

Nr. Înregistrare: B085/ 05.12.2022

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

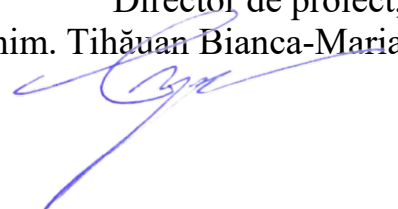
Proiect PN-III-P2-2.1-PTE-2021-0303
Contract nr. 95PTE/ 2022
Etapa 2022

Sisteme sinergice de principii active destinate cosmeticii regenerative
Acronim: GRACE

Avizat la Coordonator
S.C. Sanimed International Impex S.R.L.
Reprezentant legal
Gloria RUSU



Director de proiect,
Dr. Biochim. Tihăuan Bianca-Maria



Acest document este proprietatea organizațiilor participante la proiect și nu poate fi utilizat, reprodus, distribuit sau diseminat către terți, fără acordul prealabil al autorilor.

PLANUL DE REALIZARE AL PROIECTULUI - Etapa 2022

Anul	Etapa	Obiectivele etapei	Activitățile și subactivitățile derulate	Rezultate livrate în cadrul etapei
2022	Unică	Optimizarea procesului de obținere a matricei de bază de tip hidrogel și a complexilor moleculari de incluziune - ciclodextrine	A1.1. Obținerea matricei de bază sub formă de hidrogel reticulat	- Raport experimental privind metoda de obținere collagen tip 1, procedeul de obținere a hidrogelului reticulat și optimizarea procesului de liofilizare; - Raport experimental privind evaluarea morfologiei hidrogelului reticulat, determinările spectrofotometrice ale indicelui de reticulare, evaluarea ratelor de degradare ale hidrogelului.
			A1.2. Prepararea complexilor moleculari de incluziune ciclodextrine – principii și caracterizarea acestora	- Raport experimental privind prepararea complexilor supramoleculari și tehnologia optimizată de sinteză a acestora, demonstrarea gradului de complexare, parametrii optimi de reacție și specificații complecși finali; - Raport experimental privind evaluarile calitative și de conformitate ale principiilor active și specificațiile acestora.
			A1.3. Diseminarea rezultatelor	- Participare 1 eveniment științific; - Pagina web a proiectului.

Descrierea științifică și tehnică a rezultatelor proiectului, obținute în etapa 2022

Preambul

Proiectul GRACE vizează dezvoltarea, în cadrul S.C. Sanimed Internațional Impex S.R.L., a unei game integratoare de produse destinate asistenței în regenerare a epidermei afectată de radiațiile solare, radioterapie, escare sau leziuni superficiale. Produsele finale vizate vor consta într-o matrice de bază, alcătuită din biomacromolecule biologice active (colagen și acid hialuronic), în care se vor încorpora sisteme funcționalizate destinate eliberării controlate a principiilor active (curcumină, vitaminele A, C, E, acidul ferulic) încapsulate în molecule gazdă de tipul ciclodextrinelor. Complecșii noi sintetizați vor fi incluși în formulări de tipul hidrogelurilor, în vederea extinderii portofoliului de produse din sfera cosmetico-medicală ale S.C. Sanimed Internațional Impex SRL, destinate domeniului cosmeticii regeneratoare. În acest sens, proiectul va stimula realizarea de investiții în cercetare – dezvoltare tehnologică din partea companiei beneficiare, precum și consolidarea potențialului de actor al companiei pe piața internă și internațională, înalt concurențială, a produselor dermato-cosmetice. În subsidiar, proiectul va dezvolta parteneriatele tradiționale ale companiei cu instituțiile de cercetare științifică, în scopul racordării cercetării aplicative românești la exigențele mediului socio-economic național și european.

În termeni concreți, proiectul GRACE vizează obținerea unei game compuse din trei produse: hidrogel uni-doză (pentru leziuni superficiale), gel cremă (pentru pielea afectată de radiații) și gel de curățare (pentru eliminarea blândă debriurilor și curățarea leziunilor superficiale).

Ideea fructificată în cadrul proiectului derivă din necesitatea utilizării în managementul plăgilor superficiale de la nivelul epidermei a unor produse integratoare, bioactive, cu componente naturale, menite să favorizeze restaurarea barierei epidermale afectată în urma unor agresiuni de mică amploare, a intervențiilor medicale, sau a acțiunii unor factori fizico-chimici nocivi. Proiectul își propune dezvoltarea unei game de produse utilizabile de către non-profesioniști în dermato-cosmetică, sub forma unor soluții self care aplicabile înafara unităților sanitare, fie după externare, în managementul cicatricilor chirurgicale, fie în timpul radioterapiei, fie în cazul unor leziuni minore, situații care necesită continuarea asistenței în zona afectată.

Activitățile derulate și rezultatele obținute în Etapa 2022**A1.1. Obținerea matricei de bază sub formă de hidrogel reticulat**

Utilizarea bazelor de produs de tipul hidrogelurilor biopolimerice (cu collagen și acid hialuronic) este considerată în prezent una dintre strategiile cele mai eficiente în tratamentul plăgilor cutanate rezultate în urma leziunilor superficiale, arsurilor solare sau radioterapice. Acest tip de produse prezintă avantajul de a favoriza vindecarea rănilor prin menținerea unor valori optime ale umidității și biodisponibilității speciilor mic-moleculare cu rol fiziologic. În plus, hidrogelurile de collagen, de exemplu, obținute sub variate forme (de la gel clar, până la blocuri compacte), reprezintă matrici eficiente pentru înglobarea controlată și facilă a numeroși compuși farmacologic activi, cu scopul de a obține produse (multi)funcționale destinate tratării eficiente a afecțiunilor care denaturează bariera epidermală.

Collagenul este proteina structurală primară a țesuturilor umane, oferă suport fizic țesuturilor, jucând un rol important în menținerea integrității structurale și biologice a matricei extracelulare (ECM) [1]. În prezent, sunt raportate cel puțin 28 de tipuri de collagen, care reprezintă aproximativ 30-40% din totalul proteinelor corpului [2], [3]. Dispozitivele medicale pe bază de collagen sunt utilizate pe scară largă într-o varietate de domenii clinice, inclusiv în chirurgie generală [4], ortopedică [5], dentară [6], neurochirurgie [7], precum și în cosmetologie [8]. În prezent, tipurile de materii prime utilizate în obținerea diferitelor forme de collagen utilizabil în dispozitivele medicale de natură clinică sunt derivate în principal din țesuturi animale și țesuturi de alogrefă [9].

Componentei collagenice din compoziția produselor vizate, cu rol de dispozitive medicale i se impun o serie de exigențe privitoare la caracteristicile fizico-chimice, la puritatea și la calitatea sa. Respectivul exigențe derivă din reglementările Comisiei Europene – Regulamentul (UE) 2017/745, modificat prin regulamentul (UE) 2020/561 al Parlamentului European și al Consiliului din 23 aprilie - și sunt formulate prin documentele de certificare a produselor (Directivile 90/385/CEE și 93/42/CEE) în ceea ce privește regulamentele de fabricație și documentele de trasabilitate și de urmărire tehnologică, precum și prin standardele din seriile ISO 13458:2016 (Medical devices - Quality management systems - Requirements for regulatory purposes), ISO 14937:2009 (Sterilization of health care products - General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices) și ISO 11137:2013 (Sterilization of health care products - Radiation). Deși aplicațiile cosmeceutice ale formelor collagenice sunt mai puțin sever reglementate, există o serie de cerințe care se impun a fi respectate din punctul de vedere al absenței imunogenității și al limitării prezenței unor specii chimice însoțitoare, ori generate / adăugate în cursul operațiilor tehnologice (Regulamentul (CE) nr. 1223/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 30 noiembrie 2009 privind produsele cosmetice).

În cadrul Sanimed, procesul de solubilizare enzimatică al collagenului și aducerea acestuia în soluție/dispersie coloidală se realizează în patru etape. Materialul biologic de la care se pornește pentru obținerea collagenului este tendonul bovin. Componentii principali ai acestui țesut sunt: apa, în proporție de 70%, collageni (collagenul de tip I găsiindu-se în proporție de aproximativ 90% din greutatea substanței uscate) și proteoglicani (aproximativ 2-5% din greutatea substanței uscate). În cantități mult mai reduse se găsesc elastina și alte molecule. Instalația de cercetare de care Sanimed dispune pentru obținerea formelor collagenice umede este un ansamblu capsulat de module interschimbabile și fixe, în directă corelație cu produsul care va fi obținut. Ea este dedicată obținerii suspensiilor coloidale de (atelo)collagen, prin metoda solubilizării enzimatică a tendoanelor bovine sau cabaline și este realizată modular, pentru a susține cele patru etape clasice în solubilizarea enzimatică a țesuturilor, și anume (1) peptizarea măcinăturii de tendon în mediu acid, (2) solubilizarea enzimatică a suspensiei grosiere inițiale, utilizând pepsină, în mediu acid și etapele de separare; (3) filtrarea masei de reacție și (4) diafiltrarea/ ultrafiltrarea suspensiei coloidale de (atelo)collagen. O scurtă detaliere a procesului prevede:

1. Peptizarea măcinăturii de tendon în mediu acid, se soldează cu obținerea unei mase puternic gonflată, păstoasă. Aceasta etapa constă într-o gonflare cvasi-statică a materialului biologic, tendonul Ahile de origine bovină, decongelat în condiții controlate, care se supune procesului de gonflare timp de 16 ore, în soluție de acid acetic, la rece (4 °C). După gonflare, materialul biologic prezintă un aspect caracteristic suprahidratării.

2. *Solubilizarea enzimatică* a suspensiei grosiere inițiale se realizează folosind pepsina, în mediu acid. Masa fluidă rezultată după solubilizarea enzimatică are o vâscozitate mai mică decât cea de la finalul etapei pe peptizare. Aceasta etapă este efectuată sub agitare continuă în vasul de reacție, concomitent cu recircularea fluidului în scop de laminare și omogenizare.

3. *Filtrarea masei de reacție* se realizează cu scopul eliminării debriurilor tisulare (porțiuni de tendon incomplet peptizate/ hidrolizate, fascii, agregate consolidate excesiv, particule reținute în spumă). Aceasta etapă se soldează cu obținerea unei suspensii elibera de bulele de gaz, cu vâscozitate diminuată, mult mai omogenă comparativ cu stadiul anterior filtrării. Se realizează prin parcurgerea a două epoci de filtrare: (i) filtrarea grosieră – realizată prin filtre tip lumânare, cu site metalice de 1mm, și (ii) filtrarea micronică – realizată prin filtre ceramice înseriate de 100 μm, 50 μm, 30 μm și 0.8 μm.

4. *Diafiltrare / ultrafiltrarea suspensiei coloidale de (atelo)colagen*, soldată cu obținerea unei suspensii cu vâscozitate și concentrație impuse (controlate), liberă de orice impurități microscopice și coloidale. Această etapă decurge în trei epoci, cu următoarele roluri tehnologice: (i) neutralizarea acidității masei de suspensie, efectuată prin dozarea de soluții alcaline în vasul de reacție; această subetapă poate fi exclusă în funcție de timpii tehnologici disponibili și de caracteristicile/ vâscozitatea suspensiei; (ii) purificarea suspensiei prin diafiltrare contra apei pure, efectuată prin recircularea prin coloane cu porozitate controlată, concomitent cu adăugarea de apă pură în vasul de reacție în vederea menținerii constante a volumului suspensiei în curs de purificare; în această subetapă se elimină excesul de aciditate, sărurile rezultate prin neutralizare, fracțiunile polipeptidice cu mase moleculare mici, impuritățile fizice coloidale cu dimensiuni nanometrice; (iii) concentrarea suspensiei purificate la valori impuse, prin ultrafiltrare prin coloane ceramice cu porozitate controlată.

Hidrogelul, respectiv *scaffold*-urile colagenice astfel obținute prezintă o serie de particularități nedorite legate de stabilitate, fiind, în general, ușor degradabile termic, având rezistență mecanică scăzută și dificultăți în controlul ratelor de biodegradare, aspecte asociate distrugerii gradului de reticulare natural și al structurii de ansamblu a acestuia ca urmare a procesului de obținere [9].

În biotehnologie (sau aplicații practice de tipul celor din ingineria tisulară) se utilizează reticularea bioproduselor pe bază de colagen cu scopul consolidării structurii acestora. Reticularea este procesul chimic sau fizic prin care lanțurile polimerice sunt unite între ele. Acest proces îmbunătățește proprietățile mecanice ale *scaffold*-urilor de colagen de tip I prin formarea unei rețele de matrice densă. Legătura încrucișată a collagenului de tip I se realizează prin stabilizarea lanțurilor laterale ale aminoacizilor, ceea ce mărește rigidizarea fibrelor de colagen prin inhibarea alunecării sub presiune a moleculelor de colagen asemănătoare unor tije lungi [1].

Prin urmare, alegerea agenților de reticulare este foarte importantă. Reticulanții sunt selectați pe baza unei varietăți de factori, inclusiv proprietățile lor biologice, fizice și chimice și impactul asupra porozității *scaffold*-urilor [10]. Un reticulant ideal ar trebui să îmbunătățească rezistența mecanică a *scaffold*-urilor, rămânând în același timp non-citotoxic pentru celule. Cu precădere două metode sunt frecvent abordate pentru a îmbunătăți rezistența mecanică a *scaffold*-urilor de colagen de tip I. Aceste metode includ: (1) o strategie care implică **modificarea formei fizice** a *scaffold*-ului, și (2) o strategie care implică **înglobarea în structura collagenului de biomateriale**, cum ar fi materiale sintetice, naturale și anorganice. Aceste metode îi sporesc activitatea biologică și rezistența mecanică [1]. Cu toate acestea, efectele ambelor tipuri de procese la nivelul micro – și nano structurii collagenului, cât și asupra proprietăților optice ale acestuia, nu sunt evaluate sistemic de cele mai multe ori. Pentru a putea fi evaluat critic efectul reticulării chimice asupra bioproduselor colagenice este esențială caracterizarea cât mai aprofundată a relației structură-funcție, începând cu înțelegerea tipului de agent de reticulare și a amprente chimice a acestuia în produsul nou format.

Procesele care implică reticulare chimică sunt favorizate de numărul mare de grupări laterale funcționale ale collagenului. Acest lucru poate fi obținut prin folosirea unei serii de agenți de reticulare care reacționează cu resturile de aminoacizi specifici moleculei de colagen, oferindu-i caracteristici biochimice, termice și mecanice îmbunătățite și rate de biodegradare scăzute. Interacția acestor agenți de reticulare poate avea loc cu gruparea ε-aminică a resturilor de lizină, grupările carboxilice ale acizilor glutamici și aspartici și cu grupările hidroxil.

Compusul **genipin** – propus ca agent de reticulare chimică pentru hidrogelul produs de Sanimed - este un derivat iridoid izolat din fructe de *Gardenia jasminoides*, care poate fi folosit eficient în aplicațiile de inginerie tisulară datorită citotoxicității sale scăzute și biocompatibilității ridicate [11].

Acesta reacționează cu grupările amino-primare din structura collagenului, fiind relativ ușor de identificat în bioprodusul rezultat datorită fluorescenței pe care o emite și a absorbanței care poate fi determinată spectrofotometric. În urma reacției dintre genipin și collagen se formează o serie de structuri ciclice care generează legături intra – și intermoleculare la nivelul fibrelor collagenice [12].

O caracteristică importantă a biopolimerului de collagen este că acesta se auto-asamblează în elementele structurale de diferite ordine de mărime, de la particule subnanometrice până la dimensiuni micrometrice sau chiar mai mari. Cele 3 lanțuri helicoidale formează structuri fibrilare alungite (triplu helix) vizibile la ME (fie de scanare, fie de baleiaj).

Conform literaturii de specialitate [13], [14], fluorescența intrinsecă este generată de structurile moleculare și proteinele care absorb lumina în domeniul UV/VIS. Astfel, produsele de reticulare formate de genipină atunci când reacționează cu biopolimeri care conțin grupări amino primare cu absorbție la mijlocul spectrului UV (250 - 300 nm), aproape -UV (320 - 370 nm), VIS (400 - 600 nm), și emit fluorescență în regiunea de lungime de undă cuprinsă între 380-700 nm. Maximul de emisie de fluorescență a aducților fluorescenți formați de genipin prezintă o dependență puternică de lungimea de undă de excitație. Maximul de emisie este la 630 nm. Studiile imagistice cu fluorescență arată că genipinul induce formarea de fascicule fluorescente lungi agregate pe toată grosimea bioproduselor pe care le formează. Aceste proprietăți și posibilități de trasabilitate relativ facilă în bioprodusul nou format au constituit bazele selecției **metodei de reticulare (chimice – reacții cu grupările amino)** și a **agentului capabil de realizarea reacției (genipin)**. Până în prezent, genipin a fost utilizat ca reactiv de detectare/ amprentare sau bioadeziv. În plus, a fost folosit pentru a lega diferite hidrogeluri din structura unor biomateriale, în aplicații de transport la țintă a medicamentelor și prepararea de structuri poroase [12], [15].

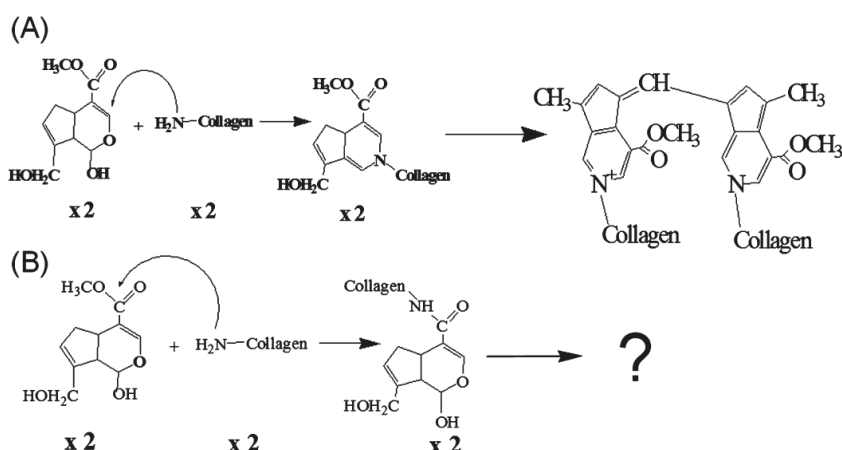


Figura 1. Reprezentarea schematică a reacțiilor de reticulare a collagenului cu genipinul.

Prima cale de reticulare (a) începe cu un atac nucleofil al aminei primare a rezidurilor de lizină, hidroxilizină și arginină ale collagenului la nivelul rezidurilor carbonului C3 al genipinului, formându-se un azot-iridoid. Ulterior, azotul terțiar al collagenului înlocuiește un atom de oxigen din inelul hexagonal al genipinului. Legăturile intramoleculare și intermoleculare formate sunt structurile ciclice legate de genipin substituit cu azot și atașată la collagen. Două iridoide dimerizează ulterior printr-o reacție radicală. A doua cale propusă de literatura de specialitate (b) începe cu o reacție de substituție nucleofilă care înlocuiește grupul ester al genipinului printr-o legătură amidă secundară. Produsul final pentru această a doua posibilă cale este necunoscut. Fiind astfel consolidată necesitatea evaluării aprofundate, la nivel micro,nano-structural a modificărilor generate de reticularea chimică cu genipin a collagenului [12].

Dintre **tratamentele fizice de reticulare** pe care Sanimed le-a utilizat amintim **tratamentul dehidrotermic (DHT)**, aceasta fiind una din metodele fizice de reticulare, utilizată în general pentru îmbunătățirea proprietăților materialelor collagenice fără a introduce și alți reactivi în compoziția acestora. Tratamentul DHT constă în expunerea collagenului la o temperatură ridicată pentru o perioadă de timp, sub vid, pentru a îndepărta apa din compoziție și a forma legături încrucișate. Literatura de specialitate indică rezultate care demonstrează ca numărul de reziduuri acide si baze libere din

moleculele de collagen scad în urma tratamentului DH, sugerând ca legăturile încrucișate sunt rezultatul unei reacții de condensare [16], [17]. Mai mult, îndepărtarea apei din collagen poate deteriora legăturile de hidrogen din collagen, ducând la formarea unei legături de hidrogen de tip amidă-amidă, legături ce sunt mai puternice decât legăturile de hidrogen de tipul amidă-apă, îmbunătățind astfel proprietățile materialelor collagenice. Pentru aplicarea unui tratament DHT adecvat asupra bureților de collagen este însă nevoie de o înțelegere aprofundată a mecanismului de reticulare.

Temperatura și durata tratamentului DHT sunt factori cheie pentru îmbunătățirea proprietăților materialelor collagenice. Gorham și colab. au raportat că o temperatură mai ridicată și o perioadă mai lungă de tratament sunt mai benefice pentru creșterea densității de reticulare [18]. În plus, denaturarea collagenului este, de asemenea, sensibilă la acești doi factori. Denaturarea afectează configurația triplului helix și modifică împachetarea moleculelor de collagen. Un aspect important de clarificat este limita dintre formarea reticularii și apariția degradării. Acest lucru este esențial pentru obținerea unor proprietăți mecanice favorabile ale materialelor collagenice. În acest sens vom folosi metodele de spectroscopie în infraroșu pentru a analiza relația dintre gradul de reticulare și amploarea denaturării. Din literatura evaluată până în prezent, s-a constatat că nu exista foarte multe date cu privire la efectul relației dintre gradul de denaturare și gradul de reticulare asupra proprietăților mecanice ale bureților de collagen la diferite temperaturi și intervale de timp ale tratamentului DHT.

Prealabil efectuării tratamentului dehidrotermic, hidrogelul a fost supus procesului de optimizare a procedurii de **liofilizare**. Scopul procedurii de uscare / liofilizare este de îndepărtare a apei, rezultând un produs cu proprietăți fizico-chimice și biologice propice menținerii valorilor vizate (biocompatibil, non-imunogen, sterilizabil, etc). Astfel, liofilizarea este un procedeu de conservare/deshidratare prin uscare, constând în eliminarea apei dintr-un produs congelat în prealabil, prin sublimare sub vid. Eliminarea apei din hidrogel se realizează fără distrugerea structurii acesteia. Congelarea este cea mai importantă fază a ciclului de liofilizare, de care depinde în mare măsură calitatea finală a produsului. Congelatorul pentru liofilizare, de care Sanimed dispune, a fost proiectat conform cerințelor europene moderne, utilizează compresoare frigorifice de ultimă generație și agenți frigorifici ecologici. Reteta de liofilizare a hidrogelului în formă lichidă a presupus într-o primă fază determinarea punctului eutectic – acesta situându-se în jurul valorii de – 11 grade. Acesta valoare determinată pe cale experimentală conduce la realizarea rețetei după urmatorul algoritm: (i) congelare cu – 15 – 25 grade sub valoarea punctului eutectic, cu variație mică (rampă de scădere accelerată cu 2, 3 grade pe minut) cu scopul formării unei structuri cristaline foarte fine; congelarea lentă ar putea produce cristale tip iceberg care distrug structurile proteice prin tensiunile mari specifice interacțiunii dintre blocuri; (ii) în funcție de punctul eutectic determinat și corelat cu rezultate similare menționate în literatura de specialitate pentru acest tip de produse [19], [20], s-a optat pentru valoarea de presiune de 1050 microbari presiune maxim admisibilă la suprafața produsului – presiunea de lucru fiind necesară să se regăsească sub această valoare pentru a facilita extracția vaporilor de apă (în cazul nostru este între 700 - 900 mbar) Cu cât presiunea este mai mare, există riscul ca produsul să treacă în zona lichidă și să se piardă din masa produsului; (iii) ținând cont de punct eutectic, de presiunea de lucru, de grosimea stratului, avem un aport termic de 650 de calorii la 1 gram de apă. Asta va conduce la o rampă de 10 grade la 2 ore – aport termic (cum se poate observa în graficul de liofilizare generat – figura 1); (iv) după încheierea fazei de sublimare, din măsurători experimentale efectuate, s-a constatat că umiditatea relativă a hidrogelului în această fază este între 35-25% - valoare inadecvată conform standardelor de conservare / păstrare a valabilității în timp a produsului finit. Astfel, este necesară uscarea finală, pentru a ajunge la procente de umiditate cuprinse între 15-18 %; (v) faza de uscare finală are loc la temperaturi înalte, maxim admisibile de produs (+ 40°C) și în condiții de vid extrem 10-15 mbari (maximum posibil de executat de către liofilizatorul utilizat de Sanimed); (vi) rezultatul final – după presurizarea incintei de la 10-15 microni la 1000 de milibari cu un gaz inert (argon-azot) pentru a evita creșterea umidității relative a produsului datorită contactului cu aerul (în cazul presurizării cu aer atmosferic). Produsul este post condiționat după liofilizare pentru a evita hidratarea acestuia din umezeala atmosferică.

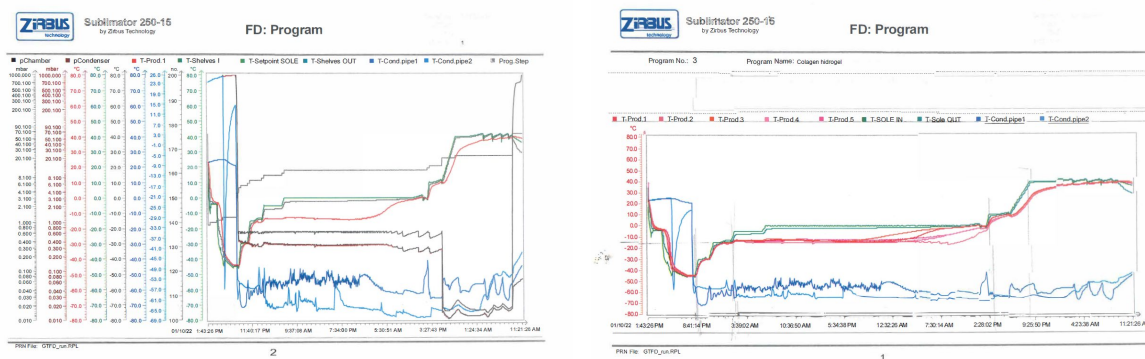


Figura 1. Graficul de liofilizare al hidrogelului collagenic

În cadrul SC Sanimed International SRL efectul tratamentului DHT asupra structurii și proprietăților bureților de collagen, a fost investigat cu scopul de a obține structuri collagenice cu proprietăți îmbunătățite [21]. Natura reticularii și variația densității de reticulare a fost analizată prin evaluarea gradului de gonflare a bureților de collagen în apă deionizată. Denaturarea collagenului în urma tratamentului DHT a fost analizată folosind spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR). Proprietățile morfologice au fost evaluate prin spectroscopie electronică de baleiaj (SEM), iar conținutul de apă al bureților de collagen după tratamentul DHT a fost evaluat prin analiza termogravimetrică (TGA). Rezultatele obținute până în prezent constituie o bază solidă în înțelegerea modificărilor structurale pe care collagenul le prezintă ca urmare a optimizării acestuia în conformitate cu aplicațiile vizate, în acest caz, cele din sfera cosmeticii regeneratoare.

Analiza utilizând spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) structura scaffoldului collagenic rezultat în urma tratamentului dehidrotermic, pot fi observate schimbările structurii chimice ale buretelui de collagen survenite în urma tratamentului DHT. Spectrele au fost înregistrate în intervalul $4000-750\text{ cm}^{-1}$ cu o medie de 16 scanări și o rezoluție de 4 cm^{-1} . Informații semnificative pot fi extrase din Figura 3 ce ilustrează analiza benzilor caracteristice spectrelor IR pentru collagen, acesta prezintă benzi specifice pentru amida A ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), banda amidei I ($\sim 1653\text{ cm}^{-1}$), banda amidei II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) și banda amidei II ($\sim 1238\text{ cm}^{-1}$).

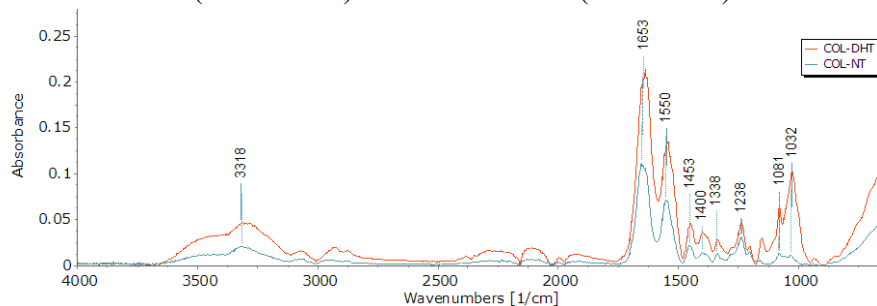
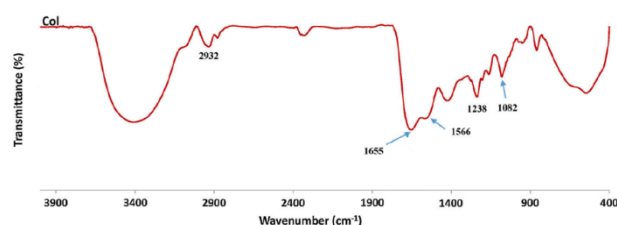


Figura 3. Suprapunerea spectrelor infraroșu cu transformare Fourier (FTIR) obținute pentru proba de collagen netratată termic (COL-NT), collagen tratat termic (COL-DHT)

Spectrul IR al hidrogelului de collagen este prezentat în Figura 4. Se pot observa benzi caracteristice collagenului pur, astfel la $\sim 3408\text{ cm}^{-1}$ se observa o bandă largă atribuită vibrațiilor de întindere N-H ale grupărilor de tip amine.



Picul de la 2932 cm^{-1} este atribuit întinderii asimetrice CH_2 . Picurile de la 1655 cm^{-1} , 1561 cm^{-1} , 1238 cm^{-1} corespund întinderii C=O ale amidei de tip I, îndoirii N-H cuplate cu vibrațiile de întindere C-N pentru amida II și, respectiv, vibrațiilor de întindere C-N și de îndoire N-H caracteristice amidei III.

Figura 4. Spectru IR al hidrogelului de collagen pur (Col)

În evaluarea morfologiei hidrogelului liofilizat prin microscopie SEM, a fost utilizat microscopul Zeiss Gemini 500. Rezoluția specifică a microscopului este de la $0,6\text{ nm}$ la 15 kV și $1,2\text{ nm}$

la tensiunea de accelerație de 500 V. Principalul avantaj al acestui echipament constă în utilizarea detectorului *InLens* de înaltă rezoluție (până la 150Pa) care permite obținerea unei rezoluții de la 1,8 nm la 3kV și 30pA N2 de presiune (până la 500Pa cu detector în cascadă). Prin urmare, este potrivit în special pentru analiza probelor fără acoperire. Coloana Gemini2 împreună cu opțiunea *Tandem Decel* permite reducerea energiei până la 5eV, menținând în același timp parametrii optici optimi. Distanțele de lucru între 0.1-50 mm permit explorarea unei game largi de dimensiuni ale probelor. Detectoarele suplimentare includ backscatter-ul cu glisare în secțiune și detectoare STEM reglabile. Microscopul este dotat cu un detector Oxford EDX de 150 mm² de suprafață mare și o cameră EBSD de 1MP de înaltă sensibilitate și rezoluție. În scopul obținerii și investigării microgرافیilor SEM, probele au fost secționate transversal cu ajutorul unui bisturiu chirurgical, apoi fixate cu o bandă dublu adezivă din cupru, pe un suport port-obiect standard, în unghi de 45°/90°, fapt care justifică limitarea distanței de lucru dintre probă și detector (1.6-3.5 nm) și introduse în incinta de analiză a microscopului, imaginile obținute fiind realizate prin înregistrarea fasciculului de electroni secundari rezultat, cu energie de 10 keV. Probele au fost evaluate folosind un detector TLD pentru detectarea electronilor secundari la o distanță de lucru cuprinsă între 1.6 mm și 3.5 mm.

În figura 5 sunt prezentate micrografii SEM ale matricei colagenice martor la scale diferite (1, 2, 10, 20 μm), în mai multe zone ale buretelui, pentru a pune în evidență (la magnitudini cuprinse între 500 X și 10.00k X) aspectele structurale specifice, și anume: porozitatea și aspectul neted al fibrelor dispuse într-o structură tip rețea.

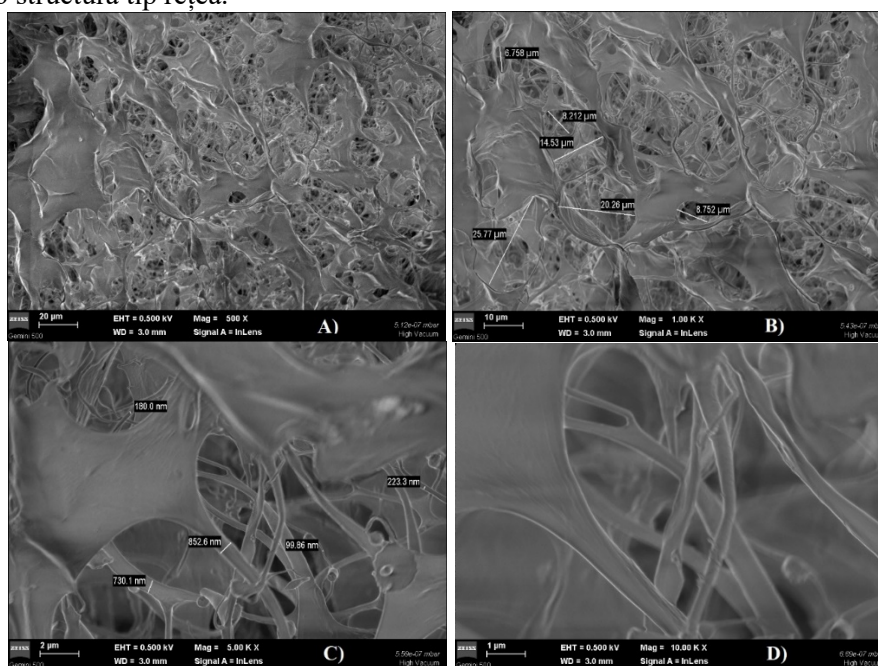


Figura 5. Micrografii SEM ale matricei colagenice martor obținută prin liofilizare

În vederea evaluării ratelor de degradare ale matricei de bază sunt formă de hidrogel reticulat s-a realizat optimizarea prin design experimental a procesului tehnologic.

Metoda suprafeței de răspuns a modelului (RSM) a fost folosită, folosind programul Design Expert 11.0 (StateEase Inc., Minneapolis, MN, SUA). Suprafața de răspuns pătratică a fost utilizată pentru a localiza relația dintre răspuns și fiecare factor individual. Testul de semnificație și analiza varianței (ANOVA) au fost, de asemenea, determinate pentru a găsi potrivirea modelului și relația optimă dintre concentrația de enzimă (pepsină) și cantitatea de tendon pentru obținerea unei mase uscate cât mai ridicate cu un conținut mare de hidroxiprolina (eficiența hidrolizei enzimaticе) și un volum redus de acid acetic consumat pentru menținerea pH-ului mediului de reacție constant.

Pentru optimizarea procesului de extracție a colagenului privind conținutul de substanță uscată și conținutul de hidroxiprolina, aminoacid specific colagenului, s-a utilizat soft-ul Design Expert.

Informațiile furnizate de acest soft ne oferă o evidențiere a influenței variației fiecărui parametru asupra celor 3 răspunsuri: substanță uscată, concentrație de hidroxiprolină și volumul de acid acetic consumat.

S-a folosit un model factorial pe mai multe niveluri care a sugerat un total de 12 experimente, creând combinații relevante între următoarele două variabile: (i) concentrație enzimă (pepsină) și (ii) cantitatea de tendon bovin raportat la 1L acid acetic de pH=2.3. Pentru fiecare tip de răspuns s-au calculat datele statistice și diagnoza modelelor experimentale în vederea optimizării individuale a componentelor. Pentru evaluarea globală a modelului s-a definit funcția de desirabilitate (D) definită ca media geometrică a funcțiilor de desirabilitate individuale ale fiecărui răspuns Y_i , unde n este numărul de răspunsuri.

1. Substanță uscată

Tabelul 1. Analiza statistică Anova pentru conținutul de masă uscată

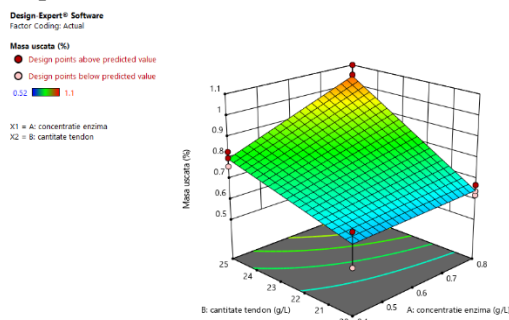
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.3354	3	0.1118	31.86	< 0.0001	significant
A-concentratie enzima	0.0520	1	0.0520	14.82	0.0049	
B-cantitate tendon	0.2437	1	0.2437	69.46	< 0.0001	
AB	0.0397	1	0.0397	11.31	0.0099	
Pure Error	0.0281	8	0.0035			
Cor Total	0.3634	11				

Valoarea modelului F este 31.86 implicațiile modelului sunt semnificative (Tabelul 1). Este o șansă de 0.01% ca valoarea lui F să fie datorate zgomotului de fond. Valorile lui P mai mici de 0.0500 indică faptul că termenii modelului sunt semnificativi. În cazul A, B și AB termenii sunt semnificativi. Valorile mai mari de 0.1000 în modelul termenilor nu sunt semnificative.

Tabelul 2. Corelarea statistica a datelor experimentale

Std. Dev.	0.0592	R²	0.9228
Mean	0.7775	Adjusted R²	0.8938
C.V. %	7.62	Predicted R²	0.8262
		Adeq Precision	12.1843

R^2 prezis are o valoare de 0.8262, iar această valoare se încadrează în aceleași limite cu valoarea lui R^2 ajustat care este egală cu 0.8938; în acest caz, diferența este mai mică de 0.2. Precizia Adeq măsoară raportul dintre semnal și zgomot. Un raport mai mare de 4 este ideal. Raportul pe care l-am obținut este 12.184, ceea ce indică un semnal adecvat (Tabelul 2). Acest model poate fi utilizat în spațiul de proiectare.



Interacțiunea dintre cei doi factori se observă comparând cele două margini ale suprafeței care nu sunt paralele, adică varierea cantității de tendon influențează masa uscată într-un mod mai pronunțat atunci când concentrația de enzimă este mai ridicată (Figura 6). Forma suprafețelor de răspuns sugerează că o deplasare către concentrații mai mari de tendon și enzimă ar putea oferi valori și mai mari ale substanței uscate, conducând probabil la un maxim, unde un model pătratic ar putea fi ajustat.

Figura 6. Reprezentarea răspunsului modelelor în spațiul variabilelor cantitate de tendon și concentrație de enzimă

2. Evaluarea conținutului de hidroxiprolină

În cazul răspunsului reprezentat de concentrația de Hyp (%), analiza statistică ANOVA a fost utilizată pentru a evalua adecvanța modelului de regresie și nivelul de semnificație al variabilelor independente (Tabelul 3) pentru concentrația de hidroxiprolina. Semnificația statistică a coeficienților modelului a fost evaluată prin intermediul valorii p. Coeficienții cu valori p mai mici de 0,05 au fost considerați semnificativi pentru răspunsul modelului. Valoarea calculată a testului F demonstrează adecvanța modelului utilizat în a prezice valori corecte ale răspunsului.

Tabelul 3. Analiza statistică Anova pentru cuantificarea concentrației de hidroxiprolină (Hyp%)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2188.50	3	729.50	96.53	< 0.0001	significant
A-concentratie enzima	68.35	1	68.35	9.05	0.0169	
B-cantitate tendon	811.81	1	811.81	107.42	< 0.0001	
AB	1308.34	1	1308.34	173.13	< 0.0001	
Pure Error	60.46	8	7.56			
Cor Total	2248.96	11				

Valoarea modelului F este 96.53 implicațiile modelului sunt semnificative. Este o șansă de 0.01% ca valoarea lui F să fie datorate zgomotului de fond. Valorile lui P mai mici de 0.0500 indică faptul că termenii modelului sunt semnificativi. În cazul A, B și AB termenii sunt semnificativi. Valorile mai mari de 0.1000 în modelul termenilor nu sunt semnificative (Tabelul 3).

Tabelul 4. Corelarea statistică a datelor experimentale

Std. Dev.	2.75	R²	0.9731
Mean	24.25	Adjusted R²	0.9630
C.V. %	11.34	Predicted R²	0.9395
		Adeq Precision	23.5225

R² prezis are o valoare de 0.9395, iar această valoare se încadrează în aceleași limite cu valoarea lui R² ajustat care este egală cu 0.9630; în acest caz, diferența este mai mică de 0.2. Precizia Adeq măsoară raportul dintre semnal și zgomot. Un raport mai mare de 4 este ideal. Raportul pe care l-am obținut este 23.5225, ceea ce indică un semnal adecvat. Acest model poate fi utilizat în spațiul de proiectare (Tabelul 4).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Concentratie Hyp (% rap la masa uscata)

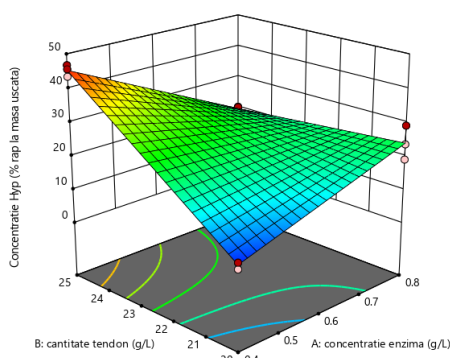
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

6.71 46.78

X1 = A: concentratie enzima

X2 = B: cantitate tendon



Interacțiunea dintre doi factori se observă comparând cele două margini ale suprafeței care nu sunt paralele, adică varierea cantității de tendon influențează concentrația de Hyp (%) într-un mod mai pronunțat atunci când concentrația de enzimă este mai ridicată (Figura 7). Forma suprafețelor de răspuns sugerează că o deplasare către concentrații mai mari de tendon și enzimă ar putea oferi valori și mai mari ale conținutului în Hyp (%), conducând probabil la un maxim, unde un model patratic ar putea fi ajustat.

Figura 7. Reprezentarea răspunsului modelelor în spațiul variabilelor cantitate de tendon și concentrație de enzimă

3. Evaluarea consumului de acid acetic glacial necesar pentru menținerea pH-ului constant

În cazul răspunsului reprezentat de volumul de acid acetic consumate (mL), analiza statistică ANOVA a fost utilizată pentru a evalua adecvanța modelului de regresie și nivelul de semnificație al variabilelor independente (Tabelul 5) pentru volumul de acid acetic. Semnificația statistică a coeficienților modelului a fost evaluată prin intermediul valorii p. Coeficienții cu valori p mai mici de 0,05 au fost considerați semnificativi pentru răspunsul modelului. Valoarea calculată a testului F demonstrează adecvanța modelului utilizat în a prezice valori corecte ale răspunsului.

Tabelul 5. Analiza statistică Anova pentru evaluarea volumului de acid acetic consumat (mL)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	3704.67	3	1234.89	46.60	< 0.0001	significant
A-concentratie enzima	2408.33	1	2408.33	90.88	< 0.0001	
B-cantitate tendon	1200.00	1	1200.00	45.28	0.0001	
AB	96.33	1	96.33	3.64	0.0930	
Pure Error	212.00	8	26.50			

Cor Total	3916.67	11				
------------------	---------	----	--	--	--	--

Valoarea modelului F este 46.60, deci implicațiile modelului sunt semnificative. Este o șansă de 0.01% ca valoarea lui F să fie datorată zgomotului de fond. Valorile lui P mai mici de 0.0500 indică faptul că termenii modelului sunt semnificativi. În cazul A și B termenii sunt semnificativi. Valorile mai mari de 0.1000 în modelul termenilor nu sunt semnificative (Tabelul 5).

Tabelul 6. Corelarea statistică a datelor experimentale

Std. Dev.	5.15	R²	0.9459
Mean	56.67	Adjusted R²	0.9256
C.V. %	9.08	Predicted R²	0.8782
		Adeq Precision	16.2624

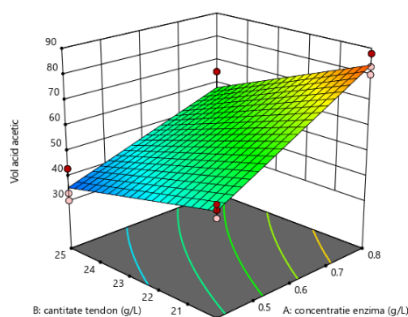
R² prezis are o valoare de 0.8782, iar această valoare se încadrează în aceleași limite cu valoarea lui R² ajustat care este egală cu 0.9256; în acest caz, diferența este mai mică de 0.2. Precizia Adeq măsoară raportul dintre semnal și zgomot. Raportul pe care l-am obținut este 16.262, ceea ce indică un semnal adecvat. Acest model poate fi utilizat în spațiul de proiectare (Tabelul 6).

Interacțiunea dintre cei doi factori se observă comparând cele două margini ale suprafeței care

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Vol acid acetic
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
30 88

X1 = A: concentrație enzimă
X2 = B: cantitate tendon



nu sunt paralele, adică varierea cantității de tendon influențează volumul necesar de acid acetic pentru menținerea pH-ului constant în timpul digestiei într-un mod mai pronunțat atunci când concentrația de enzimă este mai ridicată (Figura 8). Forma suprafețelor de răspuns sugerează că o deplasare către concentrații mai mari de tendon și mai mici de enzimă ar putea reduce consumul de acid acetic necesar pentru menținerea constantă a pH-ului mediului de extracție, conducând probabil la un minim, unde un model patratric ar putea fi ajustat.

Figura 8. Reprezentarea răspunsului modelelor în spațiul variabilelor cantitate de tendon și concentrație de enzimă

4. Evaluarea optimului parametrilor de extracție enzimatică

Dezvoltarea funcției de dezirabilitate este o soluție pentru optimizarea răspunsurilor multiple. Scopul acestei funcții este de a găsi condițiile optime care să asigure respectarea criteriilor tuturor răspunsurilor implicate și, în același timp, să ofere cea mai bună valoare a compromisului în răspunsul dorit. Acest lucru se realizează prin transformarea răspunsurilor multiple într-unul singur, combinând răspunsurile individuale într-o funcție compusă urmată de optimizarea acesteia. Pentru optimizarea concentrației de enzimă și cantitatea de tendon pentru obținerea unei mase uscate maxime, o concentrație cât mai ridicată de Hyp (%) și un volum consumat cât mai redus de acid acetic (criterii de acceptabilitate – Tabelul 6). Valorile generate de dezirabilitate sunt calculate pe baza valorilor optime individuale, care au fost combinate folosind media geometrică [22].

Tabelul 6. Criteriile de acceptabilitate selectate și importanța fiecărui parametru pentru procesul de hidroliză enzimatică

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:concentrație enzimă	is in range	0.4	0.8	1	1	3
B:cantitate tendon	is in range	20	25	1	1	3
Masa uscata	maximize	0.52	1.1	1	1	5
Vol acid acetic	minimize	30	88	1	1	3
Concentrație Hyp	maximize	6.71	46.78	1	1	3

S-au obținut 11 soluții dintre care cea optimă conform criteriilor stabilite în Tabelul 7 este pentru o concentrație de 0.485 g/L enzima pentru o cantitate de tendon de 25 g/L în vederea obținerii

unei mase uscate cât mai ridicată cu un conținut mare de hidroxiprolină și un consum redus de acid acetic. Optimizarea parametrilor celor 3 factori sunt dați de funcția de desirabilitate.

Tabelul 7. Soluțiile generate de soft pentru obținerea unor valori de desirabilitate cât mai apropiate de optim conform criteriilor selectate

Number	concentratie enzima	cantitate tendon	Masa uscata	Vol acid acetic	Concentratie Hyp	Desirability	
1	0.485	25.000	0.849	40.155	39.845	0.696	Selected
2	0.487	25.000	0.850	40.279	39.706	0.696	
3	0.484	25.000	0.849	40.098	39.911	0.696	
4	0.482	25.000	0.848	40.007	40.013	0.696	
5	0.481	25.000	0.846	39.912	40.121	0.696	
6	0.491	25.000	0.853	40.513	39.441	0.696	
7	0.493	25.000	0.854	40.598	39.345	0.696	
8	0.500	25.000	0.859	41.024	38.861	0.696	
9	0.456	25.000	0.831	38.495	41.725	0.695	
10	0.422	25.000	0.810	36.583	43.889	0.692	
11	0.736	25.000	1.004	54.387	23.737	0.628	

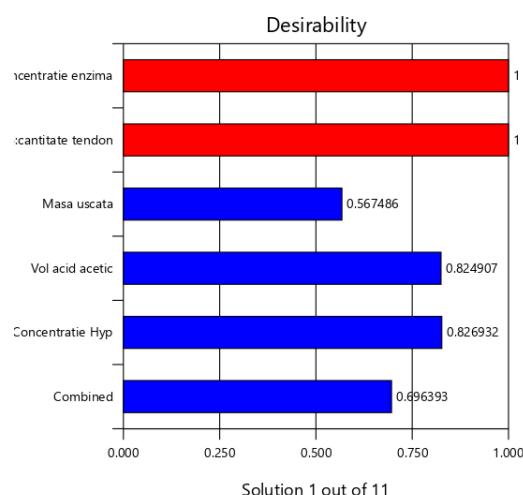


Figura 9. Soluția pentru optimizarea răspunsului multiplu - grafic cu bare de desirabilitate și optimizare combinată a răspunsurilor

În Figura 7 sunt rezultatele sunt exprimate sub formă de rampă, demonstrând valorile de compromis ale procedurii de optimizare numerică în care s-au stabilit criteriile din tabelul 6 pentru obținerea unei desirabilități maxime. Obiectivul acestui proces a fost de a găsi eficiența maximă a procesului de extracție enzimatică a collagenului din tendonul bovin.

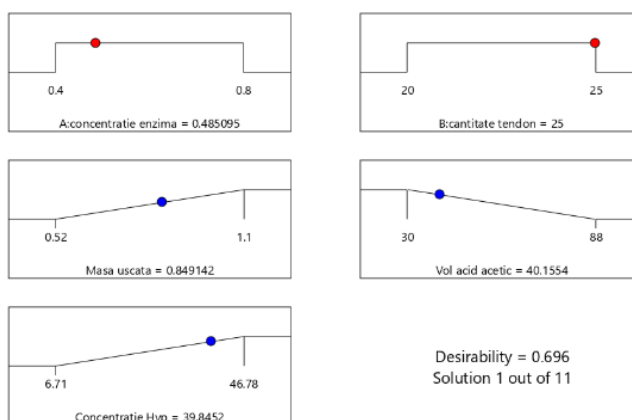


Figura 7. Soluția pentru optimizarea răspunsului multiplu - reprezentarea sub forma de rampă pentru factorii variați date de cele două răspunsuri

A1.2. Prepararea complexelor moleculare de incluziune ciclodextrine – principii și caracterizarea acestora

Scopul activității constă în elaborarea unor procedee și tehnici de preparare ale complexelor supramoleculare de incluziune cu principiile active. Pe baza acestora se vor stabili parametri optimi, în funcție de metodele experimentale care vor fi utilizate, în vederea caracterizării complexelor moleculare.

Astfel, pentru prepararea complexelor moleculare în fază lichidă s-a ținut cont atât de gradul de solubilitate individuală a principiilor active și a β ciclodextrinei, cât și de domeniile de concentrație specifice metodelor experimentale care vor fi folosite în vederea punerii în evidență a complexelor moleculare. S-au preparat soluții apoase stoc de concentrații molare exacte, atât pentru substanța activă cât și pentru β CD. După cântăririle efective, soluțiile au fost omogenizate prin agitare continuă la temperatură constantă de 30°C timp de 24 de ore.

Există o serie de metode consacrate pentru obținerea complexelor de incluziune în fază solidă, dintre care unele sunt larg utilizate în literatura de specialitate: amestecarea fizică, frământarea, coprecipitarea, liofilizarea și atomizarea.

Amestecarea fizică – constă în realizarea unui amestec fizic în scopul omogenizării amestecului substanței bioactive cu ciclodextrină, de obicei în raport molar 1:1. În acest mod se obține un amestec fizic, relativ omogen, fără a avea loc interacțiuni între cele două componente și fără a se produce complexarea propriu-zisă. Literatura de specialitate arată că o amestecare fermă, într-o moară cu bile de agat pe o durată de circa 20 minute uneori poate produce chiar o complexare.

Frământarea – constă în amestecarea stoechiometrică a substanței bioactive și a ciclodextrinei, umectarea amestecului cu o cantitate redusă de solvent și mojararea continuă a pastei formate. Mojararea se face până la uscarea (îndepărtarea majorității cantității de solvent) amestecului. Procedul se repetă de câteva ori, astfel încât durata totală a procesului să fie de minim 40 minute.

Coprecipitarea – constă în dizolvarea substanței bioactive și a ciclodextrinei într-un solvent comun sau dizolvarea fiecărui component în solventul propriu (cu condiția ca solventii utilizați să fie miscibili), amestecarea soluțiilor, echilibrarea acestora prin agitare magnetică la temperatura camerei sau la ușoară încălzire, urmată de îndepărtarea solventului (amestecului de solventi) conținând cele două substanțe printr-o metodă adecvată (filtrare, evaporare, etc).

Liofilizarea (freeze drying) – reprezintă procedeul prin care îndepărtarea solventului are loc la presiune și temperatură scăzute (uscarea prin înghețare). Soluția conținând cele două componente care se supun complexării se prepară în mod asemănător cu metoda anterioară.

Atomizarea (spray drying) – soluția conținând substanțele supuse complexării este pulverizată și amestecată cu aer cald, picăturile lichide având diametrul de 10-200 μ m, rezultând o suprafață totală mare expusă uscării.

Metodele de preparare ale complexelor moleculare, vor fi optimizate individual, adecvat pentru fiecare moleculă activă în parte, în funcție de proprietățile fizico- chimice ale principiilor active și de provocările tehnice care vor apărea pe parcursul investigațiilor experimentale. Pentru a pune în evidență specificitatea individuală a fiecărei metode de preparare utilizată pentru fiecare metodă de investigare a formării complexelor moleculare de incluziune ne vom referi (ca exemplu) la prepararea complexelor moleculare vitamina C - β ciclodextrină (Vit C : β CD).

Vitaminele sunt indispensabile, în cantități mici, funcționării normale a organismului. Dar majoritatea vitaminelor nu pot fi sintetizate de către organism, deci ele trebuie obținute obligatoriu din alimentație, deoarece deficiența lor poate fi cauza directă a apariției unor boli (ex. vitamina C (acid ascorbic) - scorbut, stări de oboseală, dureri musculare, afectarea sintezei colagenului; vitamina A (retinol) – deficiențe de vedere, disfuncționalități ale sistemului reproductiv și a multiplicării celulare; vitamina D (calciferol) - rahitism, probleme în absorbția Ca și P, psoriasis, nefrite, arteroscleroză; vitamina E (tocoferol) - sterilitate, probleme neurologice, boli musculare, boli cardiace, etc.)

Suplimentarea dietei cu vitamine este larg răspândită în ziua de azi. Există 13 vitamine esențiale pentru organism, acestea sunt împărțite după solubilitate în două grupe: patru dintre ele fiind solubile în grăsimi (vitaminele A, D, E și K) și celelalte nouă în apă (8 vitamine B și vitamina C). Pe lângă cele 13 vitamine cunoscute, mai există un număr mare de substanțe cu rol asemănător vitaminelor, numite pseudo-vitamine, dintre acestea poate cele mai cunoscute sunt flavonoizii, numiți uneori și vitamina P.

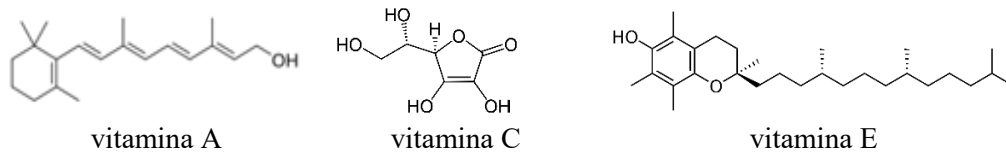


Figura 1. Formula structurală a vitaminelor

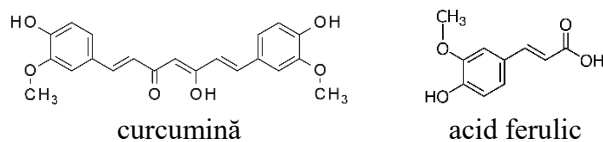


Figura 8. Formula structurală a flavonoidelor

Se știe că o substanță biologic activă, condiționată sub diferite forme de administrare (solide, lichide), acționează pe cale orală, parenterală sau locală, cu efecte terapeutice de intensitate și durată diferite, în funcție și de natura substanțelor auxiliare utilizate și a factorilor tehnologici care influențează disponibilitatea farmaceutică și biodisponibilitatea acestora [23].

Multe molecule care sunt biologic active *in vitro* sunt inactive în condiții *in vivo*, ca urmare a unor posibile probleme, precum stabilitatea și solubilitatea redusă sau transportul limitat prin membranele celulare. Pe de altă parte, substanțele bioactive care sunt puternic polare și solubile în mediu apos, pot avea de asemenea o slabă biodisponibilitate ca rezultat al unor penetrări inefficiente prin dublul strat lipid-hidrofob al membranelor celulare [24], [25]. Pentru rezolvarea acestor probleme, cea mai utilizată metodă este complexarea [2,3] acestor substanțe cu ciclodextrine [26].

Ciclodextrinele (CD) sunt oligozaharide ciclice care au o suprafață exterioară hidrofilă și una interioară hidrofobă. Există diferite tipuri de CD, funcție de numărul de unități de glucopiranoză [α -șase; β -șapte, γ -opt, etc.] din structură (Fig. 3). Ciclodextrinele și derivații lor hidrofilici sunt utilizați pentru a crește solubilitatea și/sau viteza de dizolvare a substanțelor bioactive slab solubile în apă, pentru controlul eliberării substanței bioactive sau pentru mascarea unor proprietăți neplăcute.

Structura lor convexă, cu partea externă hidrofilă și partea internă hidrofobă, le face să fie cei mai importanți compuși organici simpli, capabili de a forma sisteme mult mai solubile de tipul gazdă-oaspete prin legături necovalente, precum interacțiunile van der Waals, efectul hidrofob, reorganizarea solvenților (solventului) sau legături de hidrogen [27]. Arhitectura moleculelor de ciclodextrină permite includerea unor molecule – substanțe active hidrofobe, de dimensiunea a unul sau două cicluri benzenice. Din acest motiv, primul considerent, crucial, de care trebuie să se țină cont în abordarea unui studiu de încapsulare a unei substanțe în ciclodextrine este cel steric.

Încapsularea moleculară concepută ca formare de complecși monomoleculari, oferă o soluție pentru dezvoltarea de noi formulări farmaceutice și forme de dozare ale substanțelor bioactive. Se impune un studiu detaliat asupra metodelor de preparare, precum și de caracterizarea proprietăților complecșilor de incluziune prin diferite metode de analiză fizico-chimice.

Prepararea complexului de incluziune dintre vitamina C și β -ciclodextrină în fază solidă

Dată fiind solubilitatea în apă atât a vitaminei C (Vit C), cât și a β -ciclodextrinei (β CD), solventul principal utilizat pentru prepararea complexului de incluziune a celor două substanțe este apa. S-a avut în vedere prepararea unui complex de incluziune în raport molar de 1:1, făcând uz de diferite condiții și metode de preparare.

Obținerea complexului vit C – β CD prin frământare în moară cu bile

- s-au cântărit cantități corespunzătoare pentru un raport molar de 1:1, respectiv 6 mg de Vit C și 44 mg de β CD. Cele două solide au fost amestecate ușor și introduse în recipientele corespunzătoare morii cu bile, apoi umectate cu o cantitate mică de 20 μ L de solvent. Solventul folosit a fost apa, respectiv un amestec apa-etanol 4:1 (v/v). Amestecarea a avut loc la o frecvență de 30 Hz, timp de 2x60 minute. Amestecurile umede rezultate au fost uscate la temperatura camerei, rezultând o pudră de culoare albă în ambele cazuri (*VitC- β CD_apa_mill*, *VitC- β CD_apa-EtOH_mill*).

Obținerea complexului vit C – β CD prin coprecipitare, urmată de liofilizare

- s-au cântărit cantități corespunzătoare pentru un raport molar de 1:1, respectiv 12 mg de VitC și 88 mg de β CD.
- cei 88 mg de β CD au fost dizolvați în 12 mL de apă, sub agitare, la temperatura de 80°C timp de 5 min. La soluția astfel obținută, după răcire, s-a adăugat în picături soluția de Vit C obținută prin dizolvarea celor 12 mg de vitamina C în 2 mL amestec apă-etanol 1:1 (v/v). Amestecul astfel obținut a fost agitat la temperatura camerei timp de 20 ore, iar solventul a fost îndepărtat prin liofilizare, rezultând o pulbere de culoare albă (*VitC- β CD_copp1_FD*).
- amestecul solid format din 88 mg de β CD și 12 mg VitC a fost dizolvat în 3 mL solvent, format din 2.7 mL apă și 0.3 mL etanol (9:1, v/v), sub agitare, la temperatura camerei și echilibrat timp de 3 ore. Solventul a fost îndepărtat prin liofilizare, rezultând o pulbere de culoare albă (*VitC- β CD_copp2_FD*).

Obținerea complexului vit C – β CD prin liofilizare, la pH acid

-179,6 mg β CD au fost dizolvați în 15 mL apă, sub agitare la temperatura de 80°C timp de 5 min. 24 mg de VitC s-au dizolvat în 27 mL apă distilată, rezultând o soluție de concentrație 0.005 M. pH-ul soluției de VitC a fost fixat la valoarea de 2.6 prin adăugarea de 50 μ L soluție de H_2SO_4 (0.1 M), cele două soluții au fost amestecate și echilibrate timp de 5 min. la temperatura camerei. Soluția finală, congelată, a fost liofilizată, rezultând o pulbere albă (*VitC- β CD_FD_pH*).

Evidențierea formării complexelor de incluziune cu β -ciclodextrină în fază solidă

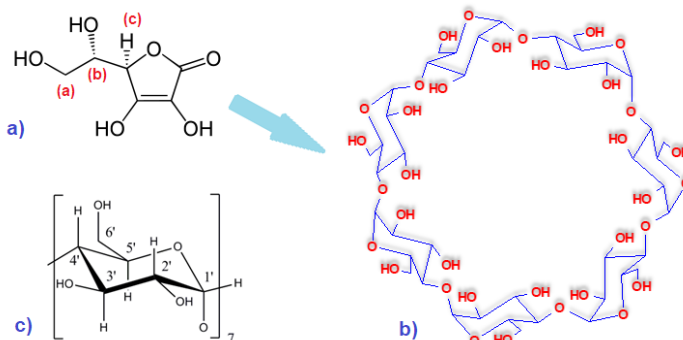
Metodele cele mai des utilizate pentru evidențierea formării complexelor de incluziune sunt: difracția de raze X pe pulberi, spectroscopia de infraroșu și calorimetria cu scanare diferențială. Ideea de bază constă în compararea datelor obținute prin analiza: (i) substanței bioactive pure, (ii) β -ciclodextrinei, (iii) amestecului fizic ale celor două componente, și (iv) complexului de incluziune ale celor două componente, obținut prin diferite metode de preparare.

Dacă datele obținute la analiza complexului de incluziune diferă de cele ale substanței bioactive pure (molecula oaspete), precum și de acelea ale β -ciclodextrinei (molecula gazdă), se poate afirma că s-a format o nouă structură care reprezintă un ansamblu supramolecular de tip oaspete-gazdă. Pentru un amestec fizic, datele obținute prin analiză corespund unei însumări ale datelor corespunzătoare componentelor pure.

După cum menționam mai sus, studiul metodelor de preparare, precum și de caracterizarea proprietăților complexelor de incluziune prin diferite metode de analiză fizico-chimice este necesar pentru confirmarea structurilor obținute.

Spectroscopie 1H RMN

Figura 9. a) Structura moleculei vitamina C; b) structura moleculară a β ciclodextrinei; c) unitate de glucoză din β CD. Numerotarea corespunde pozițiilor protonilor la care se va face referire în studiul RMN.



În vederea studierii procesului de complexare și determinarea stoichiometriei complexului de incluziune format dintre vitamina C și β CD în soluție prin RMN, după mai multe încercări, au fost preparate două soluții stoc de Vit C și β CD, fiecare având o concentrație de 10mM în D_2O (apă deuterată 99,8 % D, folosită în prepararea probelor apoase). Pe baza acestor soluții echimolare au fost preparate o serie de probe de concentrații diferite (diluții) care conțin substanța activă -Vit C și β CD. Procedul a constat în amestecarea celor două soluții la volum constant în diverse proporții astfel încât să fie acoperit un domeniu complet ($0 < r < 1$) de fracții molare $r = [X]/([G] + [H])$. $X = H$ sau G iar $[H]$ și $[G]$ sunt concentrațiile moleculei gazdă (β CD) respectiv oaspete (Vit C). În acest mod concentrația totală $[H]_t + [G]_t = 10 \text{ mM}$ a fost menținută constantă pentru fiecare probă. Acest set de probe va fi folosit și pentru evaluarea constantei de asociere K.

Toate măsurătorile ^1H NMR au fost efectuate cu spectrometrul Bruker AVANCE III care operează la o frecvență de 500.13 MHz pentru proton, echipat cu un cap de probă de bandă largă cu detecție inversă (BBO). Spectrele RMN s-au înregistrat în soluții de apă deuterată (D_2O) la temperatura de 298 ± 0.1 K, toate deplasările chimice s-au măsurat relativ la tetra-metil-silan (TMS) – folosit ca referință internă. Pentru fiecare experiment ^1H NMR s-au acumulat între 32 și 64 scanări cu un număr de 65 K de puncte pe un domeniu spectral de 4000 Hz care reprezintă 8 ppm, folosind un timp de revenire la echilibru al magnetizării de 3s.

RMN în soluție poate evidenția direct includerea unei molecule oaspete în cavitatea hidrofobă a βCD . Procesul de incluziune al moleculelor de Vit C în cavitatea βCD este evidențiat de către modificarea deplasărilor chimice ale unor protoni caracteristici moleculei oaspete în comparație cu deplasările chimice ale acelorași protoni în componenții aflați în stare liberă.

În Figura 4 sunt prezentate spectrele ^1H RMN pentru vitamina C, βCD , respectiv Vit C: βCD . Atribuirea semnalelor ^1H RMN specifice Vit C s-a făcut pe baza spectrului bidimensional ^1H - ^1H COSY

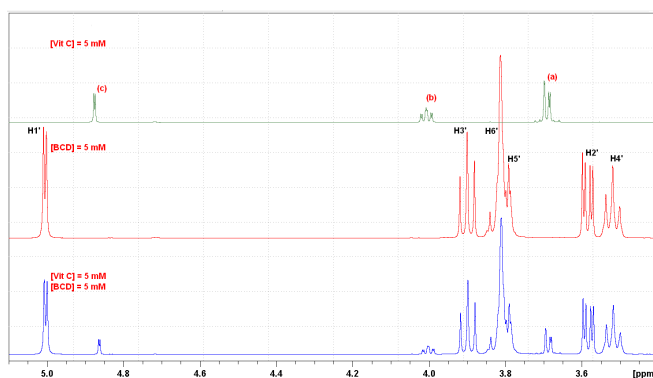
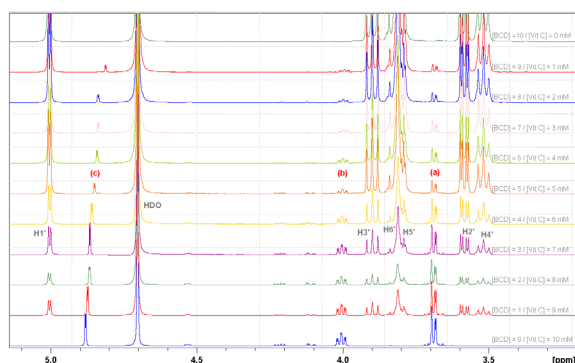


Figura 10. Spectrele ^1H RMN (de sus în jos): Vit C și βCD în stare liberă și în raport molar 1:1, cu atribuirea semnalelor descrisă în Figura 3.

Figura 11. Spectrul ^1H - ^1H COSY RMN (Correlated Spectroscopy) pentru vitamina C.



RMN (Correlated Spectroscopy) prezentat în Figura 5, în care se pot pune în evidență interacțiunile intramoleculare dintre semnalele următorilor protoni: H(c) cu H(b); H(b) cu H(a). Trebuie menționat faptul că semnalele protonilor din grupările $-\text{OH}$, se suprapun peste semnalele apei, iar măsurătorile care au generat spectrele RMN prezentate în Figurile 10 și 11 au fost efectuate un program de pulsuri specific suprimării semnalului apei (*zgpr*), folosit pentru a elimina din spectru acest semnal.

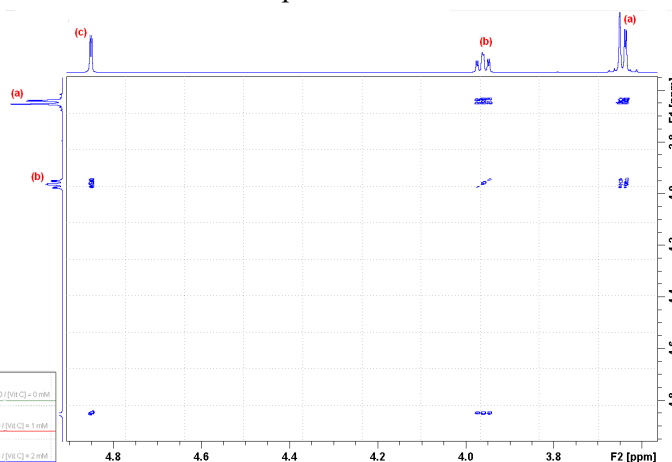


Figura 12. Spectrele ^1H RMN (de sus în jos): Vit C și βCD în stare liberă și în diferite rapoarte molare, cu atribuirea semnalelor descrisă în Figura 3.

Tehnica de variație continuă a fost utilizată pentru evidențierea formării complexului în soluție apoasă. Comparând spectrele din Figura 6, se pot observa ușoare variații ale deplasărilor

chimice ($\Delta\delta$) pentru protonul H(c) al Vit C, în prezență de βCD evidențiind existența interacției moleculare dintre Vit C și interiorul cavității βCD , acest fapt este o indicație clară a formării complexului de incluziune Vit C: βCD . Din păcate, așa cum se observă în Figura 12, acest semnal este singurul care prezintă o variație a deplasărilor chimice. Așadar, variația deplasărilor chimice observată ne permite să utilizăm metoda variației continue în vederea determinării stoichiometriei complexului de incluziune format. În cazul nostru, această metodă se bazează pe variația indusă a deplasărilor chimice, $\Delta\delta = \delta_{\text{f}} - \delta_{\text{obs}}$, care este direct legată de concentrația complexului de incluziune format. Astfel,

dacă o mărime fizică care conține ΔS , este reprezentată în funcție de fracția molară a moleculei gazdă sau oaspete r , (grafic Job), valoarea maximă va apare la $r_{vit C} = m/(m+n)$, unde m și n sunt rapoartele molare ale Vit C, respectiv ale βCD în complexul format. Această metodă a fost aplicată pentru protonul H(c) care aparține moleculei oaspete – vitamina C. În acest caz, graficul Job prezintă un maxim la $r = 0.5$, indicând astfel existența unui complex de incluziune cu stoichiometria 1:1. Rezultatele acestor tipuri de determinări urmând a fi prezentate în raportul aferent etapei 1 a anului 2023.

Calorimetria de titrare izotermă (ITC)

ITC este o tehnică extrem de sensibilă și deosebit de puternică, capabilă să caracterizeze din punct de vedere termodinamic interacțiile relativ slabe care se manifestă în procesele de asociere moleculară. Printr-un experiment ITC se pot determina parametrii termodinamici (K , ΔG , ΔH , ΔS și n). Necesită doar cantități mici de probă și nu are nevoie de marker molecular care poate genera interferențe. Variația de energie ΔH reflectă contribuția legăturilor de hidrogen, interacțiuni electrostatice și forțe Van der Waals. ΔS reflectă o modificare a gradului de ordine a sistemului și are legătură cu interacțiunile hidrofobe și este proprietatea termodinamică care descrie modul în care moleculele sunt distribuite într-un sistem.

Experimentele ITC au fost efectuate utilizând calorimetrul Nano ITC^{2G} (TA Instruments, New Castle, Delaware, SUA). Soluțiile au fost degazate înainte de fiecare experiment. Titrarea a fost efectuată la 25 °C, prin injectarea soluției apoase de Vitamina C (1 mM) în serii a câte 25 de injecții de volum 10 μL în celula probă conținând βCD (50, 25 μM). Sistemul a fost agitat la o viteză de 250 rpm de-a lungul întregului experiment. Intervalul dintre injecții a fost de 300 s, timp suficient de lung pentru ca semnalul să revină la linia de bază și pentru ca sistemul să fie menținut la echilibru. Căldura cedată sau absorbită în timpul titrării calorimetrice este proporțională cu fracția de ligand legat. Astfel, este extrem de important să determinăm cu exactitate concentrațiile inițiale ale macromoleculei și ligandului. Pe măsură ce moleculele de βCD devin saturate cu molecule de vitamina C, căldura eliberată se diminuează, în final rămânând doar căldura de diluție. Căldura de diluție se obține în condiții experimentale identice prin injectarea vitaminei C în apă. În general, valoarea acesteia este mult mai mică comparativ cu căldura de reacție și este scăzută din datele rezultate prin titrarea vitaminei C în βCD pentru a corecta efectele de diluare, amestecare și injectare.

În vederea realizării experimentelor ITC s-au preparat soluții apoase de vitamina C (20mM-1mM) respectiv β ciclodextrină (1mM- 250 μM) de concentrații diferite. Pentru soluțiile stoc am baleat un domeniu mai larg de concentrații în funcție de solubilitatea compușilor respectivi pentru a obține concentrarea complexului în celula calorimetrului, care la rândul său duce la măsuratori mai fiabile de căldură. Toate soluțiile au fost proaspăt preparate și au fost degazate înainte de fiecare experiment.

Prezentăm în continuare câteva termograme reprezentative care pun în evidență efectele calorice care rezultă în urma titrării β ciclodetrinei cu vitamina C la concentrații diferite și conțin atât contribuția căldurii de legare cât și cea a diluției.

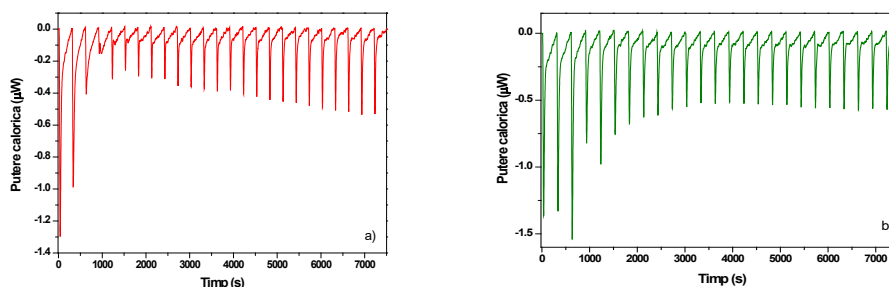


Figura 13. Variația fluxului de căldură / puterea electrică în funcție de timp, titrant: Vitamina C; titrand: β -CD. Datele primare obținute prin injectarea soluției de vitamina C (1mM) distribuită în 10 μL per injecție în soluție de β ciclodextrină: a) 50 μM și b) 25 μM , la 25°C.

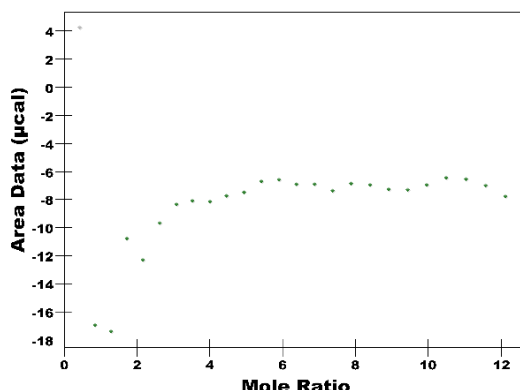


Figura 14. Dependența căldurii eliberate pe injecție în funcție de raportul molar al partenerilor de reacție.

În toate cazurile investigate procesele sunt de tip exoterm. Termogramele obținute evidențiază că amplitudinea peak-urilor scade odată cu scăderea concentrației de vitamina C indicând astfel dependența energiei eliberate în timpul titrării în funcție de concentrația folosită.

Remarcăm că valorile căldurii eliberate per injecție în timpul titrării sunt destul de mici. De asemenea, acestea sunt comparabile cu valorile căldurilor obținute prin simple titrări de diluție. În cazul în care, pentru fiecare injecție, căldura de diluție se scade, se obțin diferențe foarte mici care nu prezintă nici o variație semnificativă cu raportul molar (Figura 14). În concluzie, datele măsurate sunt prea dispersate pentru a putea fi integrate și în această situație parametrii termodinamici nu au putut fi obținuți fapt ce indică o afinitate scăzută a vitaminei C fata de β CD.

A1.3. Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obținute în etapa 2022 au fost diseminate în cadrul a doua conferințe naționale.

- Participarea la 14th International Conference on Physics of Advanced Materials - ICPAM-14), 08-15 septembrie 2022, Dubrovnik Croatia, cu lucrarea: “Study the mechanism to form inclusion complex of β -cyclodextrin with quaternary ammonium compound by spectroscopic, calorimetric and molecular modeling approaches” - T8-P2, Adrian Pîrnău, Mihaela Mic, Călin G. Floare, Maria Miclăuș, Irina Kacso, Mariana Palage, Csilla Molnar, Tihăuan Bianca-Maria (<https://icpam.ro/programme-icpam/>).
- Participarea la sesiunea de comunicări științifice „D. Brandza”, Ediția a XXVIII-a, 4-5 noiembrie 2022, București, ISBN 978-606-16-1367-0, cu lucrarea ” Ghid metodologic privind evaluarea siguranței și eficacității biologice a produselor dermatocosmetice destinate regenerării epidermei”, Bianca-Maria Tihăuan, Grațiana Grădișteanu, Mădălina Axinie, Sergiu Stelian Maier, Marin Angheloiu, Mariana Carmen Chifiriuc (<https://gradina-botanica.unibuc.ro/stiinta-si-conservare/sesiuni-stiintifice/>).

În vederea asigurării transparenței proiectului GRACE s-a realizat site-ul www.sanimed.ro/proiecte/grace unde au fost încărcate concluziile acestei etape împreună cu rezultatele și diseminarea acestora.

Concluziile Etapei 2022

Toate obiectivele etapei au fost atinse ca urmare a parcurgerii activităților înscrise în planul de realizare a proiectului GRACE. Prezentul raport de etapă rezumă rezultatele obținute. Sintetizând, s-au efectuat integral următoarele activități:

- obținerea collagenului de tip 1 prin optimizarea procesului tehnologic, a procedurii de obținere a hidrogelului reticulat și optimizarea procesului de liofilizare;
- evaluarea experimentală privind evaluarea morfologiei hidrogelului reticulat, determinarile spectrofotometrice ale indicelui de reticulare, evaluarea ratelor de degradare ale hidrogelului prin optimizarea procesului tehnologic;

- prepararea complexelor supramoleculare și optimizarea protocoalelor și a tehnologiei de sinteză a acestora, demonstrarea gradului de complexare, a parametrilor optimi de reacție precum și a specificațiilor vizate în complexii finali;
- evaluările calitative și de conformitate ale principiilor active și specificațiile acestora;
- participarea la evenimente științifice (2 conferințe);
- realizarea paginii web a proiectului.

Rezumatul etapei 2022

Etapă aferentă anului 2022 a avut ca obiectiv optimizarea procesului de obținere a matricei de bază de tip hidrogel și a complexelor moleculare de incluziune reprezentate de ciclodextrine. Obiectivul propus a fost atins cu ajutorul celor trei activități, și anume A1.1. Obținerea matricei de bază sub formă de hidrogel reticulat, A1.2. Prepararea complexelor moleculare de incluziune ciclodextrine – principii și caracterizarea acestora și A1.3. Diseminarea rezultatelor. Ca urmare a optimizării prin design experimental a procesului tehnologic s-a determinat faptul că concentrațiile de enzimă influențează într-o proporție mai ridicată consumul de acid acetic însă cu o rată mai scăzută conținutul de substanță uscată și de Hyp (%). Mai mult decât atât, cantitatea de tendon influențează într-o măsură mai mică volumul de acid acetic consumat însă mai ridicată pentru conținutul de substanță uscată și Hyp (%). Astfel, prin funcția de desirabilitate s-a observat că optimul prin variația cantității tendonului bovin și a concentrației de pepsină s-a obținut pentru varianta cu 25 g/L tendon și 0.485 g/L enzimă cu o valoare a desirabilității de 0.696. Aceste rezultate au condus la coroborarea experienței anterioare privind reticularea produselor colagenice și la selecția unei metode chimice de reticulare în prezența genipinului – compus natural ușor detectabil în produsul finit datorită fluorescenței intrinseci. Micrografiile SEM realizate au confirmat structura caracteristică a scaffoldului colagenic rezultat în urma optimizării procesului de extracție și concomitent a celui de liofilizare. Au fost optimizate o serie de procedee și tehnici de preparare ale complexelor supramoleculare de incluziune cu principiile active, în termeni concreți fiind preparați complecși moleculare de incluziune - ciclodextrine, și înglobare în aceștia de vitamina C. Utilizând difracția de raze X pe pulberi, spectroscopia de infraroșu și calorimetria cu scanare diferențială a fost evidențiată formarea complexelor de incluziune cu β -ciclodextrină în fază solidă, prin analiza: (i) substanței bioactive pure, (ii) β -ciclodextrinei, (iii) amestecului fizic ale celor două componente, și (iv) complexului de incluziune ale celor două componente, obținut prin diferite metode de preparare. Diseminarea rezultatelor s-a realizat prin participarea la două conferințe din domeniu (dintre care una cu participare internațională).

În vederea asigurării transparenței proiectului GRACE s-a realizat site-ul www.sanimed.ro/proiecte/grace unde a fost încărcat rezumatul acestei etape împreună cu rezultatele și diseminarea acestora.

Bibliografie

- [1] Y.-H. Jiang *et al.*, "Cross-linking methods of type I collagen-based scaffolds for cartilage tissue engineering," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 14, no. 2, p. 1146, 2022, Accessed: Dec. 05, 2022. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC8902548/](https://pmc/articles/PMC8902548/).
- [2] L. Salvatore, N. Gallo, M. L. Natali, A. Terzi, A. Sannino, and M. Madaghiele, "Mimicking the Hierarchical Organization of Natural Collagen: Toward the Development of Ideal Scaffolding Material for Tissue Regeneration," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 258, Apr. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2021.644595/BIBTEX.
- [3] B. J. Bielajew, J. C. Hu, and K. A. Athanasiou, "Collagen: quantification, biomechanics and role of minor subtypes in cartilage," *Nat. Rev. Mater.* 2020 510, vol. 5, no. 10, pp. 730–747, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41578-020-0213-1.
- [4] B. Maria Oosterlaken, M. Paula Vena, G. de With, B. M. Oosterlaken, M. P. Vena, and G. de With, "In Vitro Mineralization of Collagen," *Adv. Mater.*, vol. 33, no. 16, p. 2004418, Apr. 2021, doi: 10.1002/ADMA.202004418.
- [5] L. Yu and M. Wei, "Biomimetic Mineralization of Collagen-Based Materials for Hard Tissue Repair," *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 944, vol. 22, no. 2, p. 944, Jan. 2021, doi: 10.3390/IJMS22020944.
- [6] C. Vallecillo, M. Toledano-Orsorio, M. Vallecillo-Rivas, M. Toledano, A. Rodriguez-Archilla, and R. Orsorio, "Collagen Matrix vs. Autogenous Connective Tissue Graft for Soft Tissue Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis," *Polym.* 2021, Vol. 13, Page 1810, vol. 13, no. 11, p. 1810, May 2021, doi: 10.3390/POLYM13111810.
- [7] B. Ucar, "Natural biomaterials in brain repair: A focus on collagen," *Neurochem. Int.*, vol. 146, p. 105033, Jun.

- 2021, doi: 10.1016/J.NEUINT.2021.105033.
- [8] A. Sionkowska, K. Adamiak, K. Musial, and M. Gadomska, "Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review," *Mater. 2020, Vol. 13, Page 4217*, vol. 13, no. 19, p. 4217, Sep. 2020, doi: 10.3390/MA13194217.
 - [9] E. Rezvani Ghomi, N. Nourbakhsh, M. Akbari Kenari, M. Zare, and S. Ramakrishna, "Collagen-based biomaterials for biomedical applications," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 109, no. 12, pp. 1986–1999, Dec. 2021, doi: 10.1002/JBM.B.34881.
 - [10] N. Reddy, Y. Li, and Y. Yang, "Alkali-catalyzed low temperature wet crosslinking of plant proteins using carboxylic acids," *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, no. 1, pp. 139–146, Jan. 2009, doi: 10.1002/BTPR.86.
 - [11] T. Kawamura, S. Yunoki, Y. Ohyabu, T. Uraoka, and K. Muramatsu, "Crosslinking Efficacy and Cytotoxicity of Genipin and Its Activated Form Prepared by Warming It in a Phosphate Buffer: A Comparative Study," *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 14, no. 21, Nov. 2021, doi: 10.3390/ma14216600.
 - [12] Y. J. Hwang, J. Larsen, T. B. Krasieva, and J. G. Lyubovitsky, "Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 7, pp. 2579–2584, 2011, doi: 10.1021/am200416h.
 - [13] H. Chen, W. Ouyang, B. Lawuyi, C. Martoni, and S. Prakash, "Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 75A, no. 4, pp. 917–927, Dec. 2005, doi: 10.1002/JBM.A.30492.
 - [14] E. V. Dare *et al.*, "Genipin Cross-Linked Fibrin Hydrogels for in vitro Human Articular Cartilage Tissue-Engineered Regeneration," *Cells Tissues Organs*, vol. 190, no. 6, pp. 313–325, Nov. 2009, doi: 10.1159/000209230.
 - [15] H. W. Sung, W. H. Chang, C. Y. Ma, and M. H. Lee, "Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 64, no. 3, pp. 427–438, Mar. 2003, doi: 10.1002/JBM.A.10346.
 - [16] X. Chen *et al.*, "Effect of the Application of a Dehydrothermal Treatment on the Structure and the Mechanical Properties of Collagen Film," *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 13, no. 2, Jan. 2020, doi: 10.3390/MA13020377.
 - [17] X. Chen *et al.*, "The structure and properties of natural sheep casing and artificial films prepared from natural collagen with various crosslinking treatments," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 135, pp. 959–968, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.182.
 - [18] S. D. Gorham *et al.*, "Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 14, no. 3, pp. 129–138, 1992, doi: 10.1016/S0141-8130(05)80002-9.
 - [19] M. G. Haugh, C. M. Murphy, and F. J. O'Brien, "Novel Freeze-Drying Methods to Produce a Range of Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds with Tailored Mean Pore Sizes," *https://home.liebertpub.com/tec*, vol. 16, no. 5, pp. 887–894, Dec. 2009, doi: 10.1089/TEN.TEC.2009.0422.
 - [20] A. Abbott, M. E. Gravina, M. Vandadi, N. Rahbar, and J. M. Coburn, "Influence of lyophilization primary drying time and temperature on porous silk scaffold fabrication for biomedical applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 111, no. 1, pp. 118–131, Jan. 2023, doi: 10.1002/JBM.A.37451.
 - [21] B. M. Tihăuan *et al.*, "Crosslinked Collagenic Scaffold Behavior Evaluation by Physico-Chemical, Mechanical and Biological Assessments in an In Vitro Microenvironment," *Polym. 2022, Vol. 14, Page 2430*, vol. 14, no. 12, p. 2430, Jun. 2022, doi: 10.3390/POLYM14122430.
 - [22] L. Vera Candioti, M. M. De Zan, M. S. Cámara, and H. C. Goicoechea, "Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development," *Talanta*, vol. 124, pp. 123–138, Jun. 2014, doi: 10.1016/J.TALANTA.2014.01.034.
 - [23] I. P. Dumitru Lupuleasa, *Tehnologie farmaceutica*, II, vol. II. Editura Polirom, 2017.
 - [24] S.E.Leucuta, *Farmacocinetica si biodisponibilitatea in terapia medicamentoasa*. Ed. Med. Buc., 1989.
 - [25] G. Price and D. A. Patel, "Drug Bioavailability," *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.*, pp. 1–2, Jun. 2022, doi: 10.1016/B978-008055232-3.60035-2.
 - [26] E. Albers and B. W. Müller, "Complexation of steroid hormones with cyclodextrin derivatives: substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution," *J. Pharm. Sci.*, vol. 81, no. 8, pp. 756–761, 1992, doi: 10.1002/JPS.2600810808.
 - [27] A. Lopata, F. Darvas, Á. Stadler-Szóke, and J. Szejtli, "Quantitative structure-stability relationships among inclusion complexes of cyclodextrins. I: Barbituric acid derivatives," *J. Pharm. Sci.*, vol. 74, no. 2, pp. 211–213, 1985, doi: 10.1002/JPS.2600740223.

05.12.2022

Director de proiect,

Dr. Biochim. Bianca-Maria Tihăuan

