după relația (IV. 6):

$$\text{Conținutul de collagen\%} = \text{Conținut de HPro \%} * 8 \quad (\text{IV. 6})$$

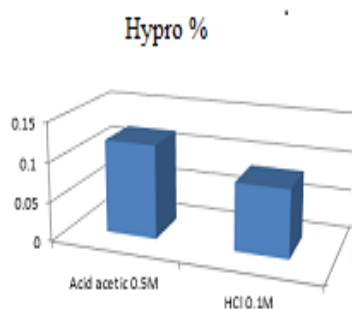


Fig.IV.39 Conținutul de Hyp % din pielea de chefal

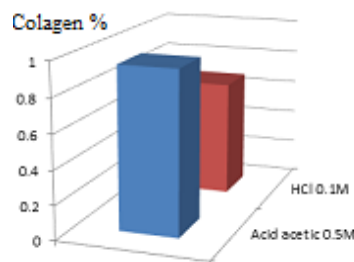


Fig.IV.40 Conținutul de collagen % din pielea de chefal

#### IV.2.4 ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE FTIR

Spectroscopia în infraroșu este sensibilă la structurile chimice ale moleculelor și este adecvată pentru determinarea proteinelor și a polipeptidelor în diferite stări, concentrații și medii și este un instrument util pentru determinarea structurii secundare a proteinelor și polipeptidelor [Yang H., 2015], [Yang G., 2016].

Material și metodă

Analiza FTIR s-a realizat cu Spectrometru FTIR 4200 Jasco cu domeniul de lungimi de undă 7800-350cm<sup>-1</sup>, cu acuratețea lungimii de undă ±0,01 cm<sup>-1</sup>, cu rezoluția maximă 0,5 cm<sup>-1</sup>. Aparatul prezintă un sistem cu un singur fascicul și sursă de radiație ceramică de mare intensitate (vezi Fig. IV.41).

Spectrul infraroșu -FTIR al collagenului din piele de chefal este prezentat în Fig. IV.42 iar cel pentru collagenul din piele de vișel este prezentat în Fig. IV.43.

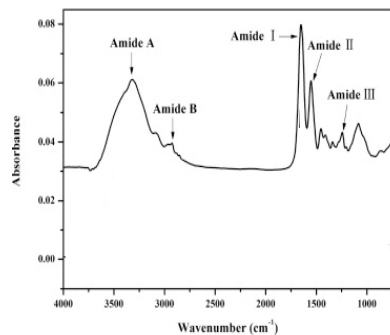


Fig.IV.42 Spectrul FTIR al collagenului extras din pielea de Grey Mullet

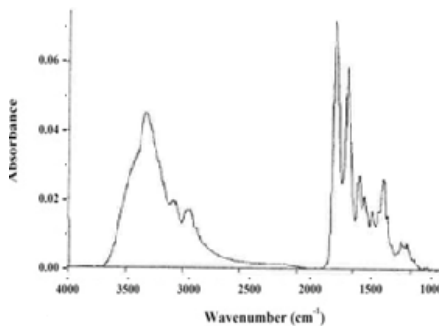


Fig.IV.43 Spectrul FTIR al collagenului extras din vișel

Se poate constata apropierea celor două structuri colagenice. Se remarcă însă și diferențe la lungimi de undă mai mari de 1000 nm. Cea mai importantă bandă pentru studiul structurilor de ordin superior al proteinelor este amidă I, de la 1650 cm<sup>-1</sup> [Guo Ping, W., 2014]. Aceasta este sensibilă la structurile secundare [Zang Hu., 2017]. Forma acesta este reprezentativă pentru structură secundară a colagenului [Gaurav K.P., 2017]. Unele benzi din spectrul FT-IR al colagenului se utilizează pentru verificarea conformației de triplu helix în biomateriale. Păstrarea conformației native se poate aprecia prin:

- raportul dintre absorbanta benzii amidă III, AIII, și de la 1450 cm<sup>-1</sup>, A1450, utilizată ca măsură a integrității conformației, valori egale sau mai mari ca 1 indicând prezența acesteia;
- diferența dintre frecvențele benzilor amidă I și amidă II, (AI - AII), cm<sup>-1</sup> care – dacă valoarea este mai mare ca 100 – indică prezența colagenului denaturat;
- raportul dintre absorbanta benzii amidă I și amida A, AI/AA, corelat cu extinderea reticulării: cu cât valoarea este mai mare, reticularea este mai puternică.

#### IV.2.5 ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE UV-DC

Dicroismul circular este o metodă importantă pentru analiza structurii helicoidale și a gradului de renaturare/denaturare al probelor utilizate în studiile biologice.

Rezultate și discuții

Spectroscopia UV-DC, măsoară diferențele de absorbție a luminii polarizate circular spre stânga și spre dreapta date de asimetria structurală a lanțului polipeptidic și răspunde la structură secundară a proteinelor: cele neregulate nu dau spectru, iar cele regulate dau minime și maxime.

Spectrele de dicroism circular pentru colagenul extras din piele de vițel și cel din piele de pește (soluții în acid acetic 0,5M)

Fig. IV.46.a prezintă spectrul de dicroism circular al colagenului de pește care înregistrează un minim la lungimea de undă de 198 nm, pentru maxim 221.5 nm, pentru punctul de elipticitate zero 215,5 nm, pentru parametrul Rpn valoarea 0,10 ceea ce înseamnă că în timpul extracției structura helixului triplu al colagenului nu a fost afectată, iar hidrogelul se poate utiliza pentru biomateriale. Fig. IV.46 b prezintă spectrul de dicroism circular al colagenului de vițel care arată că cele două spectre de pește și de vițel, sunt apropiate .

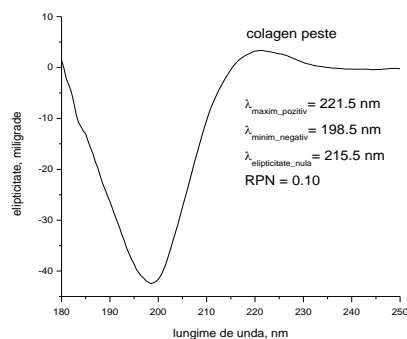


Fig. IV.46. a Spectrul de dicroism circular al colagenului de pește la 25°C

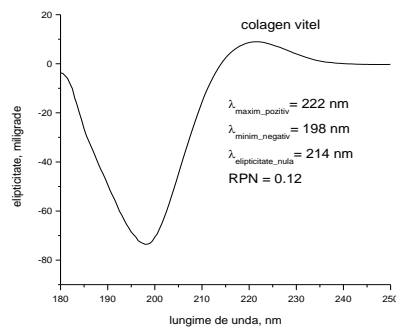


Fig. IV.46. b Spectrul de dicroism circular al colagenului de vițel la 25°C

#### IV.2.7 ANALIZA DE MICROSCOPIE OPTICĂ ȘI ELECTRONICĂ SEM

Deși structura de colagen a fost studiată prin microscopie de lumină polarizată de la începutul secolului al XIX-lea și a continuat după aceea, studiile și recenziile moderne nu au reușit să coreleze concluziile bazate pe datele obținute prin tehnici cu cele ale microscopiei cu lumină polarizată.

Rezultate și discuții

Colagenul de Tip I este puternic pozitiv în ceea ce privește lungimea fibrelor; birefringența intrinsecă pozitivă indică o aliniere cvasi-cristalină paralelă cu axa fibrei și moleculă a resturilor de aminoacizi ale lanțurilor polipeptidice. Acest lucru nu ar fi fost compatibil cu o structură elicoidală, ci a fost realizat de înghiuri de înclinare similare și de direcții

opuse ale înfășurării și suprapresiunii. Caracteristicile de birefrință ale colagenului sunt, de asemenea, afectate de tratamente chimice, extracții și proceduri de colorare.



Fig.IV.53 Colagen nereticulat din pește marin *Grey Mullet*



Fig.IV.54 Colagen reticulat din chefal

Imaginile de microscopie optică ale colagenului nereticulat, sunt prezentate în Fig. IV.53 Distribuția fibrilelor de colagen în forma reticulată cu Acid tanic 2%, sunt prezentate în Fig.IV.54 Colagenul este una dintre proteinele structurale lungi, fibroase ale căror funcții sunt diferite de cele ale unei proteine globulare, cum ar fi enzimele. Legăturile dure de colagen (fibrele de colagen) sunt o componentă majoră a produsului a matricii extracelulare care suportă majoritatea țesuturilor și dă structura celulelor din exterior.

#### IV.2.8 ANALIZA REOLOGICĂ

Fluidele complexe, prezintă în marea lor majoritate, comportare vâscoelastică, adică prezintă atât rezistență la curgere, cât și deformație elastică. Diferențierea componentei vâscoase de cea elastică, se realizează cu ajutorul reometrelor. Comportarea reologică sub acțiunea tensiunilor de forfecare s-a determinat la  $23 \pm 0.1^\circ \text{C}$  cu un reovâscozimetru Haake VT 550 echipat cu sistemul de senzori MV1 pentru vâscozități medii și software Rheo-Win 4 Thermo Fischer Scientific, la viteze de forfecare cuprinse între 0,1 și  $25 \text{ s}^{-1}$ , reprezentative pentru aplicarea pe piele și eliberarea medicamentelor. S-au efectuat studii comparative de reologie, atât pe colagenul extras din pielea de vițel, cât și pe colagenul extras din pielea de Chefal. Ambele probe au fost varianta nereticulată și reticulată cu acid tanic 2%. Măsurătorile reologice dinamice permit caracterizarea proprietăților vâscoelastice ale materialelor. Modulii de stocare  $G'$ , și de pierdere  $G''$ , se folosesc la diferențierea contribuțiilor elastice și vâscoase la vâscoelasticitatea soluțiilor/gelurilor de polimeri și pentru a distinge sistemele nereticulate de reticulate:

- valori  $G'$  mari indică predominanța proprietăților elastice,
- valori  $G''$  mari – preponderență celor vâscoase, iar punctul de intersecție, cunoscut
- sub numele de *cross-over point*, indică existența unei tranziții gel-sol.

#### IV2.9.STUDII COMPARATIVE *IN VIVO* PE HIDROLIZATELE COLAGENICE DIN PEȘTE ȘI DIN VIȚEL

Acțiunea, *in vivo* a colagenului marin, a fost realizată la Institutul Național Victor Babeș București. Din punct de vedere etic, studiul a fost efectuat în conformitate cu Legislația Națională, acesta având Autorizația nr. 342 / 04.04.2017.

Materiale și metodă

S-a utilizat un lot de 7 șoareci, care s-a menținut în cameră de aclimatizare, la temperatura de  $22^\circ \text{C}$ , timp de 2 zile. Metodele indicate de literatura de specialitate pentru determinările, *in vivo*, sunt: modelul rănii de excizie, modelul de rănire incisive, modelul de rănire cu spațiu mort, modelul prin arsură. În studiul de față s-a utilizat, modelul rănii de excizie.

Ca și parametrii ai determinării *in vivo*, s-au studiat:

- contracția procentuală a rănilor
- perioada de epitelizare.
- Măsurarea indicelui de rană.

Formulările de hidrogeluri au fost aplicate până la vindecarea completă a rănilor. Studiul a fost demarat în data de 12.06.2017 și s-a derulat timp de 7 zile. Pe fiecare șoarece s-a efectuat o excizie a pielii de 2,5 cm pentru pregătirea zonei de aplicare a colagenului. S-au utilizat următoarele amestecuri:



- Martor collagen din piele de chefal
- Martor collagen din piele de vițel.

Atât probele martor cât și probele cu amestecuri, au fost aplicate o data pe zi, la ora 10. Ritmul de vindecare s-a urmărit timp de 7 zile, studiul efectuându-se în intervalul 12.06.2017 -19.06.2017

### Rezultate și discuții

Studiul a urmărit eficiența collagenului de pește și vițel, în procesul de vindecare, în urma aplicațiilor locale. Șoarecii din lotul analizat, au fost notați cu:

- Șoarecii Nr.1-martor collagen vițel (vezi Fig.IV.68) și
- Nr.4 -martor collagen pește (vezi Fig.IV.67).



Fig.IV.67 Martor Nr.4 tratat cu Hidrolizat de collagen din pește marin Grey Mullet

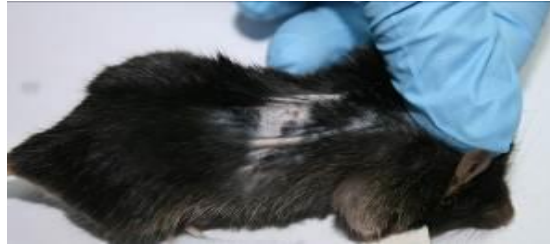


Fig.IV.68 Martor Nr.1 tratat cu Hidrolizat de collagen din vițel

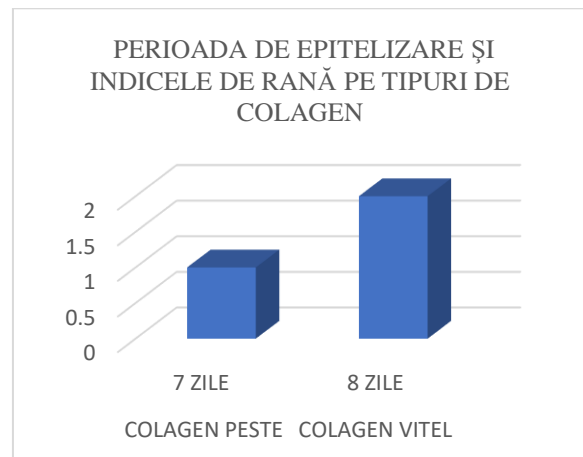
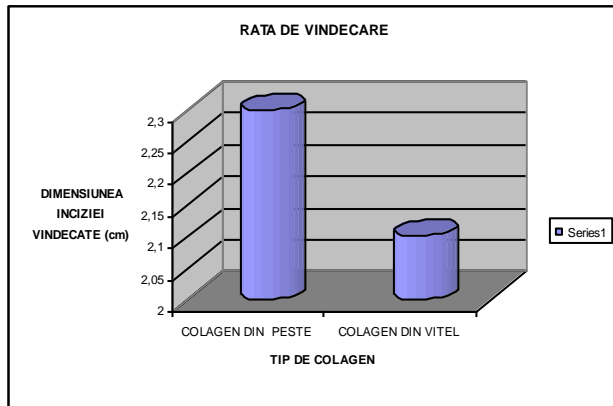


Fig.IV.69 Rata de vindecare și indicele de epitelizare pe tipuri de collagen

Pentru rata de vindecare, s-a apreciat aspectul plăgii prin:

Deschis = plagă cu aspect discontinuu – vindecare întârziată

Închis = plagă cu aspect continuu

Rezultatele ratei de vindecare și indicele de epitelizare comparative pe collagenul din pește și de vițel, sunt prezentate în Fig.IV.69.

## CAPITOLUL V

### STUDII PRIVIND FORMULAREA UNOR PREPARATE FARMACEUTICE PE BAZĂ DE COLAGEN DIN BIORESURSA MARINĂ DIN MAREA NEAGRĂ

#### V.1 MOTIVAȚIA STUDIULUI

Infectarea rănilor este o problemă majoră în medicină, multe tipuri ale acestora fiind predispuse contaminării microbiene, care produc infecții. Prin tratarea rănilor infectate se reduce încărcătura bacteriană, îndepărtând una din barierele importante care stau în fața vindecării. Collagenul, prezent în toate țesuturile conjunctive, reprezintă substratul natural pentru atașarea, creșterea și diferențierea celulelor, îndeplinind toate condițiile pentru utilizarea ca pansament, ceea ce-l face primă alegere ca suport pentru cedarea medicamentelor. Fiind proteină, este și substrat pentru bacterii,



deci nu poate susține singur procesul de vindecare. Dar asociat cu antibiotice și/sau antiseptice și aplicat topic devine sistem de eliberare și controlează infectarea rănilor prin eliberare locală.

## V.2 INTRODUCERE

Un alt obiectiv al tezei l-a reprezentat obținerea de biomateriale colagenice și caracterizarea acestora: hidrogeluri, pelicule (membrane) și matrici poroase, cu colagen, cu sau fără antiseptic, cu substanțe antimicrobiene și cicatrizante, pentru a fi utilizate ca pansamente în tratarea rănilor și escarelor. Colagenul este constituentul major al matricei extracelulare [Lin Y. C., 2009], [Tayebjee M.H., 2003]. Printre polimerii naturali, colagenul bovin, în primul rând de tip I, a fost mult timp folosit în aplicații biomedicale ca agent hemostatic pentru tratarea leziunilor tisulare [Wang X., 2013]. După ce au fost descoperite proprietățile sale regenerative, a fost aplicat în culturi pentru utilizare în medicina regenerativă [Kawaguchi N., 2013]. Datorită însă a infecțiilor grave apărute pe plan mondial, ca cele de tip zoonoză, inclusiv encefalopatia bovină spongiformă, gripa aviară și porcină și febra bolii aftoase la bovine, porcine și bivoli, care au afectat grav utilizarea colagenului din resurse terestre ca materiale bioactiv natural, au condus la orientarea către obținerea colagenului din alte materiale bioactive, cum sunt resursele marine.

Pornind de la proprietățile de vindecare deținute de colagen, este de așteptat ca asocierea cu diverse substanțe active să conducă la pansamente:

- hidrogeluri,
- matrici spongioase și
- membrane – performante pentru tratarea rănilor deschise de diverse etiologii, infectate sau neinfectate.

## V.3. FORMULAREA DE HIDROGELURI COLAGENICE PROVENITE DIN *Grey Mullet* CU DIVERSE SUBSTANȚE ACTIVE

Hidrogelurile colagenice din pește sunt materiale polimerice cu structură tridimensională, procent limitat de reticulare și hidrofilie ridicată. Datorită acestor caracteristici, hidrogelurile pot absorbi o cantitate ridicată de apă și oferă răni un mediu umed și în același timp are capacitatea de a absorbi exsudatele produse de aceasta [Gan L.L., 2010]. În funcție de materialele utilizate, hidrogelurile pot fi naturale, sintetice sau semisintetice.

### V.3.1 MATERIAL ȘI METODĂ

Ca suport în obținerea de biomateriale, s-a utilizat colagenul extras și caracterizat din pielea de chefal, prezentat în capitolul IV, (vezi Fig.V.2), cât și colagenul din piele de vițel, furnizat de Institutul Național de Pielărie Bucuresti. S-au realizat hidrogeluri, membrane (pelicule) și matrici cu următoarele materiale:

- ca și componente antimicrobiene s-au ales: - iodoformul și oxitetraciclina,
- pentru proprietățile antiinflamatorii și antibacteriene am folosit clorura de zinc,
- iar ca și componentă antiinflamatorie și cicatrizantă am folosit produse naturale de proveniență marină, adică algele marine de tipul: *Ulva lactuca* și *Cladophora vagabunda*.

S-au testat diverse concentrații ale substanțelor active, astfel încât să se poată determina concentrația optimă pentru bioformularea pansamentelor.

**Metodele de obținere** ale biomaterialelor, au fost următoarele:

- Hidrogelurile colagenice au fost obținute prin amestecarea gelurilor ajustate la concentrația de 0.4% și pH 7 cu trietanolamină și diferite substanțe active, în concentrații diferite față de substanța uscată. Hidrogelurile au fost reticulate cu acid tanic, în proporție de 10 % față de colagen menținute la 4°C timp de 24 de ore.
- Membranele (Peliculele), s-au obținut din hidrogelurile reticulate și combinate cu substanțele active, prin turnarea în placi Petri. Uscarea s-a efectuat la temperatura camerei, 22°C, timp de 24-72 ore.
- Matricile s-au obținut din liofilizatele colagenice. Hidrogelurile au fost liofilizate utilizând liofilizatorul Lacombo și au aceeași compoziție ca și hidrolizatele colagenice.

## V.3.2 REZULTATE OBȚINUTE LA FORMULAREA DE HIDROGELURI COLAGENICE

### V.3.2.1 HIDROGELURI COLAGENICE CU OXITETRACICLINĂ

Oxitetraciclina este un antibiotic din grupa tetraciclinelor produsă de *Streptomyces rimosus* ce acționează bacteriostatic împotriva bacteriilor Gram-pozitive (*Actinomyces spp.*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia*) și Gram-negative (*Haemophilus spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella*, *Yersinia pestis*) micoplasme, chlamidii, rickettsii și protozoare la animale.

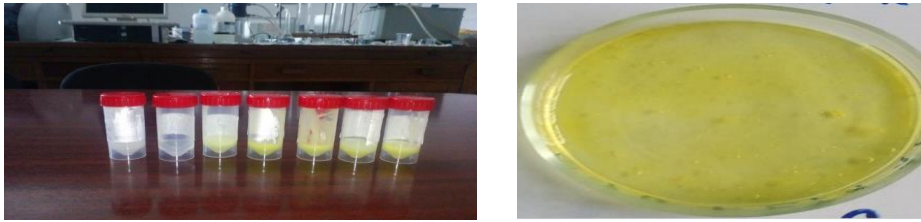


Fig.V.6 Hidrogeluri colagenice din pește *Grey Mullet* cu Oxitetraciclină

Preparatul cu Oxitetraciclină acționează prin blocarea sintezei proteice în celula bacteriană. Ca substrat proteic s-a utilizat gelul din vițel 2.63% și hidrogelul de pește chefal (Fig.V6).

### V.3.2.2 HIDROGELURI COLAGENICE CU IODOFORM

Iodoformul (din greaca ioeides = violet, iod + latina formica = furnică sau triiodmetanul) este un compus organic halogenat cu iod, cu formula  $CHI_3$ , mult utilizat în trecut ca antiseptic local sub formă de pastă în tratamentul rănilor și abceselor și ca tifon steril impregnat cu pastă pentru tamponarea cavitațiilor după chirurgia orală și otorinolaringologică

### V.3.2.3 HIDROGELURI COLAGENICE CU CLORURA DE ZINC

Clorura de zinc în soluție 8% are acțiune astringentă și bacteriostatică. Este indicată pentru badijonarea ulcerărilor gingivale, în soluție 10%, iar în soluție 30% este folosită pentru badijonări în parodontite marginale și pentru cauterizarea aftelor bucale și ale regiunilor hiperplaziate din gingivita hiperplazică. Mai este indicată și în cazurile de hipersensibilitate dentinară, unde produce distrugerea terminațiilor nervoase superficiale și anestezie. În soluție de 10-40% se recomandă după detartraj. Soluțiile concentrate sunt caustice și de aceea se va evita contactul prelungit cu mucoasa. Soluția de clorură de zinc 30%, are utilizare ca : astringent, folosit pentru negi, veruci.

### V.3.2.4 HIDROGELURI COLAGENICE CU ALGE MARINE

#### Prepararea hidrogelurilor de colagen cu alge marine

Pentru a putea stabili din măsurători reologice dacă între componentele din cele trei extracte hidroalcolice din alge și colagenul fibrilar tip I există sau nu interacțiuni, s-au preparat geluri cu aceeași concentrație de colagen și care conțin 5 %, respectiv 10 % în alcool etilic care constituie mediul de dispersie al gelurilor de colagen ce conțin extracte (cantitățile de substanțe introduse odată cu extractele sunt foarte mici în gelurile finale și pot fi neglijate), și care au fost utilizate pentru a se efectua comparația.

Gelurile de colagen în care s-a introdus 5 % soluție de alcool etilic 70 % conțin 3,5 % în procente de masă sau 4,03 % în procente de volum alcool etilic, iar cele cu 10% soluție de alcool etilic conțin cantitățile duble, respectiv 7 % în procente de masă și 8,06 % în procente de volum, alcool etilic. Alcoolul etilic există în aceleași procente de masă sau de volum și în gelurile de colagen care conțin cantitățile corespunzătoare de extracte din alge. Gelurile sunt prezentate în Tabelul V.2.

Tabelul V.2 Gelurile de colagen cu alge marine

Tip de algă	Concentrația %	Observații
Gel simplu	0	Incolor, transparent puțin opalescent
	5 %	
	10 %	
Gel cu <i>Ulva Lactuca</i>	5 %	Transparent, culoare slab verde Puțin opac, intens verde
	10 %	
Gel cu <i>Cladophora vagabunda</i>	5 %	Slab opalescent, verde gălbui Puțin opalescent, verde maroniu
	10 %	

## V.4 FORMULAREA DE MEMBRANE (PELICULE) COLAGENICE CU DIVERSE SUBSTANȚE ACTIVE

### V.4.1 MATERIAL ȘI METODĂ

Membranele (Peliculele), s-au obținut din hidrogelurile reticulate și combinate cu substanțele active, prin turnarea în plăci Petri. Uscarea s-a efectuat la temperatura camerei, 22°C, timp de 24-72 ore. În studiul de față, s-au utilizat geluri de collagen vițel și pește chefal, care s-au combinat cu Iodoform 10% și oxitetraciclină 3%. Hidrogelurile amestecuri, s-au turnat în plăci Petri și uscate la temperatura camerei 23°C, timp de 72 ore.

#### V.4.2.2 PELICULE DIN COLAGEN NATIV DE PEȘTE DE *Grey Mullet*

Hidrogelul din pește chefal *Grey Mullet*, a fost turnat în plăci Petri, după o prealabilă agitare pentru îndepărtarea aerului. Peliculele colagenice obținute din pește au fost comparate cu cele din collagen de vițel.

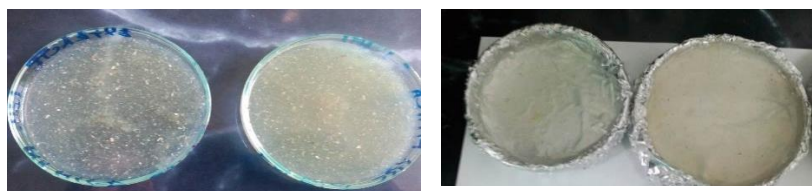


Fig.V.16 Pelicule turnate din Collagen de Pește *Grey Mullet*

În Fig.V.16 sunt prezentate plăcile în care s-a turnat hidrogelul de collagen nativ. Pentru membranele destinate tratării rănilor, substanțele active utilizate au fost antimicrobiene: oxitetraciclină 3%, iodoformul 10% și clorură de zinc.



V.20 Pelicule de collagen din pește cu Iodoform 10%,



Fig.V.21 Peliculă din collagen de pește cu Oxitetraciclină 3%



Fig.V.22 Peliculă din collagen de chefal pește cu Zn Cl2 3%



Fig.V.23 Pelicule din collagen de pește reticulat

Membranele obținute după perioada de uscare, sunt prezentate în Fig. V.20, Fig.V.21 și Fig.V.22. În Figura V.20, sunt prezentate membranele de collagen impregnate cu Iodoform 10%. Aspectul elastic și omogenitatea substanțelor în membranele finalizate se poate observa și în cazul peliculelor cu clorura de zinc 3% și oxitetraciclină 3% (vezi Fig.V.21 și Fig.V.22). Din Fig. V. 23, se poate remarca aspectul poros al membranelor obținute, care au capacitate mare de absorbție. Aceasta proprietate reprezintă o caracteristică importantă a biomaterialelor.

#### V.4.2.3 PELICULE DIN COLAGEN DE PEȘTE CU ALGE MARINE

Pentru obținerea peliculelor cu alge marine, s-au folosit pulberi ale algelor verzi, *Cladophora lactuca* și *Ulva vagabunda*. Membranele astfel preparate, sunt vizate pentru efectul lor farmacologic antiinflamator, cu aplicații în domeniul stomatologic. În Fig. V.25 se prezintă o membrană pregătită prin turnarea hidrogelului iar în Fig.V.26 sunt prezentate pelicule cu alge marine, obținute după uscare, la temperatura camerei.

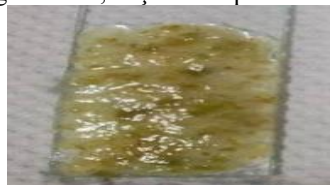


Fig.V.25 Peliculă collagen pește + pulbere *Cladophora vagabunda*

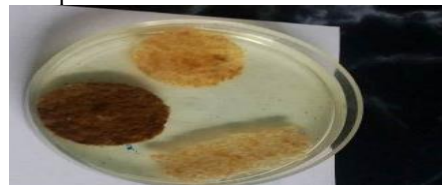


Fig.V.26 Peliculă collagen pește + pulbere *Ulva Lactuca*

## V.5 MATRICI COLAGENICE CU DIVERSE SUBSTANȚE ACTIVE

O matrice poroasă servește ca analog al MEC, acționând ca suport fizic și regulator insolubil al activității biologice, afectând migrarea, contracția și diviziunea celulelor. [O'Brien F. J., 2005].

Asemenea matrici se aplică în medicină ca hemostatic și material de protecție pentru răni [M. Chvapil M, 2002], [Geiger M., 2002]. O altă aplicație a matricilor colagenice este ca schelet în ingineria tisulară, sisteme de eliberare predictibilă și îndelungată a celulelor, proteinelor, acizilor nucleici și medicamentelor, [Glattauer V., 2010], [Takeshita F., 2009], [Sano A., 2003]. Matricile colagenice pot accelera legarea și creșterea celulelor și țesuturilor [Yannas I.V., 1989], [Van Tienen T.G., 2002]. Matricile s-au obținut prin liofilizarea hidrogelurilor la temperatura de (-40) °C și presiunea de 0,12 atm utilizând un liofilizator Labconco.

### V.5.1 MATRICI POROASE DE COLAGEN CU ALGE MARINE

Matricile de colagen cu alge s-au preparat prin două procedee:

- îmbibarea matricilor obținute din gelul de colagen cu caracteristicile de mai sus, în care colagenul din gel a fost reticulat cu aldehydă glutarică pentru stabilizare prin imersare în extractele hidroalcoolice din alge;
- prepararea matricilor prin liofilizarea gelurilor de colagen care conțin extracte hidroalcoolice din alge.

Primul procedeu este mai comod, deoarece se poate obține o cantitate mai mare de matrici spongioase din colagen care se introduc apoi în extractele din algele dorite, dar procedeu conduce la matrici care conțin cantități necontrolabile de extracte, ceea ce face ca cel de al doilea, deși mult mai puțin rapid și mai costisitor, să fie preferat.

#### Prepararea matricilor

Gelul cu concentrația 1 % în colagen, obținut prin diluare cu apă distilată din gelul inițial cu concentrația de 1,66 % și adus la pH = 7,5 cu soluție concentrată de amoniac, maturat timp de 12 ore la temperatura de 4 °C, s-a reticulat cu aldehydă glutarică – folosind o concentrație a aldehydei glutarice de 0,1 % raportată la cantitatea de colagen din gel – timp de 24 ore la aceeași temperatură. Gelul de colagen astfel pregătit s-a introdus apoi în tăvi de inox într-o astfel de cantitate încât să se obțină în final un strat de gel cu grosimea de cca 5 mm. Aceasta reprezintă, totodată, și grosimea finală a matricilor poroase. Procedeu de obținere a matricilor poroase pe bază de colagen constă în liofilizarea hidrogelurilor acestuia.

### V.2.1 MATRICI COLAGENICE DIN COLAGEN NATIV

Matricile de colagen preparate în cadrul lucrării, s-au obținut prin liofilizarea hidrogelurilor de pește *Grey Mullet*, cu pH 3,4 și concentrația de 1,68%, la temperatura de (-40) °C și presiunea de 0,12 atm utilizând un liofilizator Labconco.

Pregătirea matricilor colagenice a presupus realizarea în prealabil a reticulării hidrogelului de colagen, care s-a efectuat cu Acid tanic, în proporție de 10% față de colagen.

În figura V.37, se prezintă colagenul pregătit pentru introducerea în liofilizator. Colagenul nativ din pielea de chefal, izolat prin cele 2 procedee de tratament acid, extracție cu acid acetic 0.5 M și acid clorhidric 0.1M, a fost supus liofilizării. S-au obținut matrici poroase, conform celor prezentate în Fig. V.38 și Fig. V.39.



Fig.V.37 Matrice din colagen nativ de pește înainte de liofilizare



Fig.V.38 Matrice obținută din colagen extras cu Acid acetic 0.5 M

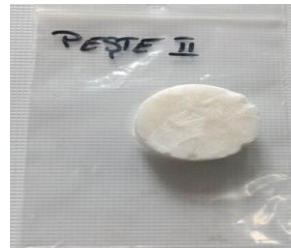


Fig.V.39 Matrice obținută din colagen extras cu HCl 0.1M

### V.5.2.2 MATRICI COLAGENICE CU OXITETRACICLINĂ

Pentru aplicații pe răni contaminate și infectate, s-a avut în vedere prepararea de matrici cu antibiotice. Oxitettraciclina poate fi ușor încorporată în hidrogelul inițial, deoarece acesta prezintă solubilitate bună în apă.

Din figura V.41, se poate observa că matricea cu oxitettraciclina 1% și 3% rezultată are aspect omogen de culoare, cu aspect spongiform și o porozitate evidentă, ceea ce demonstrează că oxitettraciclina s-a distribuit uniform printre

ochiurile rețelei hidrogelului caracterizat. Oxitetraciclina fiind o moleculă fotosensibilă, necesită protecție la expunerea la lumină, pentru ca acestea să nu se coloreze în brun.

### V.5.2.3 MATRICI COLAGENICE CU IODOFORM

Ca și substanță antiseptică, dezinfectantă, am ales iodoformul, pentru prepararea matricilor cu aplicabilitate în chirurgia plastică și vasculară și anume, *tratarea piciorului diabetic*. Experiența clinică din această zonă a demonstrat eficiența iodoformului ca antiseptic, iar ca și suport de cedare s-a utilizat o matrice obținută din colagenul izolat din pielea de chefal. Pentru omogenitatea preparatului, iodoformul a fost inițial solubilizat cu Tween 80, iar apoi ușor emulsionat cu ulei de ricin. S-a împiedicat astfel, depunerea iodoformului și obținerea unui preparat neomogen. În Fig.V.42 se prezintă o matrice colagenică cu iodoform. Matricea prezintă aspect spongios, porozitate bună, cu canale evidente în porozitatea buretelui și distribuție omogenă a substanței active.

### V.5.2.4 MATRICI COLAGENICE CU CLORURĂ DE ZINC

Pentru acțiunea astringentă antibacteriană, s-au formulat matrici cu clorură de zinc. Aceasta fiind o substanță hidrosolubilă, permite încorporarea uniformă a substanței active. În figura V.43 se prezintă matricile colagenice cu clorură de zinc. Se pot observa aspectele poroase, spongioase ale matricilor cu clorura de zinc, care se pot utiliza cu succes ca și biomateriale.



Fig.V.41 Matrici cu oxitetracilină  
1%, 3%



Fig.V.42 Matrice colagenică cu  
iodoform



Fig. V. 43 Matrici colagenice  
cu clorura de zinc

## CAPITOLUL VI

### STUDII REOLOGICE COMPARATIVE PE FORMULĂRI CU COLAGEN MARIN ȘI DE VIȚEL

Reologia studiază răspunsul materiei la acțiunea solicitărilor externe. Deoarece studiază doar deplasările însoțite de deformații se mai numește știința deformației și curgerii [W. Friess, 1998]

Fluidelor li se pot aplica atât tensiuni de forfecare (tangențiale) – metoda staționară, cât și oscilatorii - metoda dinamică. Spre deosebire de măsurătorile reologice în regim staționar, care afectează structura sistemelor disperse datorită forțelor de forfecare la care acestea sunt supuse, cele în regim dinamic nu afectează sistemele, astfel încât parametrii reologici determinați au valorile reale.

### VI.1 MATERIALE SI METODE

Măsurătorile reologice dinamice au fost realizate cu microreometrul Micro Fourier Transform Rheometer MFR 2100 (GBC, Australia), care funcționează în regim de curgere sub compresie, prezentat în capitolul IV. Reometrele înregistrează rezistența generată de material în timpul deformației. La amplitudini ale deformației suficient de mici cele două componente -vâscoasă și elastic se compun liniar, iar măsurătorile permit determinarea modulilor de stocare  $G'$ , și de pierdere  $G''$ , în funcție de frecvența mișcării oscilatorii.

Reticularea colagenului s-a realizat cu acid tanic, în concentrație de 10% față de colagen. Caracterizarea reologică a vizat mai întâi proprietățile de curgere, apoi dinamica colagenului din pește de chefal și de vițel, în combinații cu diverse substanțe active :

- iodoform
- clorura de zinc
- hidrogeluri colagenice cu alge
- hidrogeluri colagenice cu chitosan și alge marine
- Solubilizarea iodoformului s-a realizat cu Tween 80, iar stabilizarea în emulsie, cu ulei de ricin.



## VI.2.1 REZULTATELE STUDIILOR REOLOGICE PE FORMULĂRI CU COLAGEN DIN VIȚEL

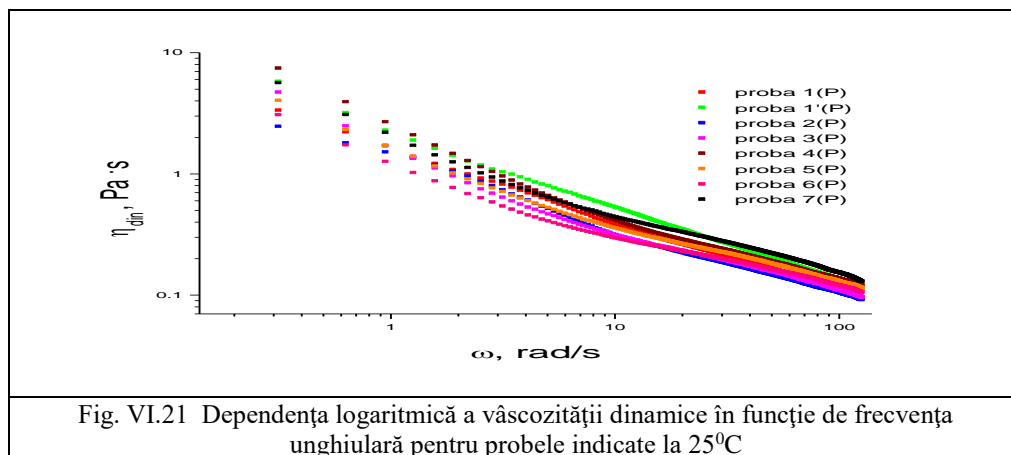
Caracterizarea prin comportare reologică dinamică. Comportarea vâscoelastică se poate determina din măsurarea modulilor de elasticitate sau de stocare  $G'$  și a celor de pierdere sau de vâscozitate  $G''$  la amplitudini ale deformației suficient de mici, pentru ca materialele să prezinte răspuns vâscoelastic liniar. Astfel, valori mari ale lui  $G'$  indică preponderența proprietăților elastice, iar valori mari ale lui  $G''$ , predominanța proprietăților vâscoase. În același timp, cei doi moduli oferă date despre distincția dintre sistemele reticulate și nereticulate, în sensul în care în cazul celor reticulate, cei doi moduli au valori foarte mari, iar curbele care dau dependența acestora de frecvența aplicată, sunt aproape paralele. Pentru sistemele nereticulate, nu există nici o relație între cei doi moduli sau variația acestora cu frecvența. Colagenul din vițel, s-a utilizat în concentrație de 1,72%, fiind diluat din concentrația sa inițială de 2.82%.

## VI.2.3 REOGRAMELE OBȚINUTE PENTRU PROBELE DE COLAGEN EXTRAS DIN PIELE DE PEȘTE

Colagenul izolat din pielea de *Grey Mullet*, a fost caracterizat reologic, în stare nativă și în combinații de hidrogeluri cu concentrații variabile de iodoform între 1%,2%, 3%, 4% și 5%, conform Tabelului VI.13. Toate experimentele au fost efectuate la 25 °C și reproduse de două ori cu o precizie bună.

Tabelul VI.13 Compozițiile pentru colagenul izolat din pielea de Grey Mullet

Proba	Compoziție (colagen pește)
1(P)	Colagen 0,4% în acid acetic 0,1M
1(P')	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04% în acid acetic 0,1M
2(P)	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04%, Tween 2,4%, ulei 1,16% în acid acetic 0,1M
3(P)	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04%, Tween 2,4%, ulei 1,16%, iodoform 1% în acid acetic 0,1M
4(P)	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04%, Tween 2,4%, ulei 1,16%, iodoform 2% în acid acetic 0,1M
5(P)	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04%, Tween 2,4%, ulei 1,16%, iodoform 3% în acid acetic 0,1M
6(P)	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04%, Tween 2,4%, ulei 1,16%, iodoform 4% în acid acetic 0,1M
7(P)	Colagen 0,4%, acid tanic 0,04%, Tween 2,4%, ulei 1,16%, iodoform 5% în acid acetic 0,1M



Din analiza reogramelor prezentate în Fig.VI.21 pentru probele de colagen din pește și combinațiile sale cu iodoform, rezultă că cea mai mare vâscozitate o prezintă probele de colagen reticulat cu Acid tanic. Se pot trage următoarele concluzii:

- Agentul de reticulare crește vâscozitatea colagenului.

- Analiza reogramelor combinațiilor de collagen pește, cu iodoform de diverse concentrații ,arată că ,cea mai mare vâscozitate o prezintă concentrația de 5% în iodoform.
- Vâscozitatea scade progresiv în ordinea descrescătoare a concentrației de iodoform, iar cea mai mică vâscozitate o prezintă proba de collagen reticulat și în prezență de Tween 80, ceea ce demonstrează că agentul tensioactiv pe lângă faptul că scade tensiunea superficială, reduce și vâscozitatea preparatului.

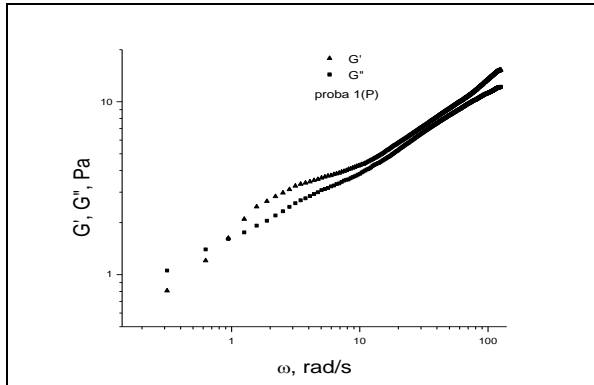


Fig. VI.24a Modulii de stocare și de pierderi pentru collagenul din pește nereticulat

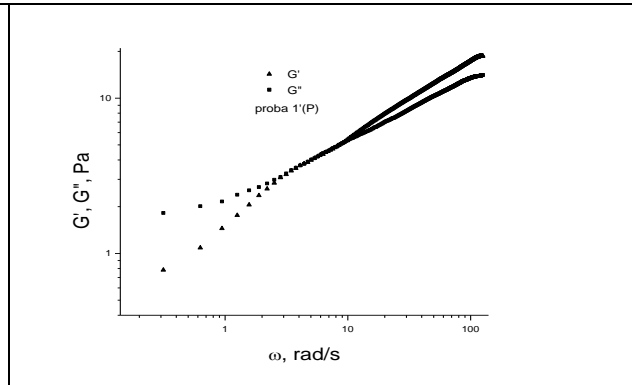


Fig. VI.24b Modulii de stocare și de pierderi pentru collagenul din pește reticulat cu Acid Tanic

Dependența logaritmică a modulilor de stocare și de pierderi în funcție de frecvența unghiulară pentru proba 1(P), collagen pește nereticulat la 25°C, este prezentată în Fig.VI.24a., iar pentru collagenul din pește reticulat în Fig.VI.24b. Proba prezintă un punct de gel la aprox. 1 rad/s, sub această valoare proba fiind preponderent vâscoasă, iar peste această valoare având predominant caracter de gel.

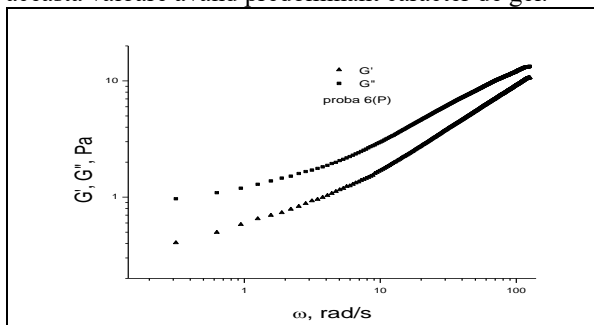


Fig. VI.29 Modulii de stocare și de pierderi pentru collagen de pește și iodoform 4%

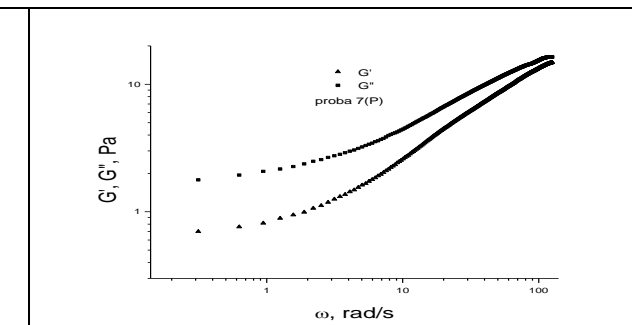


Fig.VI.30 Modulii de stocare și de pierderi pentru collagen de pește și iodoform 5%

Dependența logaritmică a modulilor de stocare și de pierderi în funcție de frecvența unghiulară pentru proba 6(P) și 7(P) la 25°C, indică faptul că proba este preponderent în stare vâscoasă pe întreg domeniul de frecvențe unghiulare, conform Fig.VI.29, și Fig. VI.30.

### VI.3 STUDII DE MICROSCOPIE OPTICĂ A FORMULĂRILOR PE COLAGEN DIN PEȘTE CHEFAL (*Grey Mullet*)

Morfologia de suprafață a hidrogelurilor a fost studiată prin scanarea de microscopie optică. S-a utilizat tehnica diferenței de cale optică (OPD) pentru a cuantifica organizarea fibrelor de collagen în timpul reparației cutanate și pentru a urmări distribuția substanțelor active încorporate. Peliculele sunt realizate din collagen din pește, reticulate cu Acid tanic și combinate cu substanțele active. Imaginile de microscopie optică au fost realizate la microscopul cu cameră optică, Olympus. Ca și probă martor, pentru aprecierea distribuției și conformației fibrelor de collagen, s-au efectuat studii de microscopie pe pelicule de hidrogel de collagen nativ din pește, reticulat cu Acid Tanic.

Fig.VI.31, prezintă imaginile de microscopie optică pentru peliculele de collagen din pește reticulat. Se observă structurile lamelare, în care se disting fibrile de collagen

#### Pelicule de collagen din piele de chefal

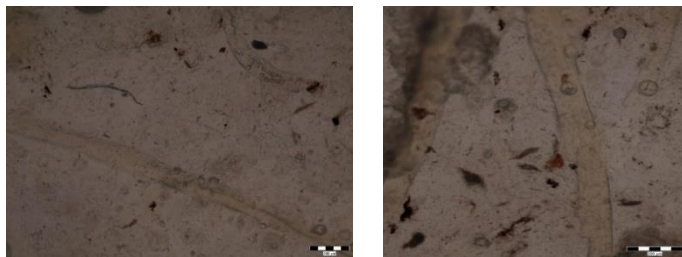
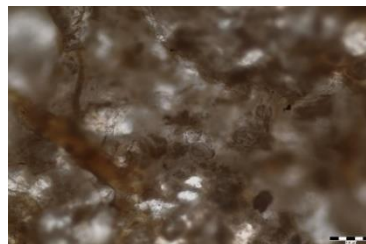


Fig.VI.31 Imagini de microscopie optică pentru peliculele de collagen reticulat

#### Peliculă cu clorură de zinc



32 Imagini de microscopie optică pentru peliculele de collagen din pește cu clorură de zinc

#### Pelicule de collagen din pește cu oxitetracilină



Fig. VI.33 Imagini de microscopie optică pentru peliculele de collagen din pește cu oxitetracilină

#### Peliculă cu iodoform

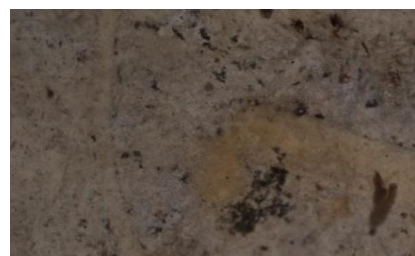


Fig VI.34 Imagini de microscopie optică pentru peliculele de collagen din pește cu iodoform

Fig.VI.32 prezintă peliculele cu clorură de zinc 1%. Modificările morfologice se datorează componentelor de substanțe active, care se accentuează cu mărirea cantității.

Fig.VI.33 prezintă peliculele cu oxitetracilină 1%. Introducerea acestor substanțe în hidrogeluri dă peliculele cu aglomerate de fibrile, dimensiuni și distribuții ale porilor mai mari comparativ cu martorul, respectiv peliculele de collagen nativ, iar Fig.VI.34 prezintă peliculele cu iodoform.

#### Pelicule din compozit pelicule de Collagen cu Chitosan și Alge marine

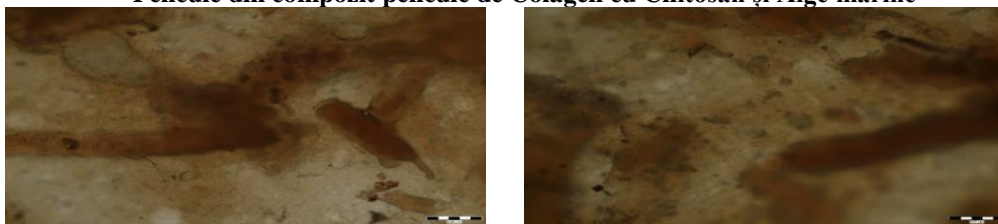


Fig. VI.35 Imagini de microscopie optică pentru peliculele de Collagen cu Chitosan Masă molec. medie + Extract de alge 10%

Figurile VI.35 și VI.36, redau imaginile obținute prin microscopie optică pentru peliculele de compozit realizate din collagen din pește *Grey Mullet* cu două tipuri de chitosan: cu greutate moleculară mică și greutate moleculară mare, în care s-au încorporat extracte hidroalcoolice din alge marine.

Studii de microscopie optică: Imaginile OPD arată :

- menținerea structurii lamelare pentru peliculele obținute din hidrogelurile acide pentru cantitatea minimă de substanță activă, respectiv oxitetracilină, clorură de zinc, iodoform sau extracte de alge marine, dar lamelele sunt mai groase și mai puțin distanțate decât pentru martor.



- modificările morfologice se datorează reticulării produse de componentele active antimicrobiene și/sau celor din extractele de alge, care se accentuează cu mărirea cantității.

## CAPITOLUL VII CERCETĂRI PRIVIND CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A UNOR PREPARATE CU COLAGEN EXTRAS DIN PEȘTE GREY MULLET DIN MAREA NEAGRĂ

**Obiectivul studiului** constă în a evidenția existența activității antioxidante a formelor farmaceutice preparate din hidrolizate de collagen marin obținut din pește din Marea Neagră, în care au fost încorporate diferite substanțe.

**Motivația studiului** a fost generată de necesitatea studierii proprietăților unor noi formulări farmaceutice destinate cicatrizării și viedării rănilor și escarelor bolnavilor diabetici.

### VII.1 DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A COLAGENULUI DIN PEȘTE PRIN CHEMILUMINESCENȚĂ

Scopul studiului este de a determina activitatea antioxidantă totală prin metoda chemiluminescenței atât la hidrolizatul collagenic cât și la geluri preparate cu hidrolizate collagenice, și anume:

hidrolizat collagenic în soluție alcoolică și iodoform de diferite concentrații,

hidrolizat collagenic în soluție alcoolică și Zn Cl<sub>2</sub> 30%,

hidrolizat collagenic în soluție alcoolică și Zn Cl<sub>2</sub> 30% și iodoform de diferite concentrații,

hidrolizat collagenic în soluție alcoolică și heparină.

#### Materiale și metodă

În această metodă atât antioxidanții solubili în apă cât și în lipide pot fi măsurați în câteva minute fără o preparare laborioasă a probelor. [Negreanu-Pîrjol T., 2012]. Criteriul important pentru alegerea metodei ACL prin fotochemiluminescență include timpul scurt necesar analizei respective și al pregătirii probei. Varietatea de probe ce pot fi măsurate cu această tehnică este mare. Principiul fotochemiluminescenței este bazat pe excitarea fotochimică a probei, care duce la o creștere accelerată a reacțiilor de până la de 100 de ori mai mare față de condițiile normale.

#### Rezultate și discuții

Pentru cuantificarea capacității antioxidante măsurate, s-a trasat curba etalon folosind substanța standard: Troloxul (derivat de vitamina E). Rezultatele sunt redată în nmol/probă. În Fig. VII.4 și VII.5 sunt prezentate curba etalon și respectiv curbele înregistrate de aparat pentru probele luate în lucru.

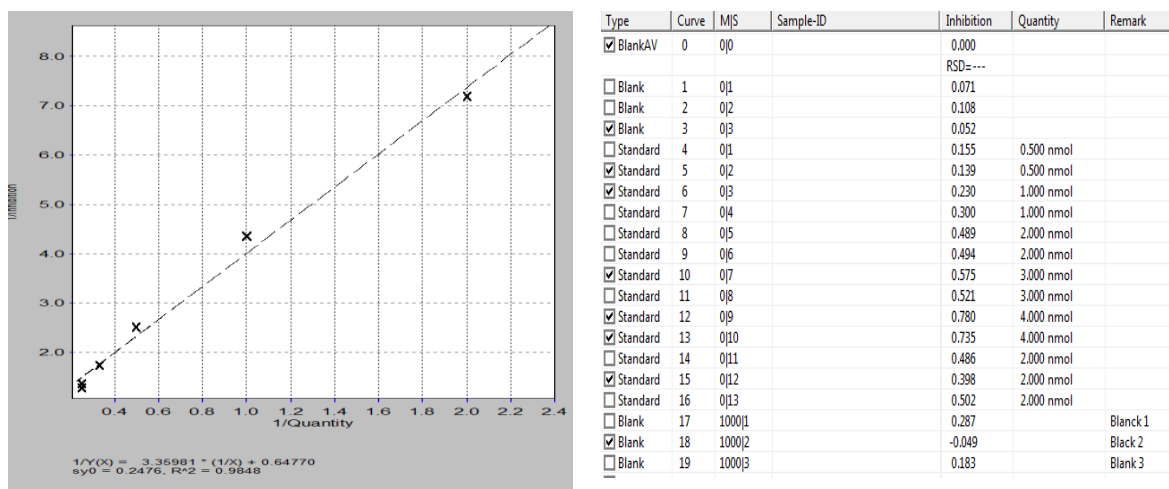
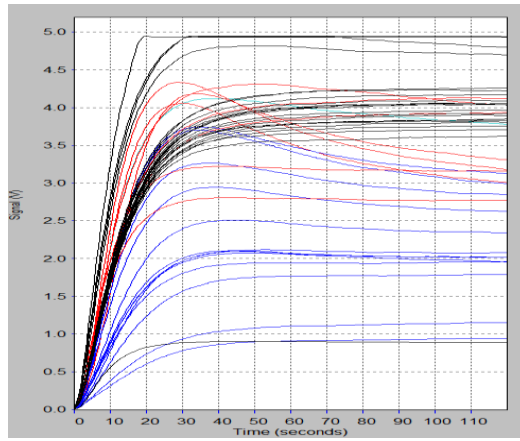


Fig. VII.4 Curba etalon pentru standardele folosite la determinarea capacității antioxidante totale prin chemiluminescență

În Tabele VII.3, VII.4 și VII.5 sunt sistematizate rezultatele obținute pentru capacitățile antioxidante totale care au soluțiile de collagen din pește (Chefal din Marea Neagră) :

- diferite concentrații de collagen în soluții apoase
- diferite concentrații de collagen în soluții alcoolice de etanol 40%

- diferite concentrații de colagen în soluții alcoolice de etanol 50%



Type	Curve	MJS	Sample-ID	Inhibition	Quantity	Remark
<input type="checkbox"/> Sample	20	1001j1	Colagen+Apa_sol.etalon	-0.253	(-0.979 nmol)	stoc 5mcl
<input type="checkbox"/> Sample	21	1002i1	Colagen+Apa_sol.etalon	0.773	2.991 nmol	stoc 10mcl
<input type="checkbox"/> Sample	22	1002j2	Colagen+Apa_sol.etalon	-0.247	(-0.957 nmol)	stoc 10mcl
<input type="checkbox"/> Sample	23	1003i1	Colagen 1Aq apa	-0.199	(-0.771 nmol)	stoc 10mcl
<input type="checkbox"/> Sample	24	1004i1	Colagen 2Aq apa	-0.279	(-1.081 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	25	1005i1	Colagen 3Aq apa	0.118	(0.456 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	26	1006i1	Colagen 4Aq apa	0.060	(0.234 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	27	1007i1	Colagen 5Aq apa	0.095	(0.368 nmol)	stoc 10mcl
<input type="checkbox"/> Blank	28	1000j4		0.047		Blank 4
<input checked="" type="checkbox"/> Blank	29	1000j5		-0.003		Blank 5
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	30	1008i1	Colagen 2Aq apa	0.073	(0.283 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	31	1009i1	Colagen 1Aq apa	0.060	(0.233 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	32	1010i1	Colagen+Alcool 40%_sol.etalon	-0.034	(-0.133 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	33	1011i1	Colagen_1_40%	0.072	(0.280 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	34	1012i1	Colagen_2_40%	0.084	(0.323 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	35	1013i1	Colagen_3_40%	0.035	(0.136 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	36	1014i1	Colagen_4_40%	0.045	(0.175 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	37	1015i1	Colagen_5_40%	0.024	(0.091 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	38	1016i1	Colagen+Alcool 50%_sol.etalon	-0.015	(-0.059 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	39	1017i1	Colagen_1_50%	0.053	(0.205 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	40	1018i1	Colagen_2_50%	0.025	(0.097 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	41	1019i1	Colagen_3_50%	0.003	(0.011 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	42	1020i1	Colagen_4_50%	0.015	(0.059 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	43	1021i1	Colagen_5_50%	0.018	(0.071 nmol)	stoc 10mcl
<input checked="" type="checkbox"/> Sample	44	1022i1	Heparina_sodi_3000UI/ml_etalon	-0.025	(-0.998 nmol)	stoc 10mcl

Fig. VII.5 Rezultate pentru CTA pentru amestecuri de colagen

Tabelul VII.3 Rezultate obținute pentru probele de colagen în soluții apoase

Nr. probă/compoziția compozitului gelic	Volum probă utilizat (μL)	Timpul de analiză (sec)	Inhibiția	(nmol/volum probă)	Constatări
P1- Colagen în apă	10	120	0,773	2.991	Prezintă activitate antioxidantă
P2- Colagen în apă	10	120	0.118	0.456	Prezintă activitate antioxidantă
P3- Colagen în apă	10	120	0.095	0.368	Prezintă activitate antioxidantă
P4- Colagen în apă	10	120	0.073	0.283	Prezintă activitate antioxidantă
P5 - Colagen în apă	10	120	0.061	0.234	Prezintă activitate antioxidantă
P6 - Colagen în apă	10	120	0.060	0.233	Prezintă activitate antioxidantă

Se constată că hidrolizatul de colagen în soluție apoasă prezintă activitate antioxidantă în toate probele analizate. CTA (capacitatea antioxidantă totală) scade cu creșterea diluției probelor.

Tabelul VII.4 Rezultate obținute pentru probele de colagen în soluții alcoolice cu concentrații de 40% alcool etilic

Nr. probă/compoziția compozitului gelic	Volum probă utilizat (μL)	Timpul de analiză (sec)	Aria de Inhibiție	(nmol/volum probă)	Constatări
C1 - Colagen 1 + alcool 40%	10	120	0.084	0.323	Prezintă activitate antioxidantă
C2 - Colagen 2 + alcool 40%	10	120	0.072	0.280	Prezintă activitate antioxidantă
C3 - Colagen 3 + alcool 40%	10	120	0.035	0.186	Prezintă activitate antioxidantă
C4 - Colagen 4 + alcool 40%	10	120	0.045	0.175	Prezintă activitate antioxidantă
C5 - Colagen 5 + alcool 40%	10	120	0.024	0.091	Prezintă activitate antioxidantă

Tabelul VII.5 Rezultate obținute pentru probele de colagen în soluții alcoolice cu concentrații de 50% alcool etilic

Nr.probă/compoziția compozitului gelic	Volum de probă utilizat ( $\mu\text{L}$ )	Timpul de analiză (sec.)	Aria de Inhibiție	(nmol/ volum probă)	Constatări
B1 - Colagen 1 + alcool 50%	10	120	0.053	0.205	Prezintă activitate antioxidantă
B2 - Colagen 2 + alcool 50%	10	120	0.025	0.097	Prezintă activitate antioxidantă
B3 - Colagen 3 + alcool 50%	10	120	0.003	0.011	Prezintă activitate antioxidantă
B4 - Colagen 4 + alcool 50%	10	120	0.018	0.071	Prezintă activitate antioxidantă
B5 - Colagen 5 + alcool 50%	10	120	0.015	0.059	Prezintă activitate antioxidantă

Se constată că hidrolizatul de colagen în soluții alcoolice prezintă de asemenea activitate antioxidantă în probele analizate. CTA (capacitatea antioxidantă totală) scade cu creșterea diluției probelor. Soluțiile apoase de colagen au CTA cea mai mare (probele P1-P6 cu valoarea maximă 2,991 și minimă de 0.233 nmoli/volum probă). Se constată de asemenea că hidrolizatul colagenic prezintă activitate antioxidantă mai mare în soluții de 40% alcool etilic (probele C1-C5 cu valoarea maximă de 0,323 și minim de 0,091 nmoli/ volum probă) față de aceleași concentrații de colagen în soluții de 50% alcool etilic (probele B1-B5 cu valoarea maximă de 0,205 și minimă de 0,059 nmoli/ volum probă). Din studiul realizat pe formulări farmaceutice preparate din hidrolizat colagenic din pește cu diferiți componenți se pot următoarele concluzii:

- Din studiul CTA (capacității antioxidante totale) prezentată de hidrolizatul din colagen din pește marin în soluții apoase și alcoolice:
- Se constată de asemenea că hidrolizatul colagenic prezintă activitate antioxidantă mai mare în soluții de 40% alcool etilic (probele C1-C5 cu valoarea maximă de 0,323 și minim de 0,091 nmoli/ volum probă) față de aceleași concentrații de colagen în soluții de 50% alcool etilic (probele B1-B5 cu valoarea maximă de 0,205 și minimă de 0,059 nmoli/ volum probă).
- Se constată că toate probele cu soluțiile apoase și alcoolice de colagen și soluții de concentrații diferite de Iodoform prezintă ACL (activitate antioxidantă) prin valorile pozitive obținute. Cea mai mare capacitate antioxidantă o prezintă soluțiile de Iodoform în soluții apoase de colagen din pește (valori cuprinse între 0,891 și 0,437 nmoli/ volum probă) față de colagenul în soluții alcoolice de 40% alcool etilic cu Iodoform (valori cuprinse între 0,254 și 0,179 nmoli/ volum probă). Cele mai mici rezultate au fost obținute de colagenul în soluții alcoolice de 50% alcool etilic cu Iodoform (valori cuprinse între 0,191 și 0,086 nmoli/ volum probă).

## CAPITOLUL VIII

### CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ ȘI STUDII COMPARATIVE *IN VIVO* PE FORMULĂRI FARMACETICE SEMISOLIDE PA BAZĂ DE COLAGEN

Studiile antimicrobiene ale biomaterialelor obținute din colagenul extras din piele de *Grey Mullet* s-au efectuat pe două tipuri de bacterii patogene și anume, o bacterie gram-pozitivă, *Staphylococcus aureus* și una gram-negativă, *Escherichia coli*.

*Staphylococcus aureus* produce infecții supurative sau septicemii, infecții ale pielii și ale țesuturilor moi, determină infectarea secundară a plăgilor. *Escherichia coli* este mai puțin importantă pentru răni.

#### VIII.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A FORMULĂRILOR FARMACEUTICE PE *ESCHERICHIA COLI*

##### VIII.2.1. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ PENTRU HIDROGELURI CU *ESCHERICHIA COLI*

Pentru concentrațiile de 3% în substanțe active, din VIII.13, se poate observa faptul că se pastrează ierarhizarea activității antimicrobiene, iar aceasta crește o dată cu creșterea concentrației (Fig. VIII.17).

Pentru clorura de zinc, conform Fig. VIII.16, zona de inhibiție crește de la 5 cm, cât reprezintă inhibiția produsă de colagenul nativ, la 6 cm. Aceleași valori crescătoare le observăm la amestecul cu oxitetraclină, care îmbunătățește semnificativ, activitatea antibacteriană a colagenului nativ.

Activitatea antimicrobiană pe hidrogelurile cu substanțe active, s-a urmărit comparativ, pe două concentrații diferite: 1%, respectiv 3%.

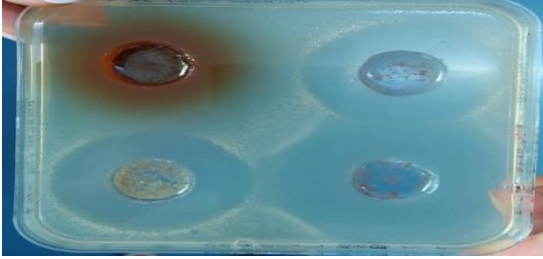


Fig.VIII.13. Activitatea antimicrobiană a collagenului de pește pe *Escherichia coli* concentrații 1%  
1- Collagen pește – Martor, 2-Colagen pește + Iodoform 1%, 3-Colagen Pește + Oxitetraciclina 1%, 4-Colagen pește + Clorura de zinc 1%

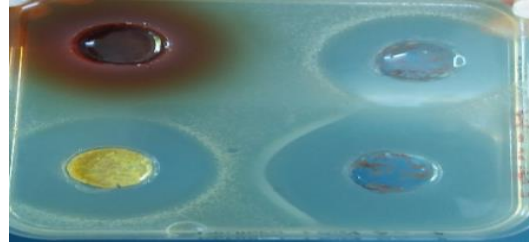


Fig.VIII.14. Activitatea antimicrobiană a collagenului de pește pe *Escherichia coli* concentrații 3%  
1- Collagen pește – Martor, 2-Colagen pește + Iodoform 3%, 3-Colagen Pește + Oxitetraciclina 3%, 4-Colagen pește + Clorura de zinc 3%

Studiile comparative ale inhibiției generate de hidrogelurile din pește cu concentrații variate, 1% și 3%, sunt prezentate în Fig. VIII.17. Se remarcă o creștere a zonelor de inhibiție, ceea ce confirmă faptul că există o dependență liniară între concentrație și zona de inhibiție indusă.

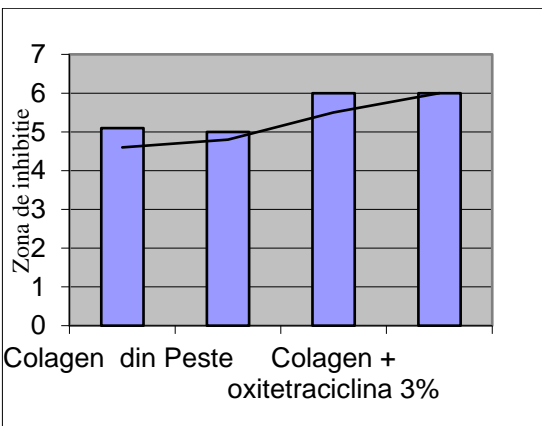


Fig.VIII.16 Activitatea antimicrobiană a combinațiilor de hidrogeluri în concentrație de 3%

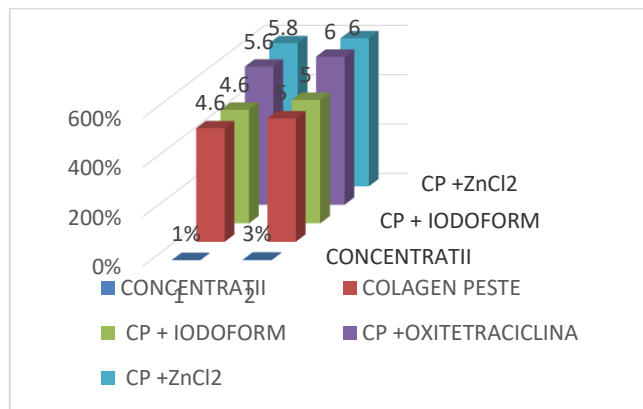


Fig. VIII.17 Variația activității antimicrobiene în funcție de concentrație

### VIII.2.2 ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A HIDROGELURILOR CU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Un alt obiectiv al studiului l-a reprezentat evaluarea activității antimicrobiene pe medii cultivate cu *Staphylococcus aureus*. Cele mai importante infecții cutanate sunt generate de acest germen, germen gram pozitiv. S-au urmărit inhibiția produsă pe hidrogeluri cu aceleași substanțe active, Oxitetraciclina 1%, Iodoform 1%, Clorură de zinc 1% și concentrațiile aferente 3%.

### VIII.2.3 ACTIVITATEA ANTIMICROBINĂ A PELICULELOR PE TULPINI DE *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*

Un alt obiectiv al studiului l-a reprezentat evaluarea activității antimicrobiene a peliculelor obținute din hidrogelul de pește *Grey Mullet* extras, pe medii cultivate cu *Staphylococcus aureus*. Peliculele impregnate cu diverse substanțe active, au fost atașate pe mediul nutritiv, pe cât posibil în arii egale de 2/2 cm, pentru evaluarea corectă a zonelor de inhibiție generate.

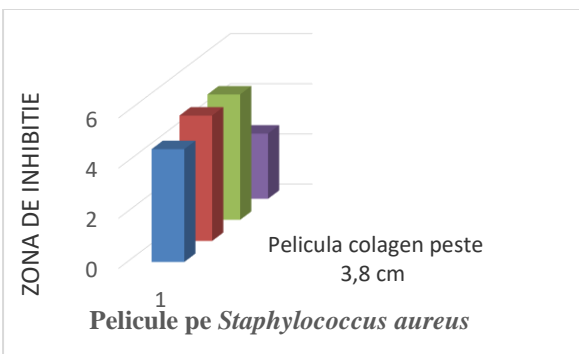


Fig.VIII.24 Activitatea antimicrobiană pe *Staphylococcus aureus*

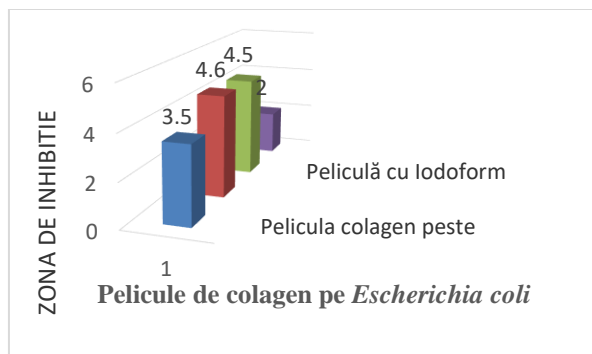


Fig. VIII.25 Activitatea antimicrobiană pe *Escherichia coli*

Activitatea pe *Staphylococcus aureus* evidențiază o inhibiție maximă a hidrogelului cu oxitetraciclina, 5 cm zona de inhibiție, urmată de mixtul cu iodoform, 4.6 cm (Fig.VIII.24)

Inhibiția pe *Escherichia coli* păstrează ierarhia combinațiilor de hidrogeluri, având oxitetraciclina pe primul loc, cu 4.6 cm arie de inhibiție. Studiul activității antimicrobiene pe cele 2 tulpini, demonstrează faptul că există activitate de inhibiție generată de peliculele obținute, fapt ce oferă posibilitatea utilizării lor ca biomateriale, în domeniul medical și farmaceutic.

### VIII.3 STUDII IN VIVO PE FORMULĂRI FARMACETICE - HIDROGELURI COLAGENICE DIN PEȘTE MARIN GREY MULLET DIN MAREA NEAGRĂ

Un alt obiectiv important, al prezentei teze l-a reprezentat testarea *in vivo* a biomaterialelor obținute din colagenul marin extras și prezentat în Capitolul IV. S-au studiat biomaterialele obținute din hidrogelurile combinate cu aceleași substanțe active, prezentate în capitolul V. S-au efectuat studii comparative, pe hidrogelurile din colagen de vițel și colagenul din pește chefal. Acest studiu, prezentat în detaliu și în Capitolul IV, fost realizat la Institutul Național Victor Babeș București iar din punct de vedere etic, a fost realizat în conformitate cu Legislația Națională, sub Autorizația nr. 342 / 04.04.2017.

#### VIII.3.1 MATERIALE ȘI METODĂ PENTRU STUDIILE IN VIVO PE HIDROGELURI COLAGENICE

Materialele și tehnica de lucru utilizate au fost prezentate în Capitolul IV. Hidrogelurile utilizate au avut ca bază hidrogelurile extrase din piele de chefal și hidrogelul de vițel, obținut de la Institutul Național de Pielărie. Acestea au fost combinate cu: Oxitetraciclina, Iodoform în concentrație de 1%. S-a urmărit astfel, evaluarea capacității de vindecare, pe concentrații minime de substanțe active. S-au efectuat următoarele mixuri de hidrogeluri: Studiul a fost efectuat pe un lot de 7 șoareci, care au fost urmăriti pe o perioadă de 6 zile, în perioada 12.06.2017 - 19.06.2017 și a urmărit mai multe etape. Constituirea grupurilor de lucru: șoarecii au fost repartizați aleatoriu în două grupe, incluzând grupul de control și control pozitiv. Martorii tratați cu colagen de vițel și colagen din piele de pește, grupul de control pozitiv, care include șoarecii tratați cu mixurile de colagen.

Modelul răniei de excizie a fost utilizat pentru studierea ratei de contracție a răniei și a epitelizării. Hidrogelurile respective au fost aplicate topic pe zona de rănire a animalelor din grupurile respective o dată pe zi până la epitelizarea completă, începând cu ziua de funcționare, timp de 7 zile. Mixurile de hidrogeluri de umplere au fost utilizate ca medicament de control pozitiv. Dintre parametrii determinării *in vivo*, s-au studiat: contracția procentuală a rănilor, perioada de epitelizare și măsurarea indicelui de rană.

#### Rezultate și Discuții

Pentru definitivarea studiului, s-a luat în calcul și o probă de hidrogel de pește, combinat cu cele două substanțe active, oxitetraciclina și iodoform (vezi Fig. VIII.47). Contractia procentuală a răniei, evidențiază la finalul studiului, anumite aspecte selectate și prezentate în Tabelul VIII.3.

Tabelul VIII.3 Aspectul plăgii pe tipuri și mixuri de colagen

	Proba Martor	Colagen + Oxitetraciclina 1%	Colagen + Iodoform 1%	Colagen + Iod1%+Oxi 1%
Colagen vițel	( 1) DESCHIS	(2) INCHIS	(3) DESCHIS	
Colagen Pește	(4) DESCHIS	(5) INCHIS	(6) INCHIS	(7) INCHIS

Unde: Deschis = plagă cu aspect discontinuu – vindecare întârziată

Inchis = plagă cu aspect continuu

Măsurarea indicelui de rană (Ind.R)

Pentru măsurarea indicelui de rană care a fost măsurat zilnic, s-a utilizat un sistem de notare arbitrar (vezi Tabelul VIII.4):

Tabelul VIII.4 Parametrii indicelui de rană în funcție de hidrogelul aplicat

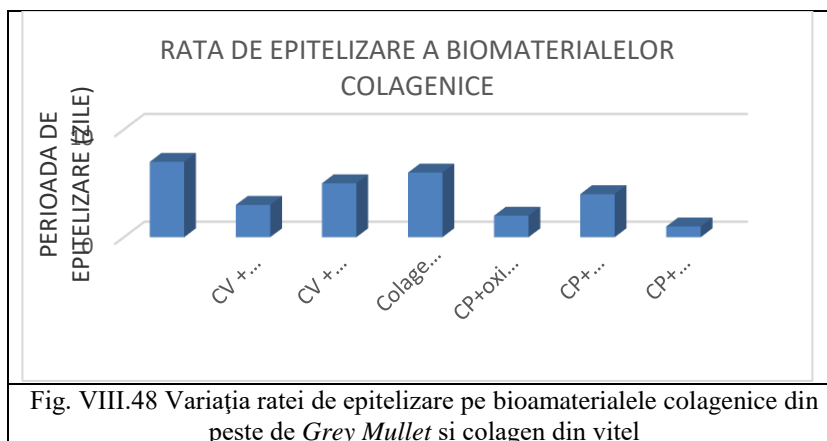
	Proba Martor	Colagen + Oxitetraciclina 1%	Colagen + Iodoform 1%	Colagen + Iod 1%+ Oxi 1%
Colagen vițel	P1 Ind.R 2	P2 Ind.R 1	P3 Ind.R 2	
Colagen Pește	P4 Ind.R 2	P5 Ind.R 1	P6 Ind.R 1	P7 Ind.R 0

Șoarecii 1, 4, 5, 7 – proces accelerat de vindecare raportat la martori. Dintre aceștia cel mai bine se prezintă P7 asocierea de Colagen pește cu substanțe antimicrobiene și antiseplice, oxitetraciclina +iodoform, precum și probele P1 și P5, respectiv hidrogelurile cu oxitetraciclina și iodoform, conform Fig. VIII.48. Rezultatele parametrilor urmăriți la finalul studiului: indice de epitelizare și rata de contracție, sunt prezentați în Tabelul VIII.5.

Tabelul VIII.5 Indicele terapeutic și rata de contracție

	Proba Martor	Colagen + Oxitetraciclina 1%	Colagen + Iodoform 1%	Colagen + Iod 1%+ Oxi 1%
Colagen vițel	P1: Ind.R 2- 2.3cm	P2 : Ind.R 1 - 2.3 cm	P3: Ind.R 2-2,35 cm	
Colagen Pește	P4: Ind.R 2 -2.3cm	P5 : Ind.R 1 - 2.45	P6: Ind.R 1-2.4 cm	P7: Ind.R 0 -2.5cm

Acțiunea de cicatrizare a colagenului atât de pește cât și de vițel, este potentată în special de prezența Oxitetracilinei, iar combinația Oxitetracilină, Iodoform, conferă produsului o eficiență maximă la aplicare. Hidrogelurile a căror activitate a fost îmbunătățită, prezintă și indici de vindecare accelerați față de colagenul nativ. Studiile comparative ale ratei de vindecare ale colagenului de vițel și cel din pește arată că un proces mai rapid de vindecare a prezentat colagenul din pește.



## CAPITOLUL IX

### STUDII IN VITRO PRIVIND CINETICA DE CEDARE A OXITETRACICLINEI DIN HIDROGELURI COLAGENICE

#### IX.1 MATERIALE ȘI METODE

A fost studiată cinetica cedării *in vitro* a oxitetracilinei din preparate semisolide realizate din hidrolizate de colagen din pește *Grey Mullet* și oxitetracilină.

Pentru analiza comparativă a profilurilor de cedare *in vitro* au fost utilizate celule verticale de difuzie corespunzătoare modelului A din capitolul 1724 al United States Pharmacopeia (Hanson Microette, Hanson Research Inc; sisteme de 6 celule). Reprezintă unități de testare de tip Franz, în cadrul cărora doze pseudoinfinite de produse semisolide destinate administrării locale au fost aplicate în condiții ocluzive. Mediul receptor a fost reprezentat de un amestec hidroalcoolic (30% etanol absolut de puritate cromatografică în apă purificată, v/v), capabil să asigure o solubilitate adecvată analitului de interes. După degazare prin filtrare la temperatura camerei sub vid, mediul a fost transferat în

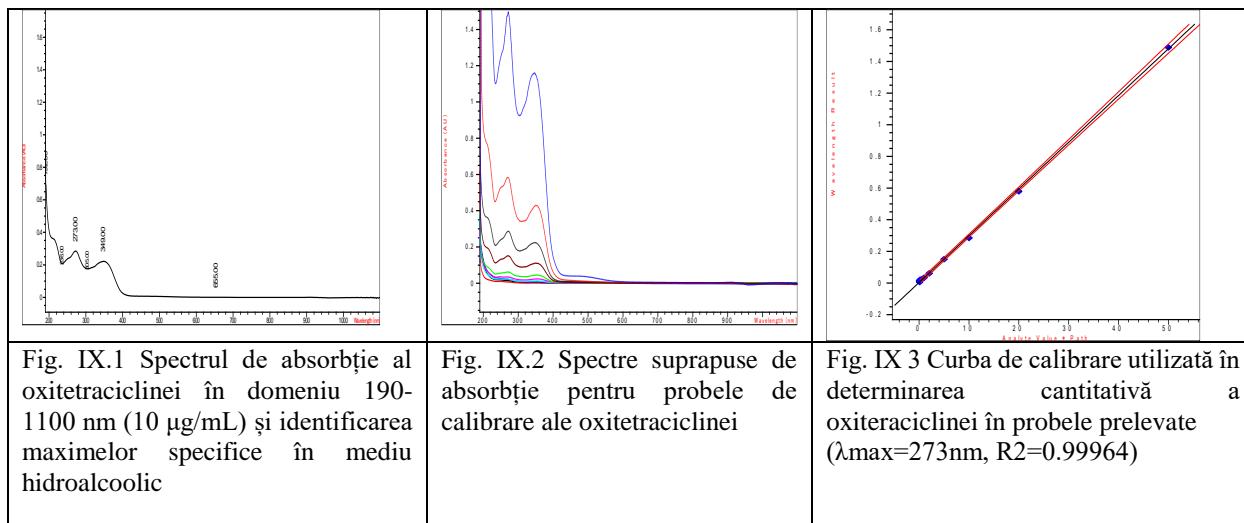
vase tampon și încălzit la  $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Compartimentul inferior, receptor, a avut un volum util de 10 mL, variațiile între celule fiind mai mici de 10% (corespunzător unui volum de 1 mL).

Au fost testate opt formulări semisolide topice în triplicat, iar codificarea utilizată în continuare este de tip F1 – F8. În dezvoltarea protocolului experimental au fost utilizate mai multe tipuri de membrane hidrofiele, având porozitate variabilă. Formulările F7 și F8 au prezentat o compatibilitate redusă cu polimerii din compoziția interfețelor uzuale (polisulfonă, polieter-sulfonă, amestecuri de esteri de celuloză, chiar fibră de sticlă. Pentru formulările F5 și F6 s-a observat că pierderea integrității a survenit după un interval de 4 ore. Astfel, protocolul de lucru a fost adaptat după cum urmează:

- s-a optat pentru excluderea formulărilor F7 și F8 din analiza profilelor de cedare *in vitro*;
- pentru formulările F1, F2, F3 și F4, durata testelor a fost de 6 ore, iar prelevările manuale ale probelor de 0.5 mL din mediul receptor s-au efectuat la 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 și 360 de minute după aplicare și pornirea agitării (600 rpm, prin intermediul unor bare magnetice având atașate spire de inox);
- pentru formulările F5 și F6, durata testelor a fost redusă la 3 ore, iar colectarea probelor s-a efectuat la 15, 30, 60, 90, 120 și 180 de minute;
- în toate cazurile, membranele artificiale de nylon cu por de  $0.45 \mu\text{m}$  au fost îmbibate în mediul receptor degazat timp de 30 de minute;
- probele au fost colectate în tuburi Eppendorf de 1.5 mL, preetichetate;
- prelevarea s-a realizat în circuit închis (evacuare și înlocuire simultană cu mediu blank, după oprirea agitării și la un debit aproximativ de 1 mL/min);
- determinarea cantitativă a analitului de interes (oxitetraclină) s-a efectuat prin aplicarea unei metode spectrofotometrice (spectrofotometru tip Agilent 8453, Agilent Instruments, Germania), dotat cu detector de tip șir de diode și ansamblu de 8 cuve de cuarț, cu drum optic declarat de 10.00 mm.

## IX.2 REZULTATE OBTINUTE

S-a obținut mai întâi spectrul de absorbție al oxitetraclinei în domeniu 190-1100 nm ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), prezentat în Fig. IX.1.



Apoi s-au realizat spectrele suprapuse de absorbție pentru probele de calibrare ale oxitetraclinei, prezentate în Fig. IX.2. Curba de calibrare utilizată în determinarea cantitativă a oxitetraclinei în probele prelevate este prezentată în Fig. IX.3. Concentrațiile și cantitățile totale de oxitetraclină cedate din formulările experimentale sunt prezentate în continuare, pentru fiecare timp de prelevare și pentru fiecare unitate de testare (celulă verticală de difuzie). Analiza datelor experimentale a inclus evaluarea variabilității (statistica descriptivă) și aplicarea modelului de cedare Higuchi. Ulterior au fost considerate cinetici alternative (de tip 0), care au fost interpretate din perspectiva etapei limitante de viteză. Formulări: F1 (celulele 1-3) F2 (celulele 4-6). Pentru cele 6 celule au fost stabilite concentrațiile pentru oxitetraclină prezentate în Tabelul IX.1 Cantitățile totale cedate de oxitetraclină raportate la unitatea de suprafață sunt prezentate în Tabelul IX.2. Elementele de statistică descriptivă pentru cedarea oxitetraclinei (aplicarea modelului Higuchi;  $n=3$ ) sunt prezentate în Tabelul IX.3.

Profilele de cedare *in vitro* ale oxitetraclinei din formulările experimentale  
Tabel IX.10 Parametrii statistici pentru cedarea oxitetraclinei



(cinetica de ordin 0 comparative cu modelul Higuchi)

Cinetică de ordin 0	F1	F2	F3	F4
Viteză de cedare in vitro ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ )	3.09	1.76	0.29	0.36
Latentă (min)	-49.25	31.15	17.92	13.73
Coeficient de corelație (R2)	0.9941	0.9955	0.9977	0.9876
Model Higuchi	F1	F2	F3	F4
Viteză de cedare in vitro ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$ )	75.40	43.66	7.21	8.79
Latentă (min <sup>0.5</sup> )	-448.02	-204.86	-20.49	-33.18
Coeficient de corelație (R2)	0.9717	0.9895	0.9807	0.9722

Profilele medii de cedare ale oxitetraciclinei (n=3, medie  $\pm$  deviație standard) din formulările experimentale F1, F2, F3 și F4

cinetică de ordin 0

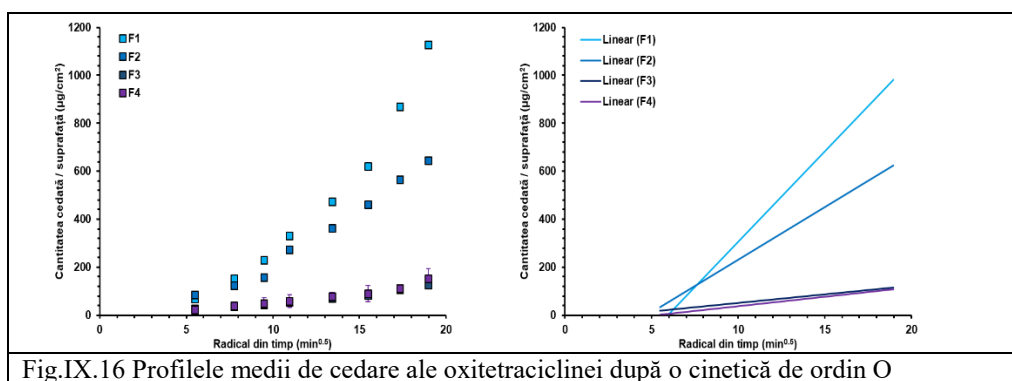


Fig.IX.16 Profilele medii de cedare ale oxitetraciclinei după o cinetică de ordin 0

model Higuchi (legea radicalului)

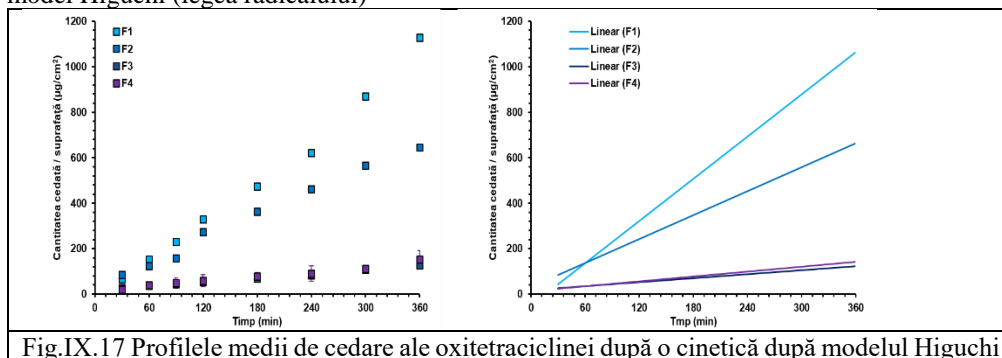


Fig.IX.17 Profilele medii de cedare ale oxitetraciclinei după o cinetică după modelul Higuchi

Profilele de cedare și parametrii cinetici trebuie comentate în funcție de compoziție:

Modelul Higuchi nu a fost aplicabil, ceea ce a demonstrat că procesul difuzional este însoțit de alte fenomene.

Cel mai probabil, componente ale formulărilor, altele decât oxitetraciclina, sunt transferate prin membrana artificială și joacă rolul de agent solubilizant în mediul receptor.



## CONCLUZII GENERALE

Din Capitolul IV se pot evidenția următoarele aspecte:

Din subcapitolul IV.1 **privind extracția colagenului din pielea de Grey Mullet** se pot trage următoarele concluzii:

- Colagenul din pielea de chefal *Grey Mullet* a fost izolat cu succes prin metoda cu tratament acid :cu acid acetic 0.5 M, acid clorhidric 0.1 M, cât și prin tratament enzimatic cu pepsină.
- Rezultatele au arătat că pepsina îmbunătățește eficiența de extracție în colagen, deoarece este capabilă să creeze în mod specific regiuni de telopeptidă a colagenului.
- Concentrația optimă a NaCl, utilizată pentru precipitarea colagenului a fost de 0.9M.
- Randamentele de extracție au variat între 47.3% la colagenul extras prin tratament acid, cu acid acetic 0.5 M, 31.5 % la extracția cu acid clorhidric și 7.10% la extracția cu pepsină.
- Reticularea s-a realizat cu acid tanic 2%, utilizat în proporție de 10% față de colagen.

Hidrolizatul colagenic obținut din *Grey Mullet* poate fi utilizat în continuare cu succes în obținerea de diferite formulări farmaceutice semisolide cu costuri reduse. Colagenul extras a fost caracterizat prin metode rapide de analiză, dar și prin metode fizico-chimice complexe, de mare acuratețe. Astfel se pot evidenția:

- Metodele rapide de caracterizare: prin determinarea azotului total, substanța proteică, pH-ul, conținutul de cenușă, de substanțe grase și conținutul de substanțe minerale, arată că puritatea colagenului din hidrogelul inițial corespunde utilizării sale ca biomaterial.
- Analiza cromatografică a evidențiat că în ambele situații, ASC și PSC au avut aceleași caracteristici, schema electroforetică tipică a colagenului tip I , constând din două lanțuri  $\alpha$  cu două tipuri distincte precum  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$ , variind în mobilitatea lor. Pozițiile electroforetice ale lanțurilor  $\alpha$  din colagenul din piele de chefal, obținut prin cele 2 tratamente, au fost similare și apropiate cu cele ale colagenului de bovine utilizat ca și martor, respectiv 120 kDa pentru lanțul  $\alpha 1$  și 110 kDa pentru lanțul  $\alpha 2$ .
- Pentru a cuantifica conținutul de colagen din soluțiile extrase, s-a determinat conținutul de hidroxiprolină ca un marker specific acestei proteine.
- Am realizat validarea metodei de analiză spectrofotometrică pentru determinarea hidroxiprolinei din pește marin.
- Prezența conformației de triplu helix a colagenului a fost determinată prin studii de spectroscopie UV -DC și FTIR.
- Spectrul UV-DC al hidrogelului cu concentrația 1,68% colagen în acid acetic 0,5 M demonstrează că extracția nu a afectat conformația de helix triplu a colagenului nativ.
- S-au obținut valori apropiate pentru parametrul Rpn valoarea 0,10 la colagen din pește și respectiv Rpn valoarea 0,12 la colagen din vițel. Aceste rezultate atestă faptul că în timpul extracției, structura helixului triplu al colagenului nu a fost afectată, iar hidrogelul colagenic obținut atât din piele de pește la fel ca și cel din piele de vițel se poate utiliza pentru biomateriale.
- Spectrele FT-IR al hidrolizatului colagenic din pielea peștilor de chefal, prezintă benzi de absorbție situate în banda amidică. Benzile de amidă I, II și III cunoscute a fi responsabile de gradul de ordine moleculară descoperite în colagen și de a fi implicate în formarea structurii sale de triplu helix. Acidul tanic nu modifică pozițiile benzilor amidă I-III, A și a grupei -CH<sub>2</sub>, necesare identificării conformației colagenului, respectiv prezenței sau absenței colagenului denaturat. Valorile AIII/A1450 >1, deci nu există colagen denaturat.
- Din analiza termogravimetrică a rezultat că temperatura de denaturare termică, a fost apreciată la 25,6 oC, ceea ce concordă cu datele din literatură, demonstrând prezența colagenului, în soluțiile hidrolizate obținute. Td este și un indicator al stabilității colagenului, aceasta variind cu conținutul de hidroxiprolină și anume cu cât aceasta este mai mare, cu atât structura elicoidală este mai stabilă.
- Din analiza de microscopie optică și electronică SEM, imaginile SEM au confirmat existența unei rețele de colagen compacte.
- În cazul ASC, a fost observat un burete de colagen, granulat cu fibrile neregulate dar dense.
- Pentru colagenul PSC, fibrilele sunt mai scurte, neregulate, dar care conferă același aspect poros al rețelei.
- Imaginile de microscopie optică, prin coloranții specifici pentru colagen fibrillar Tip I au demonstrat existența fibrelor de colagen, în hidrogelul studiat.
- Aceste rezultate dovedesc că metodele de extracție utilizate au avut un randament bun, iar hidrogelul obținut, are conținut de colagen, fibrilar Tip I.

Referitor la analiza reologică se poate concluziona că:

- Modelarea comportamentului reologic al colagenului extras prin tratament acid, s-a studiat folosind modelul Ostwald-de Waele. S-a confirmat astfel tipul de curgere.

- Toate hidrogelurile au comportare pseudoplastică, dar vâscozitățile sunt mult mai mari la o concentrație dată pentru cele extrase cu acid acetic 0.5 M.
- Reogramele colagenului din pește sunt similare cu ale celui din vițel, curbele de curgere fiind descrescătoare și dependente de forțele de forfecare.
- Proprietățile mecanice demonstrate ale colagenului: elasticitatea și vâscozitatea au o importanță substanțială pentru performanța materialelor.
- Consistența de gel precum și parametrii vâsco - elastici, influențează și cinetica de eliberare a medicamentelor din formulările farmaceutice preparate din acestea.

Din **studii comparative in vivo pe hidrolizatele colagenice din diferite surse** se poate evidenția că:

- La 7 zile postexcizie, și după 6 aplicări, rezultatele au fost în ordinea eficienței în procesul de cicatrizare: șoarecii nr 1-martor collagen vițel și 4 -martor collagen pește, au prezentat proces de vindecare încetinit raportat cu restul șoarecilor.
- Rata de vindecare, estimată prin contracția răni a fost de 2.3 cm la colagenul de pește și 2.1 cm la colagenul de vițel.
- Perioada de epitelizare a fost de 7 zile pentru colagenul de chefal și de 8 zile pentru colagenul din vițel.
- Măsurarea indicelui de rană a fost de 1 la hidrogelul de pește și 2 în cazul celui din vițel
- Dintre cei doi martori, un proces mai rapid de vindecare a prezentat colagenul din pește, comparativ cu cel din vițel.
- Colagenul însuși este considerat medicament respectiv principiu activ, fiind utilizat – sub diferite forme – ca hemostatic și pansament în tratamentul diferitelor tipuri de leziuni.

Din **Capitolul V** se pot trage următoarele concluzii:

- Hidrogelurile obținute au prezentat aspect omogen pentru toate combinațiile de substanțe active și în concentrațiile studiate:
- Hidrogelurile cu oxitetraciclină, prezintă omogenitate datorită solubilității substanței active. Acestea prezintă aspect și consistență gelică, iar variația substanței active nu modifică vâscozitatea preparatului.
- Hidrogelurile cu iodoform au consistență gelică, al căror aspect variază în funcție de concentrația substanței active. Solubilitatea iodoformului a fost crescută prin adăugare de Tween 80, iar stabilitatea sistemului prin adăugare de ulei de ricin. Creșterea concentrației substanței active determină creșterea vâscozității și intensificarea culorii.
- Hidrogelurile cu clorura de zinc sunt preparate omogene atât prin consistență cât și prin conținut de substanță, datorită hidrosolubilității substanței.
- Hidrogelurile compozit cu conținut de alge marine au fost supuse mai întâi maturării. Au aspect gelic, iar consistența și intensificarea culorii crește cu concentrația de alge sau extracte de alge încorporate. Toate gelurile care au pH neutru au vâscozitatea mult mai mare decât a celor cu pH-ul 3, astfel încât acestea nu mai pot fi supuse măsurătorilor reologice (se distrug sub acțiunea tensiunilor de forfecare).
- Considerând proprietățile de vindecare a rănilor deținute de collagen și alte combinații este de așteptat ca încorporarea extractelor de alge în hidrogeluri de collagen să conducă la obținerea de biomateriale sub forma de: hidrogeluri, matrici spongioase și membrane, destinate pentru tratarea rănilor deschise de diferite etiologii, neinfectate sau infectate.
- Au fost realizate membrane colagenice cu alge marine. Aceste formulări farmaceutice prezintă elasticitate bună, bioadezivitate și rezistență mecanică. Ele au fost testate într-un cabinet stomatologic, prin introducerea în sacul parodontal
- Omogenitatea gelurilor se reflectă și în omogenitatea matricilor poroase: astfel, matricile obținute au prezentat dimensiuni diferite ale porilor. Cele cu extracte din alge prezintă pori de diverse dimensiuni și destul de omogeni, matricile de *Ulva Lactuca* pori mai mari și mai diferiți ca dimensiuni, iar în matricea de *Cladophora vagabunda* se observă aglomerate, determinate de porțiunile în care gelul a fost mai vâscos.
- Puterea de încorporare a substanțelor active este crescută și păstrează omogenitatea hidrogelului inițial.

Din **Capitolul VI** se pot concluziona următoarele aspecte pentru colagenul din pește și formulările sale:

- Agentul de reticulare utilizat, Acidul tanic crește vâscozitatea colagenului.
- Reogramele hidrogelurilor arată că cea mai convenabilă concentrație pentru prepararea biomaterialelor – hidrogeluri și matrici poroase – este 1,68%.
- Reologia dinamică arată că hidrogelurile sunt predominant elastice. Componentele elastice cresc mai mult decât cele vâscoase, cu mărirea cantității de Acid tanic și creșterea cantităților de substanțe utilizate, ca și substanțe antimicrobiene. agentul de reticulare utilizat, acidul tanic crește vâscozitatea colagenului.
- Analiza reogramelor combinațiilor de collagen din pește, cu iodoform de diverse concentrații utilizate, arată că, cea mai mare vâscozitate o prezintă concentrația de 5% în iodoform.

- Vâscozitatea scade progresiv în ordinea descrescătoare a concentrației de iodoform, iar cea mai mică vâscozitate o prezintă proba de collagen reticulat și în prezență de Tween 80, ceea ce demonstrează că agentul tensioactiv pe lângă faptul că scade tensiunea superficială, reduce și vâscozitatea preparatului.
- Dependența logaritmică a modulelor de stocare  $G'$  și de pierderi  $G''$  în funcție de frecvența unghiulară pentru proba de collagen din pește și iodoform 2% la 25°C arată că proba este preponderent în stare de gel pe întreg domeniul de frecvențe unghiulare, iar pentru proba de collagen din pește și iodoform 3% la 25°C, arată că proba este preponderent în stare vâscoasă pe întreg domeniul de frecvențe unghiulare.
- Pentru collagenul din pește cu iodoform 4% și 5%, dependența logaritmică a modulelor de stocare  $G'$  și de pierderi  $G''$ , în funcție de frecvența unghiulară la 25°C, indică faptul că proba este preponderent în stare vâscoasă pe întreg domeniul de frecvențe unghiulare.

**Din Studiile de microscopie optică** realizate imaginile OPD arată:

- Menținerea structurii lamelare pentru peliculele obținute din hidrogelurile acide pentru cantitatea minimă de substanță activă, respectiv oxitetraclină, clorură de zinc, iodoform sau extracte de alge marine, dar lamelele sunt mai groase și mai puțin distanțate decât pentru martor.
- Modificările morfologice se datorează reticulării produse de componentele active antimicrobiene și/sau celor din extractele de alge, care se accentuează cu mărirea cantității
- La compozite, se observă că, comparativ cu imaginile peliculelor de collagen nativ, structura lamelară dispare, apare o distribuție largă și aglomerate de fibrile, care conferă o structură complexă a peliculelor. Collagenul își păstrează fibrilele, se constată o încorporare uniformă a conținutului de extracte din alge, iar chitosanul conferă structura compactă a preparatului. Collagenul își păstrează fibrilele, care încorporează uniform conținutul de extracte din alge, iar chitosanul conferă structura compactă a preparatului

**Din Capitolul VII referitor la Capacitatea antioxidantă** se pot evidenția:

- Din studiul CTA (capacității antioxidante totale) prezentată de hidrolizatul din collagen din pește marin în soluții apoase și alcoolice:
- Au fost analizate mai multe soluții apoase și alcoolice de concentrații de 40% și respectiv 50% alcool etilic. Toate soluțiile au prezentat activitate antioxidantă.
- Soluțiile apoase de collagen prezintă activitate antioxidantă evidentă (probele P1-P6 cu valoarea maximă 2,991 și minimă de 0,233 nmoli/ volum probă).
- Se constată de asemenea că hidrolizatul collagenic prezintă activitate antioxidantă mai mare în soluții de 40% alcool etilic (probele C1-C5 cu valoarea maximă de 0,323 și minim de 0,091 nmoli/ volum probă) față de aceleași concentrații de collagen în soluții de 50% alcool etilic (probele B1-B5 cu valoarea maximă de 0,205 și minimă de 0,059 nmoli/ volum probă).

Din studiul CTA (capacității antioxidante totale) prezentată de hidrolizatul din collagen din pește marin în soluții apoase și alcoolice și diferite substanțe cu acțiune terapeutică:

- Soluțiile apoase și alcoolice de collagen și heparină înregistrează activitate antioxidantă.
- Se constată că probele: Z3 – Collagen în alcool etilic 40% + ZnCl<sub>2</sub> 15%, Z4 – Collagen în alcool etilic 50% + ZnCl<sub>2</sub> 15% și Z7 – Collagen în alcool etilic 50% + ZnCl<sub>2</sub> 10% prezintă activitate antioxidantă cu valori pozitive atât pentru inhibiție cât și pentru activitatea totală antioxidantă. Cea mai mare activitate o prezintă proba Z3 (6,851 nmoli/ volum probă) care conține collagen în alcool etilic 40% + soluție ZnCl<sub>2</sub> 15%. În concluzie se constată că numai numai soluțiile alcoolice de collagen + ZnCl<sub>2</sub> prezintă activitate antioxidantă totală pe curbele studiate.
- Restul probelor preparate din collagen de pește + ZnCl<sub>2</sub> în soluții apoase și alcoolice prezintă inhibiție, însă valorile activităților antioxidante realizate nu se regăsesc pe curbele analizate.
- Se constată că toate probele cu soluțiile apoase și alcoolice de collagen și soluții de concentrații diferite de Iodoform prezintă ACL (activitate antioxidantă) prin valorile pozitive obținute. Cea mai mare capacitate antioxidantă o prezintă soluțiile de Iodoform în soluții apoase de collagen din pește (valori cuprinse între 0,891 și 0,437 nmoli/ volum probă) față de collagenul în soluții alcoolice de 40% alcool etilic cu Iodoform (valori cuprinse între 0,254 și 0,179 nmoli/ volum probă). Cele mai mici rezultate au fost obținute de collagenul în soluții alcoolice de 50% alcool etilic cu Iodoform (valori cuprinse între 0,191 și 0,086 nmoli/ volum probă).
- În toate probele amestecurilor cuaternare formate din soluții apoase și alcoolice de hidrolizat collagenic cu concentrații diferite de Iodoform și ZnCl<sub>2</sub> 30%, se constată că se înregistrează inhibiție cu valori pozitive dar rezultatul ACL nu se situează pe curbă (valorile pentru ACL sunt negative).
- Nu se pot trage concluzii pertinente pentru aceste amestecuri cuaternare. Sunt necesare studii suplimentare prin alte tipuri de metode complementare. Curbele realizate pot fi neadecvate pentru soluții multicomponente.

**Din capitolul VIII referitor la Capacitatea antimicrobiană.** Hidrogelurile și peliculele prezintă activitate antimicrobiană pe tulpinile studiate și în combinațiile propuse de 1% și 3%. Ierarhizarea activității antimicrobiene pe mixurile de hidrogeluri cât și pe peliculele respective, arată că, pe primul loc se află:

- Hidrogelurile cu oxitetraciclină, urmate de
- Hidrogelurile cu iodoform
- Hidrogelurile cu clorura de zinc
- Hidrogelurile de colagen nativ.
- Trebuie evidențiată activitatea antimicrobiană semnificativă a colagenului nativ din pește *de Grey Mullet* izolat și caracterizat în această teză.
- Activitatea antimicrobiană a crescut prin adaugarea de substanțe antimicrobiene (oxitetraciclină), antiseptice astringente (clorura de zinc) și antibacteriene (iodoformul)
- Creșterea concentrației substanțelor active, au evidențiat o creștere liniară a activității cu aceasta.
- Studiul activității pe cele tulpini, au arătat o activitate mai intensă pe *Staphylococ aurii*, decât pe *Escherichia coli*, ceea ce dovedește eficiența acestor biomateriale pentru destinațiile preconizate și anume, infecțiile pielii.
- Hidrogelurile din preparatele CT 1 – Col. – alge 10%, CT 2 – Col. – alge 10%, CT 1 – Col. –alge 20%, și CT 2 – Col. – alge 20% prezintă activitate antimicrobiană crescută. Zonele de inhibiție mai mari decât pentru fiecare component în parte.
- Atât hidrogelurile cât și peliculele, reprezintă soluții importante pentru vindecarea rănilor, cu largi aplicații în domeniul medical și farmaceutic.
- Compoziția formată din colagen - chitosan - extract de alge marine, prezintă activitate antimicrobiană mărită mai mult decât dublul activității oricărui component individual din compozit.

**Studiile *in vivo* comparative ale colagenului marin extras din pielea de chefal de Marea Neagră și colagenul din pielea de vițel**, au fost realizate la Institutul Național, Victor Babeș București.

- Din punct de vedere etic, studiul a fost efectuat în conformitate cu Legislația Națională, acesta având Autorizația nr. 342 / 04.04.2017 În studiul de față s-a utilizat, modelul răniei de excizie.
- Modelul răniei de excizie a fost utilizat pentru studierea ratei de contracție a răniei și a epitelizării
- Studiile efectuate pe leziunile induse pe sobolani,, după aplicarea hidrogelurilor native de vițel și pește, precum și combinațiile de hidrogeluri cu oxitetraciclină 1% și iodoform 1%, după 7 zile de aplicare, arată că vindecarea completă o produce colagenul din pește cu oxitetraciclină, urmată de hidrogelul de vițel cu oxitetraciclină. Potențarea reciprocă are deci loc la acest raport între produse.

**Din Capitolul IX** din studiile *in vitro* privind Profilele de cedare a substanței medicamentoase din hidrogeluri colagenice extras din peștele *Grey Mullet* din Marea Neagră și parametrii cinetici obținuți în funcție de compoziție, se pot trage următoarele concluzii:

- Modelul Higuchi nu a fost aplicabil, ceea ce a demonstrat că procesul difuzional este însoțit de alte fenomene.
- Cel mai probabil, componente ale formulărilor, altele decât oxitetraciclina, sunt transferate prin membrana artificială și joacă rolul de agent solubilizant în mediul receptor.
- Schimbarea modelului cinetic a avut loc după primele 90-120 de minute.
- De obicei, acest aspect este tipic fenomenelor de difuzie inversă, caracterizat de trecerea componentelor mediului receptor în compartimentul donor și manifestarea unui efect osmotic.
- Este important de menționat faptul că pentru grupul de formulări F1-F4, modelul cinetic de ordin 0 a aproximat foarte bine datele experimentale.
- Posibilă explicație ar fi precipitarea oxitetraciclinei la nivelul porilor membranei. Astfel, cedarea *in vitro* nu mai este dominată de microstructura formulării semisolide.
- Limitanta cinetică (etapa limitativă de proces) a procesului global este dizolvarea lentă a oxitetraciclinei în hidrogelul colagenic, lucru foarte important pentru obținerea formulărilor.

**NOTĂ:** această Teză a fost realizată cu suportul:

*Proiectului cofinanțat din Fondul Social European prin POSDRU 2007-2013*

*Axa prioritară I Educația și formarea în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere, Domeniul major de intervenție 1.5 Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării.*

*CERO – PROFIL DE CARIERĂ: CERCETĂTOR ROMÂN*

*Contract de finanțare: POSDRU/159/1.5/S/135760*

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abedin M.Z., Karim A.A., Gan, C.Y., Ghazali, F.C., Barzideh, Z., Zzaman, W. and Zaidul, I.S.M. Identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory and radical scavenging bioactive peptides from sea cucumber (*Stichopus vastus*) collagen hydrolysates through optimization. *International Food Research Journal* 22(3): 1074-1082, 2015
- Addad S, Jean-Yves E, Faye C, Sylvie Ricard-Blum S, Lethia C. Isolation, Characterization and Biological Evaluation of Jellyfish Collagen for Use in Biomedical Applications. *Mar Drugs*. 9 (6): 967-983, 2011
- Ahuja T, Dhakray V, Mittal M, Khanna P, Yadav B, Jain M. Role Of Collagen In The Periodontal Ligament - A Review. *The Internet Journal of Microbiology*. 10: 1-10, 2012
- Albu, M.G., Titorencu, I., Chelaru, C., The stability of some collagen hydrohels, *Revista de Pielărie Încălțăminte (Leather and Footwear Journal)*, 11, 1, 11-20, 2011
- Barzideh Z., Latiff, A.A., Gan, C.Y., Abedin, M. and Alias, A.K. ACE inhibitory and antioxidant activities of collagen hydrolysates from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *Food Technology and Biotechnology* 52(4), 495-504, 2014
- Bernardini R.D., Mullen A.M., Bolton D., Kerry J., O'neill, E. and Hayes, M., *Meat Science* 90 (1): 226-235, 2012
- Carlson, C.G., Determination of hydroxyproline content as a measure of fibrosis in nondystrophic and dystrophic skeletal muscle, *Wellstone Muscular Dystrophy Center Washinton, DC*, 1-10, 2014
- Chen, S., Chen,H.,Xie,Q.,Hong,B., Chen,J., Hua,F., Bai,K., He, J., Yi,R., Wu, H Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drumfish (*Sciaenops ocellatus*), *Food Hydrocoll*, 52 , 468– 477, 2016
- Eaglstain, W.H., Alvarez, O.M., Auletta, M., Leffel, D., Rogers, G.S., Zitelli, J.A., Norris, J.E., Thomas I., Irondo M., Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G, Collagen for bone tissue regeneration *Acta Biomater*. 8(9), 391-200, 2012
- Green DW, Watson GS, Watson JA, Lee DJ, Lee JM, Jung HS. Diversification and enrichment of clinical biomaterials inspired by Darwinian evolution, *Acta Biomater*. 15, 42:33-45, 2016
- Gaurav Kumar Pal, P.V. Suresh, Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen *Materials Science and Engineering ,C 70* , 32–40, 2017
- Guo Ping Wu, Xiao Ming Wang, Li Ping Lin, Su Hua Chen, Qing Qing Wu, Isolation and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from the Skin of Black Carp (*Mylopharyngdon piceus*), 642-650, Vol.5 No.7, 2014
- Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000; 21: 2529-2543. Carp (*Mylopharyngdon piceus*, 2014
- Huang C.Y., Kuo J.M., Wu S.J., Tsai,H.T., Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion-hydro-extraction pro-cess, *Food Chemistry*, 190 , 997– 1006, 2016
- Jiang Y., Wang H.,Deng M., Wang Z.,Zhang J., Wang H., Effect of ultrasonication on the fibril-formation and gel properties of collagen from grass carp skin, *Materials Science and Engineering C* , 59,1038–1046, 2016
- José A. Vázquez, Maria Blanco, Agueda E. Massa , Isabel Rodríguez Amado Ricardo I. Pérez-Martín, Production of Fish Protein Hydrolysates from *Scyliorhinus canicula* Discards with Antihypertensive and Antioxidant Activities by Enzymatic Hydrolysis and Mathematical Optimization Using Response Surface Methodology, *Marine Drugs*, 15(10), 306, HORIZONT 2020, 2017
- Lafarga T., Hayes M., Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 98(2): 227-239, 2014
- Li Z.R., Wang B., Chi C.F., Zhang Q.H., Gong Y.D., Tang J.J., Luo H.Y.and Ding, G.F. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocolloids*, 31(1): 103-113, 2013
- Lin Y.K., Lin, T.Y. and Su, H.P. Extraction and characterisation of telopeptide-poor collagen from porcine lung. *Food Chemistry*, 124(4): 1583-1588, 2011
- Liu, D.S., Liang, L., Regenstein, J.M. and Zhou, P. Extraction and Characterization of Pepsin-Solubilised Collagen from Fines, Scales, Skin, Bones and Swim Bladders of Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133, 1441, 2012
- Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W., Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl Biomater*.15,71(2), 343-54, 2014
- Yang, H. and Shu, Z., The extraction of collagen protein from pigskin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6(2): 683-687,2014
- María Blanco, José Antonio Vázquez, Ricardo I. Pérez-Martín ,Carmen G. Sotelo Hydrolysates of Fish Skin Collagen: An Opportunity for Valorizing Fish Industry Byproducts, *Marine Drug*, 2017
- Mircioiu C., Voicu A.V, Ionescu M., Miron S.D., Radulescu S.F., Nicolescu C.A., *Toxicology Letters*, 219, 99- 106, 2013

Moraes M.C.m Cunha, R.L., Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. *Food Research International* 50(1), 213-223, 2013

Mori H., Tone, Y. Shimizu, K., Zikihara, K., Tokutomi, S., Ida T., Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*), *Materials Science and Engineering C*, 33, 174–181, 2013

Nayak B.S., Pereira L.P., Kanhai J., Milne D.M., Swanston W.H., Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011

Negreanu-Pîrjol T.Negreanu-Pîrjol B.Ş., Sîrbu R., Paraschiv G., Meghea A., Comparative studies regarding the antioxidative activity of some therapeutic marine algae species along Romanian Black Sea Coast, *JEPE*, 13, (3A), 1744-1750, 2012

Negreanu-Pîrjol B.-Ş., Negreanu-Pîrjol T., Paraschiv G.M., Lepadatu A.C., H. Miresan, Antioxidative activity of some macrophyte algae extracts from South Romanian Black Sea Coast, 15th - GeoConferences – SGEM 2015 – vol. I, 275 – 282, 2015

Pal G.K., Suresh P.V., Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen, *Materials Science and Engineering*, 70 ,32–40, 2017

Palpandi C, Ramasamy P, Rajinikanth T, Vairamani S, Shanmugam A., Extraction of Collagen from Mangrove Santos M.H., Silva R.M., Dumon V.C., Neves, J.S., Mansur, H.S. and Heneine, L.G.D. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 33(2): 790-800, 2013

Silva T.F. and Penna, A.L.B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 71(3): 530-539, 2012

Silva R.S.G., Sydney F., Bandeira L., Pinto A.A., Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*), *Food Science and Technology*,57(2), 580-585, 2014

Silva T.H., Moreira-Silva J., Marques A.L.P., Domingues A., Bayon Y., Reis R.L., - Marine Origin Collagens and Its Potential Applications, *Marine Drugs*, 12, 5881-5901, 2014

Silvestri M. Boffito, Sartori S., and G. Ciardelli, Biomimetic materials and scaffolds for myocardial tissue regeneration, *Macromolecular Bioscience*, vol. 13, no. 8, pp. 984–1019, 2013

Silvipriya KS, Krishna Kumar K, Bhat AR, Dinesh Kumar B, Anish John, Panayappan lakshmanan. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *J App Pharm Sci*, 5 (03): 123- 127, 2015

Schmidt M. M., Dornelles R. C. P., Mello R. O., KubotaE. H., Mazutti M. A., Kempka A. P. and Demiate, I. M., Collagen extraction process, *International Food Research Journal* 23(3): 913-922 Journal homepage, 2016

Shanmugam A, Srinivasan A. Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of *Sepiellainermis*. *African Journal of Biotechnology*, 11 (78): 14326-1433, 2012

The American Heritage Dictionary of the English Language ed.A 4-a, updatată în Houghton Mifflin Company, 2009

Tiago H. Silva, Joana Moreira-Silva, Ana L. P. Marques, Alberta Domingues, Yves Bayon, Rui L. Reis, Marine Origin Collagens and Its Potential Applications, *Marine Drugs*, 12, 5881-5901, 2014

Toldrá, F., Aristoy, M., Mora, L. and Reig, M.,Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science* 92(3) 290-296,2012

Zhang H.,Yang , P., Zhou ,C., Li ,S.,Hong,P.,Marine Collagen Peptides from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and Wound Healing Evaluation, *Marine Drugs*,15(4): 102,2017

Zhang H., Yang P., Zhou C., Li S., Hong P., Marine Collagen Peptides from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and Wound Healing Evaluation, *Marine Drugs*, 12, 5881-5901, 2014

Yang H. and Shu, Z., The extraction of collagen protein from pigskin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6(2): 683-687, 2014

Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G, Collagen for bone tissue regeneration*Acta Biomater.* (9):3191-200, 2012

Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc*, 10:382–396., 2015

Yang G., Wu M., Yi H., Wang J. Biosynthesis and characterization of a non-repetitive polypeptidederived from silk fibroin heavy chain. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 59:278–285, 2016

\*\*\* European Pharmacopeia, Ed. 8-A, 2014

\*\*\*Determination of the antioxidative capacity lipid-soluble substances with the PHOTOCHEM, Analytik Jena AG, Germany, 2004

