



TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

Materiale spongioase pe bază de colagen, piroxicam și ciprofloxacină pentru aplicații chirurgicale

Autor: Medic Cristian – Daniel IOAN

Conducător de doctorat: Prof. Habil. Dr. Ing. Ileana RĂU

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. Dr. Ing. Stefan Voicu	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București
Conducător de doctorat	Prof. Dr. Ing. Ileana Rău	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București
Referent	Prof. Dr. Ing. Nicoleta Badea	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București
Referent	Conf. Dr. Farm. Verginica Schroder	de la	Universitatea Ovidius Constanța
Referent	CS I Habil. Dr. Nicoleta Radu	de la	ICECHIM București

MULȚUMIRI

Prezenta lucrare a pornit de la o idee ce privește nivelul de vindecare locală necesară în orice specialitate chirurgicală. Pornind de la această idee și împreună cu doamna Prof. Habil. Dr. Ing. Ileana Rău, a luat naștere și s-a dezvoltat prezenta teză de doctorat.

Doresc să îi mulțumesc în mod special pentru întreg ajutorul oferit necondiționat, pentru inițierea și susținerea proiectului de față, dar și pentru atenta îndrumare, susținere și încurajare pentru a duce la bun sfârșit acest proiect.

Doresc să le mulțumesc pentru implicarea în acest proiect și doamnelor Prof. Univ. Dr. Violeta – Mihaela Ghica, Conf. Dr. Ing. Roxana Zgârian, Conf. Dr. Ing. Grațierea Tihan, care mi-au fost alături de fiecare dată când am avut nevoie.

Studiul de față nu s-ar fi putut realiza fără ajutorul oferit de către doamna Dr. Chim. Mădălina Georgiana Albu-Kaya, Prof. Univ. Dr. Cristina-Elena Dinu-Pîrvu, Prof. Univ. Dr. Lăcrămioara Popa, Dr. Ing. Nicoleta Radu, Dr. Alina Lupuliasa, Dr. Ing. Mirela Bostan cărora doresc să le mulțumesc în mod deosebit.

Mai doresc să mulțumesc pentru ajutorul primit de-a lungul stagiului doctoral colegelor mele Dr. Ing. Carla Pădurețu și Dr. Chim. Adina Mirela Anton.

Familiei mele doresc să îi mulțumesc în mod deosebit pentru înțelegerea, susținerea și suportul pe care mi l-au oferit pe tot parcursul formării mele profesionale.

CUVINTE CHEIE

Colagen; Piroxicam; Ciprofloxacina; Biomateriale funcționale; Degradare enzimatică; Cinetica de eliberare a medicamentului; Activitate antimicrobiană; Citotoxicitate

INTRODUCERE

Cercetările efectuate în cadrul studiului doctoral s-au axat pe sinteza de noi materiale pe bază de colagen, materiale în care s-a înglobat un medicament. Medicamentele avute în vedere au fost piroxicam – un antiinflamator nesteroidian din clasa oxicamilor și ciprofloxacina – un antibiotic din clasa flurochinolonelor. Aceste materiale au fost de natură spongioasă și reprezintă o importantă sursă de materiale biocompatibile cu organismul uman, ajutând totodată și la refacerea și vindecarea țesutului traumatizat, având beneficiul de a fi absorbite, și de a elibera substanțele medicamentoase la nivel local.

În urma studiului de literatură s-a constatat că utilizarea unor astfel de materiale reprezintă o metodă adjuvantă în tratamentele chirurgicale, întrucât materialele spongioase pot înmagazina medicamente și ajută la regenerarea tisulară la nivel local prin intermediul colagenului.

Lucrarea este structurată în două părți și alcătuită din opt capitole. Prima parte cuprinde 3 capitole și sunt dedicate studiului documentar, iar cea de – a doua parte cuprinde 5 capitole ce prezintă contribuțiile originale.

În **capitolul 1** sunt prezentate diverse specialități chirurgicale în care se pot aplica bureți ce conțin antiinflamator și antibiotic cu rol în regenerarea și accelerarea vindecării locale. Mai sunt expuse diverse materiale organice și anorganice ce pot fi folosite ca biomateriale în domeniul medical, inclusiv prezentarea anumitor substanțe medicamentoase aplicate sistemic sau local.

Capitolul 2 constă în aprofundarea elementelor, proprietăților, biomimeticii și caracteristicilor materialelor de colagen, precum și în evidențierea aplicabilității acestora în domeniul medico – chirurgical.

Capitolul 3 descrie principiile și metodele cinetice de analiză matematică a eliberării substanțelor medicamentoase, precum și câteva exemple orientative.

Capitolul 4 descrie reactivii, aparatul și metodele utilizate pentru obținerea și caracterizarea bureților pe bază de colagen cu substanțe medicamentoase.

În **capitolul 5** sunt prezentate analizele care au fost realizate pentru bureții de colagen cu piroxicam, respectiv măsurători optice, experimente de degradare enzimatică, de absorbție de apă și de eliberare a medicamentului *in vitro*, cu aplicații în domeniul veterinar.

Capitolul 6 prezintă analizele care au fost realizate pentru bureții de colagen cu piroxicam, respectiv măsurători optice, măsurători spectrale, experimente de degradare enzimatică, de absorbție de apă și de eliberare a *in vitro* medicamentului, cu aplicații în domeniul medical.

Capitolul 7 descrie analizele care au fost realizate pentru bureții de colagen cu ciprofloxacina, respectiv măsurători optice, măsurători spectrale, efecte biologice asupra unor microorganisme patogene, studiul citotoxic pe celule normale cu testare *in vitro*, experimente de degradare enzimatică, de absorbție de apă și de eliberarea *in vitro* a medicamentului, cu aplicații în domeniul medical.

Capitolul 8 descrie teste preliminare prin experimente de degradare enzimatică și de absorbție de apă pentru bureți de colagen cu antibiotic și antiinflamator cu potențiale aplicații în diverse specialități chirurgicale, precum chirurgia orală sau chirurgia de cap și gât sau alte specialități chirurgicale.

Teza se încheie cu prezentarea concluziilor generale, a contribuțiilor originale, a perspectivelor ulterioare de dezvoltare, a listei de lucrări publicate și a conferințelor, precum și a referințelor bibliografice.

Teza cuprinde 23 figuri, 13 tabele și 166 referințe bibliografice.

Rezultatele acestei teze au fost valorificate prin 3 publicații din care 1 articol în Buletinul UPB și 2 articole în jurnale cotate ISI. De asemenea, rezultatele au fost prezentate la 1 conferință internațională.

În acest rezumat atât paginația din cuprins, cât și numerotarea capitolelor, a subcapitolelor, a figurilor, a tabelor și a referințelor bibliografice sunt păstrate ca în teză.

CUPRINS

MULȚUMIRI	3
CUPRINS	5
INTRODUCERE	9
LISTA DE ABREVIERI	11
CAPITOLUL 1 MATERIALE UTILIZATE ÎN CHIRURGIA ORALĂ ȘI MAXILO – FACIALĂ	15
1.1. CLASIFICAREA SPECIALITĂȚILOR CU APLICABILITATE ÎN SFERA CHIRURGIEI DE CAP ȘI GÂT	15
1.1.1. CHIRURGIA DENTO – ALVEOLARĂ	15
1.1.2. CHIRURGIA ORO – MAXILO – FACIALĂ	15
1.1.3. ORL ȘI CHIRURGIE CERVICO – FACIALĂ	16
1.1.4. OFTALMOLOGIE	17
1.1.5. CHIRURGIE PLASTICĂ ȘI MICROCHIRURGIE RECONSTRUCTIVĂ	17
1.2. MATERIALE ORGANICE CU APLICAȚII ÎN CHIRURGIA DE CAP ȘI GÂT	18
1.2.1. POLIMERI	18
1.2.2. BIOFILME	18
1.2.3. CHITOSAN	19
1.2.4. COLAGEN	19
1.3. MATERIALE ANORGANICE CU APLICAȚII ÎN CHIRURGIA DE CAP ȘI GÂT	20
1.3.1. RANELAT DE STRONȚIU	20
1.3.2. CERAMICI	20
1.3.3. ZIRCONIU	21
1.3.4. TITAN	21
1.4. SUBSTANȚE MEDICAMENTOASE UTILIZATE ÎN CHIRURGIA DE CAP ȘI GÂT	22
1.4.1. ANTIBIOTICE	22
1.4.2. ANTIINFLAMATOARE ȘI ANALGEZICE	22
1.4.3. SOLUȚII ANTISEPTICE	24
CAPITOLUL 2 – COLAGENUL	25
2.1. INTRODUCERE	25
2.2. PROPRIETĂȚILE COLAGENULUI	26
2.3. MATERIALE PE BAZĂ DE COLAGEN	29
2.4. APLICABILITATEA COLAGENULUI ÎN DOMENIUL MEDICAL	30
2.5. BIOMIMETICA ȚESUTURILOR DE COLAGEN	31
2.6. APLICABILITATEA COLAGENULUI ÎN MEDICINA VETERINARĂ	33
CAPITOLUL 3 – CINETICA DE ELIBERARE CONTROLATĂ A MEDICAMENTELOR ADMINISTRATE LA NIVEL LOCAL	35
3.1. INTRODUCERE	35
3.2. MODELE CINETICE DE ANALIZĂ MATEMATICĂ	38

3.2.1. MODELUL CINETIC DE ORDINUL ZERO	38
3.2.2. MODELUL CINETIC HIGUCHI	39
3.2.3. CINETICA DE ORDINUL I	40
3.2.4. MODELUL WEIBULL	40
3.2.5. MODELUL HIXSON – CROWELL	40
3.2.6. MODELUL BAKER – LONSDALE	41
3.2.7. MODELUL HOPFENBERG	41
3.2.8. MODELUL KORSMEYER – PEPPAS SAU MODELUL PUTERII	41
3.3. SISTEME DE ELIBERARE CONTROLATĂ – EXEMPLE	42
OBIECTIVELE CERCETĂRII	47
CAPITOLUL 4 – MATERIALE ȘI METODE	49
4.1. MATERIALE	49
4.2.1. MEDICAMENTE	49
4.1.1.1. PIROXICAM	49
4.1.1.2. CIPROFLOXACINĂ	52
4.2.2. COLAGEN	56
4.2.3. REACTIVI	56
1.1.3.1. PBS (SOLUȚIE TAMPON FOSFAT)	56
1.1.3.2. COLAGENAZĂ	56
1.1.3.3. GLUTARADEHIDĂ	57
4.2. METODE	58
4.2.1. PREPARARE DE MATERIALE SPONGIOASE PE BAZĂ DE COLAGEN	58
4.2.2. METODE DE CARACTERIZARE	59
4.2.2.1. ABSORBȚIA DE APĂ	59
4.2.2.2. DEGRADAREA ENZIMATICĂ	60
4.2.2.3. CINETICA DE ELIBERARE A MEDICAMENTELOR	60
4.2.2.4. ANALIZA SPECTRALĂ ÎN INFRAROȘU	61
4.2.2.5. MICROSCOPIE OPTICĂ	61
4.2.2.6. TESTE <i>IN VITRO</i> PE MICROORGANISME PATOGENE	61
4.2.2.7. TESTE <i>IN VITRO</i> PRIVIND EFECTUL CITOTOXIC AL MATERIALELOR IMPREGNATE CU CIPROFLOXACINĂ ASUPRA CELULELOR NORMALE	62
CAPITOLUL 5 – MATERIALE SPONGIOASE PE BAZĂ DE COLAGEN PENTRU APLICAȚII VETERINARE	65
5.1. MĂSURĂTORI OPTICE	65
5.2. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE A APEI	66
5.3. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ	66
5.4. ELIBERARE <i>IN VITRO</i> A MEDICAMENTULUI	67
5.5. CONCLUZII PARȚIALE	69
CAPITOLUL 6 – MATERIALE SPONGIOASE PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI PIROXICAM PENTRU APLICAȚII MEDICALE	71
6.1. CARACTERIZAREA MATERIALELOR SPONGIOASE	71

6.1.1. CARACTERIZARE MICROSCOPICĂ	71
6.1.2. CARACTERIZARE SPECTRALĂ	72
6.1. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE A APEI	74
6.2. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ	74
6.3. CINETICA DE ELIBERARE <i>IN VITRO</i> A MEDICAMENTULUI	75
6.4. CONCLUZII PARȚIALE	77
CAPITOLUL 7 – MATERIALE PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI CIPROFLOXACINĂ CU POTENȚIALE APLICAȚII CHIRURGICALE ORALE	79
7.1. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE A APEI	79
7.2. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ	81
7.3. ELIBERAREA <i>IN VITRO</i> A CIPROFLOXACINEI	82
7.4. EFECTELE BIOLOGICE <i>IN VITRO</i> ALE BUREȚELOR DE COLAGEN ȘI CIPROFLOXACINĂ ASUPRA UNOR MICROORGANISME PATOGENE	86
7.5. STUDIUL CITOTOXIC AL MATERIALELOR PE BAZĂ DE COLAGEN PE CELULE NORMALE – TESTE <i>IN VITRO</i>	90
7.6. CONCLUZII PARȚIALE	93
CAPITOLUL 8 – MATERIALE PE BAZĂ DE COLAGEN, CIPROFLOXACINĂ ȘI PIROXICAM CU POTENȚIALE APLICAȚII CHIRURGICALE ORALE – TESTE PRELIMINARE	95
8.1. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE DE APĂ	95
8.2. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ	97
8.3. CONCLUZII PARȚIALE	99
CONCLUZII	101
C1. CONCLUZII GENERALE	101
C2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	105
C3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ	106
BIBLIOGRAFIE	109

CAPITOLUL 1. MATERIALE UTILIZATE ÎN CHIRURGIA ORALĂ ȘI MAXILO – FACIALĂ

1.1.2. CHIRURGIA ORO – MAXILO – FACIALĂ

Chirurgia oro – maxilo – facială (OMF) reprezintă o ramură chirurgicală a medicinei ce se ocupă cu tratamentul de natură chirurgicală a părților moi cervico – faciale, a oaselor viscerocraniului, a glandelor salivare, a articulației temporo – mandibulare, a malformațiilor craniofaciale, cu plastia reconstructivă în chirurgia de cap și gât și, de asemenea, cu tratamentul chirurgical al afecțiunilor dento – parodontale. Din acest motiv medicii specialiști în Chirurgia Oro-Maxilo-Facială dețin dublă licență, fiind absolvenți atât ai Facultății de Medicină Generală cât și ai Facultății de Medicină Dentară [1-3]. Chirurgia orală reprezintă doar o mică parte din Chirurgia Oro – Maxilo – Facială, aceasta limitându-se doar la intervențiile de la nivelul cavității bucale/orale.

În specialitățile chirurgicale de cap și gât, de chirurgie plastică, precum și în alte specialități chirurgicale sunt utilizate diverse materiale organice și anorganice ce prezintă biocompatibilitate cu organismul uman. Pe lângă aceste materiale mai pot fi

utilizate și diverse substanțe medicamentoase ce pot fi aplicate la nivel local sau sistemic, precum antibioticele, antisepticele sau antiinflamatoarele. Toate aceste elemente îmbinate au ca scop final de îmbunătățire a calității vieții în urma intervențiilor chirurgicale și reprezintă o metodă adjuvantă în procesul de vindecare și refacere a organismului la nivel local.

CAPITOLUL 2. COLAGENUL

2.2. PROPRIETĂȚILE COLAGENULUI

Colagenul reprezintă una dintre cele mai abundente proteine fibroase ce îndeplinește foarte multe funcții mecanice, în mod special la mamifere, sub toate formele sale ce îl definesc. El se prezintă ca un polimer ce se poate caracteriza printr-o hidrofilie accentuată, prin caracter ionic variabil, printr-o funcționalitate diversificată, putând fi implicat în mai multe sisteme ce interacționează cu diverse componente macromoleculare sau micromoleculare [36, 37, 43-47].

2.3. MATERIALE PE BAZĂ DE COLAGEN

Materialele pe bază de colagen se pot realiza dintr-o mare varietate de structuri de natură moleculară, în microstructuri sau nanostructuri ce se pot găsi sub formă de hidrogel (pentru o cedare controlată a diverselor componente ce pot fi înglobate), membrane de colagen (pot fi folosite în procesul terapeutic de dializă sau pentru depozitarea substanțelor medicamentoase), bureți (ce au un rol foarte important în diverse acte terapeutice cum ar fi pansamentul pentru arsuri sau ulcere varicoase, având rol hemostatic sau de substituent de țesuturi), fibre de colagen (pot fi utilizate pentru întărirea membranelor și a bureților etc.) [37].

CAPITOLUL 3. CINETICA DE ELIBERARE CONTROLATĂ A MEDICAMENTELOR ADMINISTRATE LA NIVEL LOCAL

3.1. INTRODUCERE

Indiferent de calea de administrare, factorul cheie pentru succesul și fiabilitatea oricărei formulări depinde de biodisponibilitatea medicamentului, definind astfel cantitatea și viteza cu care acesta este cedat din forma farmaceutică, devenind astfel disponibil pentru absorbție și consecutiv pentru exercitarea efectului farmacodinamic [74].

Printre sistemele administrate topic, se regăsesc forme farmaceutice lichide, matrici spongioase (bureți de colagen), membrane, fibre, sisteme multiparticulate (micro- și nanoparticulate), intens studiate în ultimii ani și în continuă dezvoltare. Scopul principal al formulărilor topice este de a îmbunătăți activitatea terapeutică a substanței și de a depăși problemele ce țin de solubilitate, starea de agregare, biodisponibilitate, biodistribuție, lipsa de selectivitate și chiar pentru a reduce efectele secundare negative ale medicamentului [81, 83, 84].

3.2. MODELE CINETICE DE ANALIZĂ MATEMATICĂ

Pentru modelarea cineticii de cedare a medicamentului din formulări farmaceutice de tip hidrogeluri sau bureți și stabilirea mecanismului de transport al acestuia se utilizează diferite modele matematice.

Multe modele matematice au tendința de a descrie o dinamică semnificativ controlată a eliberării cinetice și a fenomenului implicat, economisindu-se astfel timp și bani. Aceste sisteme matematice permit optimizarea eliberării substanței medicamentoase și estimează efectul parametrilor propuși în ceea ce privește eliberarea cinetică [80, 85].

OBIECTIVELE CERCETĂRII

Obiectivul principal al tezei a fost obținerea de materiale noi pe bază de colagen funcționalizate cu un antiinflamator nesteroidian – piroxicam și/sau un antibiotic din clasa fluorochinolonei – ciprofloxacina. Acest obiectiv principal a fost realizat prin îndeplinirea următoarelor obiective specifice:

- Prepararea de materiale spongioase pe bază de colagen pentru aplicații veterinare și caracterizarea acestora prin:
 - Măsurători optice
 - Experimente de absorbție a apei
 - Experimente de degradare enzimatică
 - Cinetica de eliberare *in vitro* a medicamentului
- Prepararea de materiale spongioase pe bază de colagen și piroxicam pentru aplicații medicale și caracterizarea acestora prin:
 - Microscopie optică
 - Măsurători spectrale
 - Experimente de absorbție a apei
 - Experimente de degradare enzimatică
 - Cinetica de eliberare *in vitro* a medicamentului
- Prepararea de materiale pe bază de colagen și ciprofloxacina cu potențiale aplicații chirurgicale orale și caracterizarea acestora prin:
 - Experimente de absorbție a apei
 - Experimente de degradare enzimatică
 - Cinetica de eliberare *in vitro* a ciprofloxacinei
 - Efectele biologice *in vitro* ale bureților de colagen și ciprofloxacina asupra unor microorganisme patogene
 - Studiul citotoxic al materialelor pe bază de colagen pe celule normale – teste *in vitro*
- Prepararea de materiale pe bază de colagen, ciprofloxacina și piroxicam cu potențiale aplicații chirurgicale orale – teste preliminare și caracterizarea acestora prin:
 - Experimente de absorbție de apă
 - Experimente de degradare enzimatică.

CAPITOLUL 4. MATERIALE ȘI METODE

4.1. MATERIALE

4.1.1. MEDICAMENTE

Pentru studiile efectuate s-au folosit ca medicament un antiinflamator nesteroidian – Piroxicam și un antibiotic din clasa fluorchinolonelor – Ciprofloxacina.

4.1.2. COLAGEN

Pentru prezentul studiu s-a utilizat un gel de colagen fibrilar de tipul I obținut din piele de bovine produs la Institutul Național de Cercetare pentru Pielărie și Încălțăminte (INCDTP). Gelul utilizat a avut un conținut de 2,82% colagen.

4.2. METODE

4.2.1. PREPARE DE MATERIALE SPONGIOASE PE BAZĂ DE COLAGEN

Concentrația gelului de colagen a fost ajustată de la o concentrație de 2,82% și un pH acid la o concentrație de 1% și un pH de 7,4 folosind hidroxid de sodiu 1 M. Soluția de medicament (piroxicam, ciprofloxacina, sau amestecuri de piroxicam și ciprofloxacina) a fost adăugată în gelul de colagen astfel încât să se obțină anumite concentrații de medicament față de colagenul uscat. Gelul obținut a fost reticulat cu o soluție de glutaraldehidă astfel încât concentrația de glutaraldehidă raportată la colagenul uscat să fie de 0,5%.

În tabelele 4.1, 4.2 și 4.3 sunt prezentate sistemele studiate pe bază de colagen, piroxicam și/sau ciprofloxacina.

Tabelul 4.1 Sisteme studiate pe baza de colagen și piroxicam

Cod proba	Concentrație, % în raport cu colagen uscat
P1	1
P2	1,5
P3	2
P4	50
P5	80

Tabelul 4.2 Sisteme studiate pe baza de colagen și ciprofloxacina

Cod proba	Concentrație, g _{medicament} /g _{colagen}
C1	0,5
C2	0,75
C3	1

Tabelul 4.3 Sisteme studiate pe baza de colagen, piroxicam și ciprofloxacina

Cod proba	Concentrații, g _{medicament} /g _{colagen}
PC 1	0,15 piroxicam; 0,05 ciprofloxacina
PC 2	1,5 piroxicam; 0,5 ciprofloxacina

Gelurile reticulate au fost păstrate timp de 24 de ore la o temperatură de 4°C și apoi liofilizate folosindu-se Liofilizatorul (Delta 2-24 LSC, Martin Christ, Germania). Gelurile au fost transferate în vase Petri (figura 4.4) unde au fost inițial înghețate la - 40°C timp de 12 ore. În următoarele 8 ore la o temperatură de - 40°C și o presiune de 0,1 mbar a avut loc liofilizarea propriu-zisă. Apoi temperatura a fost crescută în trepte astfel, până la 10°C pe o perioadă de 8 ore, apoi la 20°C pe o perioadă de alte 8 ore și la 30°C pe o perioadă de încă 8 ore presiunea menținându-se la 0,1 mbar. Liofilizarea finală a durat 4 ore: 1 oră la 30°C și 0,001 mbar și încă 3 ore până când temperatura a ajuns la 35°C. După încă 48 de ore de uscare-înghețare au fost obținuți bureții pe bază de collagen.



Figura 4.4 Geluri pe baza de collagen transferate în vase Petri înainte de liofilizare

CAPITOLUL 5. BUREȚI PE BAZA DE COLAGEN PENTRU APLICAȚII VETERINARE

În ultimele decenii, cercetarea parodontală și peri-implantare pe animale s-a concentrat pe diferite tipuri de tratamente. Bolile orale sunt foarte frecvente la animalele mici și mari, cum ar fi pisicile, câinii, cabalinele, bovinele și alte rumegătoare și ar trebui să primească mult mai multă atenție în practica veterinară, întrucât există boli specifice cavității bucale care prezintă un risc mare pentru sănătatea acestor animale. Acest studiu propune noi materiale pe bază de collagen pentru tratamentul diferitelor boli ale animalelor. Rezultatele privind caracterizarea acestor noi materiale pe bază de collagen sunt prezentate și discutate în vederea posibilelor lor aplicații orale pe mamifere, cum ar fi felinele și alte animale [67, 68, 72, 73, 157].

5.2. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE A APEI

Rezultatele absorbției de apă a bureților de collagen fără sau cu concentrație diferită de piroxicam sunt prezentate în figura 5.2. Așa cum era de așteptat, în timp, conținutul de apă din bureți crește, iar prezența medicamentului are drept consecință scăderea conținutului de apă absorbită. De exemplu, după 24h buretele P4 are o absorbție de 34% comparativ cu buretele de collagen C (57%) și buretele P5 (22%). Cu toate acestea, după 24 de ore, proba care conținea cel mai mare conținut de medicament s-a dezintegrat, în timp ce buretele P4 a continuat să absoarbă apa până la 168h și apoi să se dezintegreze [157].

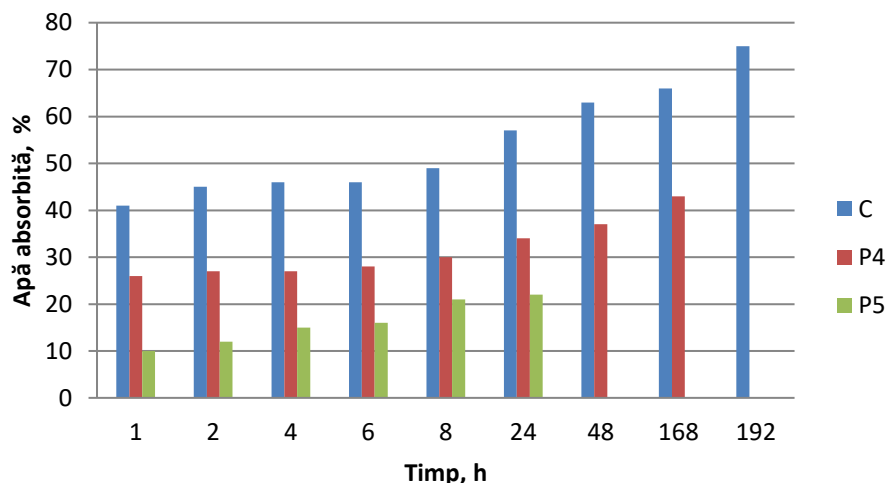


Figura 5.2. Absorbția apei în bureții de collagen: C – burete de collagen, P4 – burete de collagen cu 50% piroxicam, P5 – burete de collagen cu cel mai mare conținut de piroxicam (80%)

5.4. ELIBERAREA *IN VITRO* A MEDICAMENTULUI

Datele experimentale cinetice au fost ilustrate grafic ca eliberare cumulativă a medicamentului (%) funcție de timp (Fig. 5.3).

Din Figura 5.3 se observă un efect rapid de eliberare a medicamentului în prima oră, înregistrând o valoare de aproximativ 31% pentru buretele P4 și, respectiv, 41% pentru buretele P5, urmată de o eliberare treptată a piroxicamului în următoarele 10 ore de experiment până la 69,96% (formularea P4) și 79,83% (formularea P5). Se poate constata că un conținut mai mare de piroxicam a dus la o creștere a procentului de eliberare a medicamentului de aproximativ 1,14 ori [157].

Comportamentul de eliberare a medicamentului care cuprinde două faze este benefic pentru atenuarea și controlul inflamației locale și durerii specifice bolilor orale cu etiologie diferită [23, 157].

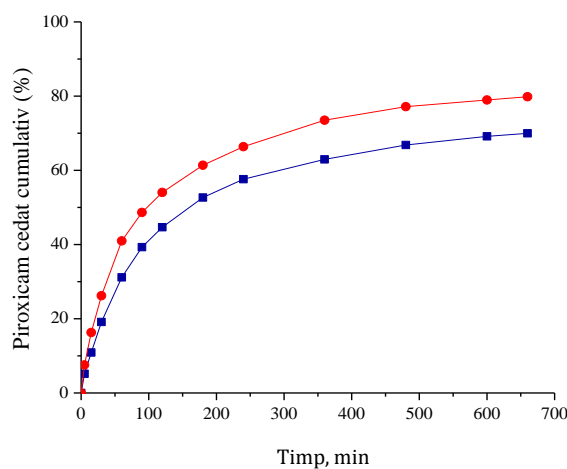


Figura 5.3. Profilele cumulative de eliberare a piroxicamului din bureți de collagen funcție de timp; ■ – burete de collagen cu 50% piroxicam și ● – burete de collagen cu 80% piroxicam

5.4. CONCLUZII PARȚIALE

Prezentul studiu a condus la următoarele concluzii:

- Soluția de colagen cu sau fără piroxicam a fost reticulată chimic cu glutaraldehida și preparată sub formă de bureți prin procesul de liofilizare;
- Imaginile microscopiei optice au prezentat o structură fibrilară cu pori interconectați în toți bureții obținuți dar cu agregări de piroxicam în probele P4 și P5;
- Buretele de colagen fără conținut de piroxicam a absorbit o cantitate importantă de apă, iar atunci când medicamentul a fost adăugat în compoziția buretelui de colagen, cantitatea de apă absorbită a scăzut. Se poate concluziona că absorbția de apă pentru bureții studiați scade odată cu creșterea dozei de medicament;
- Un conținut ridicat de medicament conduce la dezintegrarea buretelui. Nu se poate afirma că probele sunt total degradate în sensul pierderii de masă, acestea se dezintegrează și practic fibrele de colagen cu piroxicam sunt prezente în soluție (PBS cu collagenază);
- Studiile cinetice au indicat o eliberare bifazică a medicamentului, favorabilă pentru asigurarea unei concentrații adecvate de piroxicam la locul de aplicare pentru a gestiona inflamația și durerea consecutivă asociată cu diferite boli orale;
- Aceste rezultate preliminare sugerează că astfel de bureți cu doze mari de piroxicam ar putea fi utilizați pentru diferite tratamente la animale mari, cum ar fi cabaline și bovine [157].

CAPITOLUL 6. BUREȚI PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI PIROXICAM PENTRU APLICAȚII MEDICALE

Pornind de la ideea beneficiului interferenței dintre materialele pe bază de colagen și proprietățile benefice ale medicamentelor, acest capitol se axează pe sinteza și caracterizarea unor noi materiale colagen-piroxicam. Aceste noi materiale pe bază de colagen prezintă o bună absorbție a apei, iar eliberarea piroxicamului sugerează un profil bifazic de eliberare a medicamentului, în timp ce valorile obținute pentru exponentul de eliberare au relevat un mecanism complex de eliberare, ce cuprinde gonflarea, difuzia, eroziunea. Pentru acest studiu s-au preparat așa cum este descris în capitolul 4 bureți de colagen cu piroxicam. Concentrațiile de piroxicam au fost de 1%, 1,5% și 2% față de colagen [158].

6.1. CARACTERIZAREA MATERIALELOR SPONGIOASE

6.1.2. CARACTERIZARE SPECTRALĂ

Prezența piroxicamului în bureții de colagen a fost certificată și de spectrele IR. Tabelul 6.1 enumeră atribuirile pentru principalele picuri de absorbție obținute pentru spectrele în infraroșu înregistrate. Așa cum era de așteptat, spectrele IR au fost similare, deoarece caracteristicile picurilor pentru vibrațiile principale sunt aceleași pentru colagen și pentru piroxicam. Cu toate acestea, au fost prezente unele modificări ale numărului de undă [158].

Tabel 6.1. Atribuiri pentru picurile observate la spectrele în infraroșu înregistrate pentru bureții de colagen

Atribuire	Număr de undă (1/cm)			
	Burete de Colagen	Burete de Colagen cu 0,5 % piroxicam	Burete de Colagen cu 1 % piroxicam	Burete de Colagen cu 1,5 % piroxicam
Vibrația de întindere N-H (ν_{NH}) din amida A [159, 160] ; Legături de hidrogen dintre grupările N-H și grupările carbonil din lanțul peptidic [159]	3540	3569	3552	3550
Vibrația de întindere asimetrică a CH_2 ($\nu_{\text{as CH}_2}$) corespunzătoare benzii amida B [159, 160]	3017	3008	3016	3007
Vibrația de întindere a legăturii C-O (ν_{CO}) [159] ; Amida I C=O [160, 161]	1681	1681	1680	1680
Legătura de hidrogen dintre legăturile N-H (ν_{NH}) și C-O (ν_{CO}) [159]	1607	1606	1608	1610
Structura elicoidală a colagenului [159] Vibrația de întindere a grupării C-N [159] Vibrația de întindere a legăturii duble C=N din piroxicam [161] Vibrația de deformare a CH_2 (δ_{CH_2}) [162]	1494	1499	1499	1496
Vibrație de deformare CH_3 (δ_{CH_3}) [162] Vibrație de deformare CH_2 (δ_{CH_2}) [160]	1443	1441	1443	1443
Vibrația de deformare, în afara planului, de balansare a grupării CH_2 [159]	1376	1379	1387	1380
Vibrația de deformare a legăturii NH din amida III (δ_{NH}) [162]	1274	1274	1273	1275
Legătura de hidrogen; vibrația de deformare a legăturii N-H [159, 160]	1241	1237	1240	1240
Vibrația de deformare a legăturii NH din amida III (δ_{NH}) [162] Vibrația de întindere asimetrică a legăturii duble S=O [161]	1191	1192	1189	1190
Vibrația grupării esterice [159]	1113	1113	1115	1113
Vibrațiile ($\nu_{\text{C-O}}$), ($\nu_{\text{C-O-C}}$) din grupările carbohidrat din colagen [162]	1062	1063	1062	1063
Vibrațiile de întindere ale amprentei [160]	899	899	900	900

6.2. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE A APEI

Figura 6.2 prezintă rezultatele obținute pentru experimentele de absorbție a apei. Matricile de collagen ar trebui să prezinte abilități adecvate de absorbție a apei, permițând fluidelor biologice să pătrundă în structura spongioasă și, consecutiv, difuzia medicamentului în rețeaua polimerică gonflată. Datele obținute sugerează că masa de piroxicam nu afectează capacitatea de absorbție a apei. În același timp, așa cum era de așteptat, absorbția apei crește în timp, fiind de 100% după 24 de ore [158].

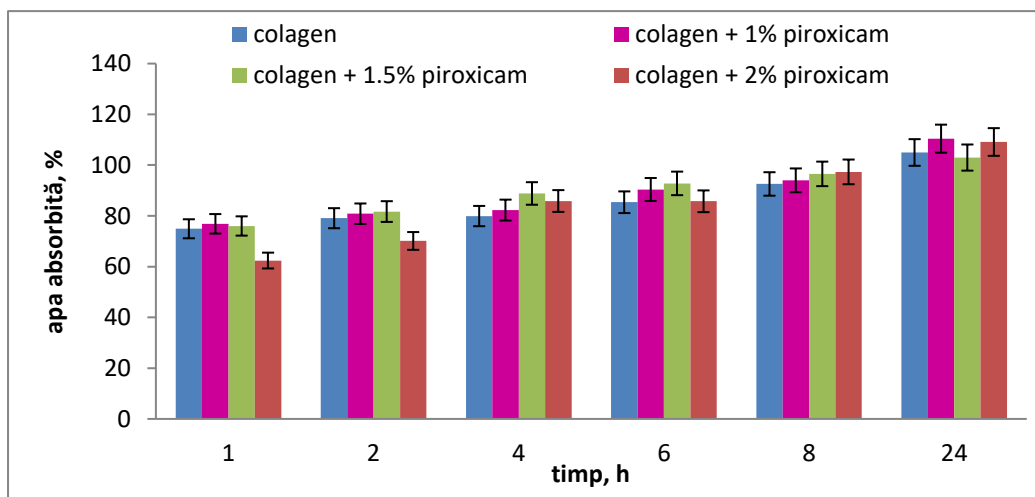


Figura 6.2. Absorbția apei în bureții ce conțin piroxicam

6.3. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ

Experimentele de degradare enzimatică a collagenului, așa cum sunt prezentate în Figura 6.3, au arătat că adăugarea piroxicamului are drept consecință scăderea degradării probei. Cu toate acestea, după mai mult de 8 ore în soluție de collagenază, probele se dezintegrează, chiar dacă nu sunt complet degradate. Degradarea bureților este relativ lentă la început (5 – 10% în primele două ore). După 8 ore și înainte de dezintegrare, aproximativ 30% din probe sunt degradate, sugerând că astfel de materiale ar putea fi utile în chirurgia oro-maxilo-facială [158].

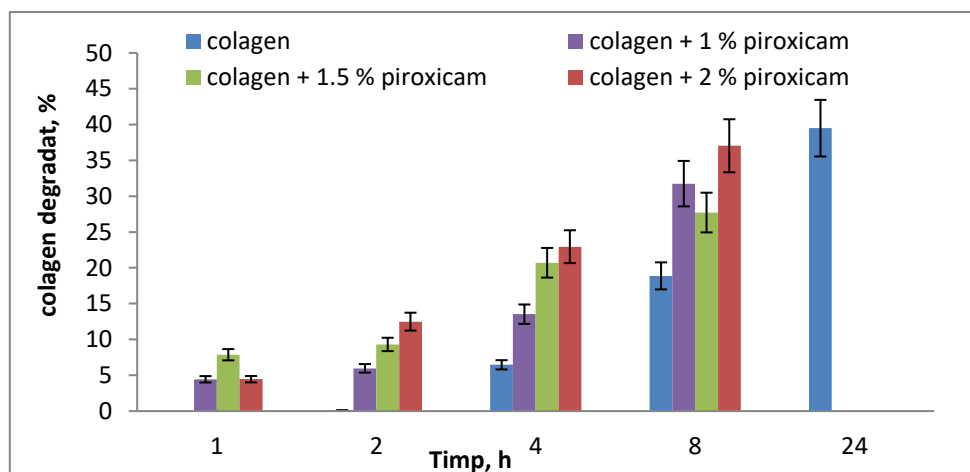


Figura 6.3. Degradarea enzimatică a bureților piroxicam

Toate analizele indică faptul că bureții de collagen obținuți prezintă proprietăți adecvate ca suporturi de eliberare a medicamentelor. Din acest motiv bureții de collagen-piroxicam au fost analizați în continuare din punct de vedere cinetic [158].

6.4. CINETICA DE ELIBERARE *IN VITRO* A MEDICAMENTULUI

Din tabelul 6.2 se poate observa că modelul legii puterii descrie bine profilul de eliberare a medicamentului (coeficient de corelație mai mare de 0,98, fiind mai mare decât cel obținut în cazul modelelor Higuchi și de ordin zero) [158].

Eliberarea piroxicamului din formulările proiectate a arătat un mecanism cinetic anormal de transport al medicamentului, valorile obținute pentru exponentul de eliberare fiind mai mici de 0,5 [158].

Figura 6.4 prezintă un profil tipic bifazic de eliberare a medicamentului, cu un efect important de eliberare rapidă a piroxicamului în primele 30 de minute pentru matricile de collagen cu 1%, 1,5% și 2% piroxicam, asigurând astfel o diminuare rapidă a inflamației. Urmează apoi o eliberare prelungită în următoarele ore de experimente. Valorile obținute pentru exponentul de eliberare (mai mici de 0,5) au evidențiat un mecanism complex de eliberare care include gonflarea, difuzia și eroziunea [52, 115, 158].

Tabel 6.2. Parametrii cinetici, coeficienții de corelație și procentul de medicament maxim eliberat.

Burete de Collagen (% de piroxicam)	Constanta de viteză (1/min ⁿ)	Exponentul de eliberare	Coeficientul de corelație			Medicament eliberat (%)
			Modelul legii puterii	Modelul Higuchi	Modelul Ordin Zero	
1	0,11	0,39	0,9811	0,9716	0,8761	87,44
1,5	0,12	0,38	0,9860	0,9755	0,8822	96,24
2	0,10	0,41	0,9892	0,9831	0,9009	91,33

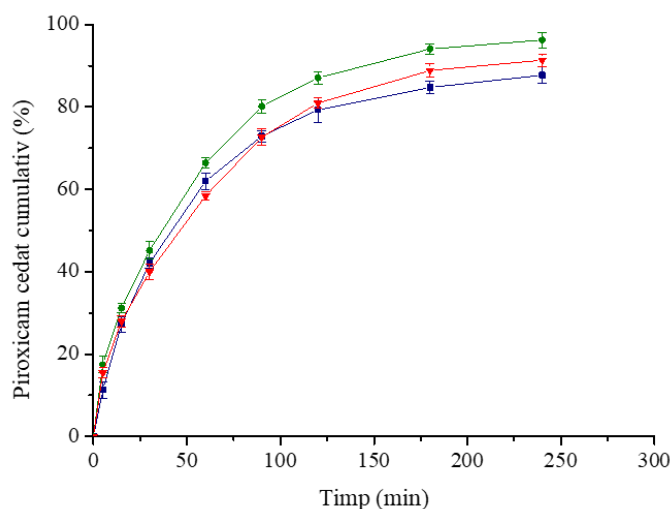


Figura 6.4. Profiluri de eliberare cumulativă a piroxicamului din matricile de collagen funcție de timp: ■ – 1% piroxicam, ● - 1,5% piroxicam, ▼ – 2% piroxicam

Coroborând rezultatele eliberării medicamentului cu cele ale degradării colagenazei, se poate afirma că, înainte de dezintegrarea buretelui, medicamentul este eliberat aproape complet. Mai mult, în funcție de locul în care vor fi utilizate aceste materiale, faptul că absorb apa sugerează că pot absorbi lichide orale sau sanguinolente, reducând astfel inflamația și riscul de hematom [158].

6.5. CONCLUZII PARȚIALE

Acest studiu prezintă noi materiale pe bază de colagen pentru aplicații biomedicale, în special în stomatologie. Aceste materiale noi, materiale spongioase pe bază de colagen, obținute prin metoda liofilizării, au fost caracterizate prin diverse tehnici precum microscopia optică, spectroscopia IR, absorbția apei, degradarea enzimatică și estimarea cineticii de eliberare "in vitro" [158].

Rezultatele obținute privind hidroliza și degradarea enzimatică au arătat rolul inhibitor al agentului de reticulare, în timp ce prezența piroxicamului determină o creștere a degradării buretelui în prezența colagenazei care conduce în final la dezintegrarea buretelui.

Profilurile cinetice determinate pentru eliberarea piroxicamului sugerează un profil bifazic de eliberare a medicamentului, în timp ce valorile obținute pentru exponentul de eliberare ($< 0,5$) au evidențiat un mecanism complex de eliberare care include gonflarea, difuzia și eroziunea.

CAPITOLUL 7. MATERIALE PE BAZA DE COLAGEN ȘI CIPROFLOXACINA CU POTENȚIALE APLICAȚII CHIRURGICALE ORALE

În acest capitol este prezentată caracterizarea unui nou material pe bază de colagen. Acest material a fost obținut într-o formă spongioasă și a fost funcționalizat cu un antibiotic, ciprofloxacina. Aplicațiile vizate ale acestui tip de materiale se referă la profilaxia postoperatorie. Testele *in vitro* (antimicrobiene, citotoxice, de eliberare de medicament) au arătat că bureții cu o concentrație de 0,75g de ciprofloxacina pe gram de colagen ar putea fi benefici pentru aplicațiile dorite [163].

7.1. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE DE APĂ

Figura 7.1. prezintă capacitatea de absorbție a apei de către materialele sintetizate. Se poate observa că în timp, cantitatea de apă absorbită crește pentru toate probele, iar absorbția de apă în bureți este dependentă de concentrația substanței medicamentoase. De exemplu la concentrație mai mică de medicament, 0,50% și 0,75%, absorbția apei este similară, sau ușor mai mică, față de cea a bureților de colagen simpli (fără substanță medicamentoasă). Pentru bureții cu cea mai mare concentrație de substanță medicamentoasă studiată absorbția de apă a bureților a fost mereu mult mai mare, acest tip de comportament fiind probabil datorat substanței medicamentoase utilizate, substanță care absoarbe mai multă apă decât colagenul [163].

Retenția crescută de fluid în structurile poroase indică faptul că o cantitate mare de fluid biologic poate fi absorbită când astfel de suporturi sunt în contact cu o plagă rezultată în urma unei intervenții chirurgicale. Acest burete poate adera ușor și favorizează formarea de noi țesuturi regenerate [163].

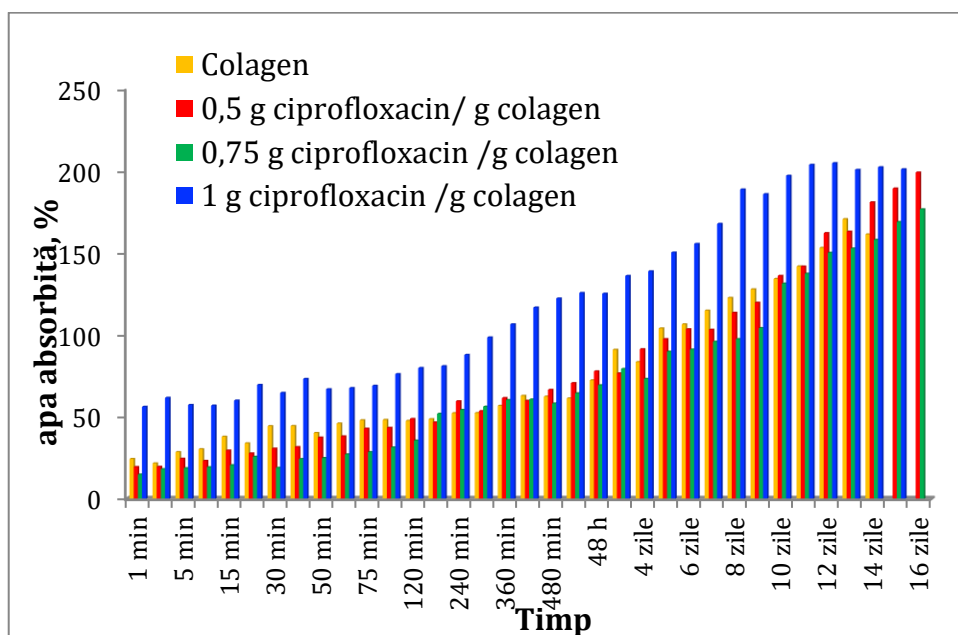


Figura 7.1 Absorbția de apă pentru probele ce conțin ciprofloxacin prin comparație cu un burete de colagen

7.2. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ

În Figura 7.2 este prezentat studiul comportamentului bureților în ceea ce privește degradarea enzimatică. Cum era de așteptat, degradarea crește în timp, iar prezența ciprofloxacinii favorizează degradarea. Se poate observa că bureții ce conțin ciprofloxacină sunt în proporție de 50% degradați după 24 de ore, comparativ cu bureții doar cu colagen (aproximativ 15% degradați). După 24 de ore bureții ce conțin ciprofloxacină se dezintegrează [163].

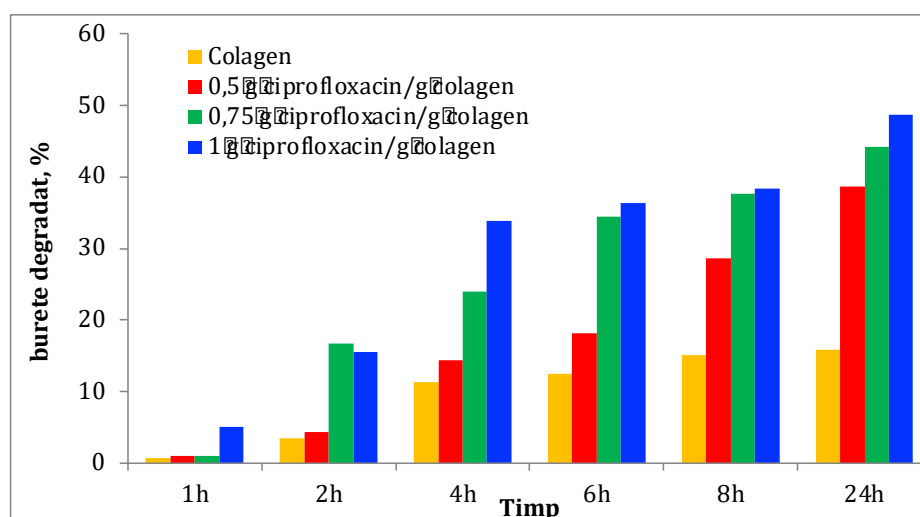


Figura 7.2. Comportamentul degradării enzimaticice a probelor studiate.

Rezultatele biodegradării *in vitro* au arătat că se obține o viteză de degradare echilibrată, orientată spre obținerea unei eliberări adecvate de medicament cu consecințe directe asupra eficienței tratamentului și îmbunătățirea mulțumirii pacienților [163].

7.3. ELIBERAREA *IN VITRO* A CIPROFLOXACINEI

Un parametru critic care trebuie luat în considerare pentru formularea și evaluarea materialului spongios pe bază de collagen cu ciprofloxacina, conceput pentru a preveni și controla infecția asociată cu chirurgia capului și gâtului, este cinetica de eliberare a medicamentului, monitorizată prin influența conținutului medicamentului asupra modelelor cinetice [163].

Fracțiunea de ciprofloxacina eliberată la fiecare moment de timp a fost calculată ca procent din medicamentul total din buretele de collagen [163].

Figura 7.3 ilustrează profiluri cinetice similare pentru toate cele trei formulări, caracterizate printr-o eliberare inițială bruscă în primele 2 ore, urmată de o eliberare progresivă și prelungită a medicamentului pentru o perioadă mai lungă de până la 24 de ore [163].

Buretele cu 0,50 g ciprofloxacina/g collagen a prezentat o eliberare rapidă (43,15%), urmat de buretele cu nivel maxim de ciprofloxacina (34,26%), în timp ce formularea cu concentrație medie de medicament duce la cel mai mic efect de eliberare (27,45%). Se poate observa că eliberarea este de 1,6 ori mai rapidă pentru buretele cu o concentrație de ciprofloxacina de 0,5g/g de collagen comparativ cu buretele ce conține 0,75g/g collagen. Efectul destul de pronunțat de eliberare bruscă s-ar putea datora absorbției mare de apă a bureților în primele 120 de minute [163].

Procentul cumulat de antibiotic eliberat după 24 de ore este de 81,63% pentru proba care conține 0,50g ciprofloxacina/ g de collagen, în timp ce suportul de collagen având un conținut mai mare de medicament a arătat 61,70%, respectiv 69,86% din eliberarea de ciprofloxacina în aceeași perioadă de timp (Tabelul 7.1). [163].

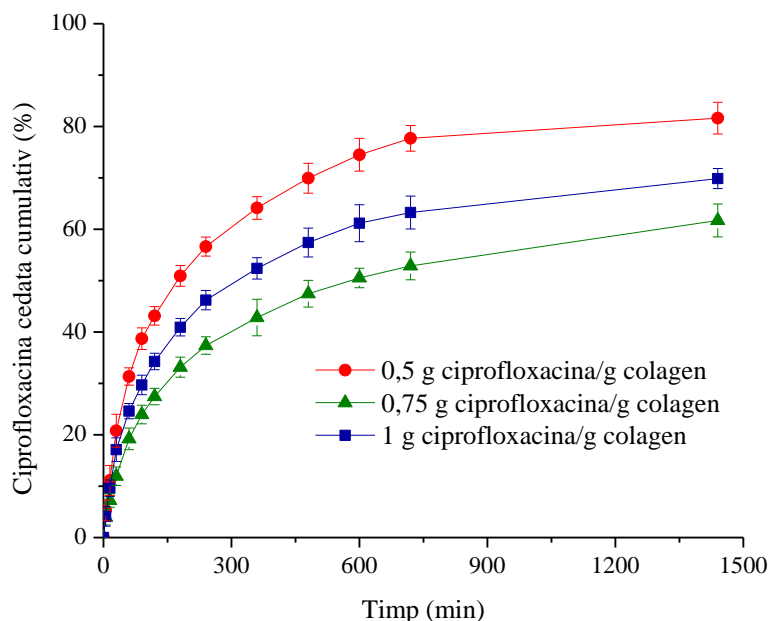


Figura 7.3 Profiluri de eliberare cumulativă funcție de timp ale ciprofloxacinei din matricele de collagen

Tabel 7.1. Coeficienții de corelație (R) pentru modelele cinetice Higuchi, de ordin zero și legea puterii; parametrii cinetici specifici modelului legii puterii și procentul cumulativ eliberat de ciprofloxacina.

Bureți Ciprofloxacina (CPX) – colagen (C) g CPX/g C	Coeficient de corelație, R			Constanta de viteză, k (1/min ⁿ)	Exponentul de eliberare, n	Medicament eliberat (%)
	Model Higuchi	Model Ordin Zero	Modelul Legii Putere			
0,5	0,9448	0,7961	0,9762	0,084	0,33	81,63
0,75	0,9716	0,8502	0,9875	0,044	0,37	61,70
1	0,9572	0,8194	0,9820	0,063	0,35	69,86

Modelele de eliberare a ciprofloxacinei au fost evaluate în continuare pentru a stabili mecanismul cinetic prin verificarea datelor experimentale *in vitro* cu modelul legii Peppas și cazurile sale particulare, Higuchi (n = 0,5) și ordinul zero (n = 1), valorile coeficienților de corelație corespunzători fiind prezentate în tabelul 7.1 [163].

Valorile coeficienților de corelație R cuprinse între 0,9762 și 0,9875 indică o mai bună verificare a modelului legii puterii și demonstrează că un astfel de model ar putea fi utilizat pentru a descrie mecanismul de eliberare a ciprofloxacinei din bureții de colagen. Mai mult, valorile exponenților de eliberare variind de la 0,33 la 0,37 relevă un mecanism non-fickian de transport al medicamentelor care implică mai multe etape [163]:

- o resorbție inițială a medicamentului reținut la suprafața buretelui,
- absorbția mediului de eliberare în structura poroasă, hidratarea polimerilor și umflarea buretelui, aceste două etape corespunzând efectului de eliberare bruscă, urmate de
- difuzia medicamentului reținut în rețeaua polimerică în timpul procesului de liofilizare simultan cu degradarea progresivă a suportului de eliberare, această etapă fiind corelată cu eliberarea prelungită și susținută de medicamente.

7.4. EFECTELE BIOLOGICE *IN VITRO* ALE BUREȚILOR DE COLAGEN ȘI CIPROFLOXACINĂ ASUPRA UNOR MICROORGANISME PATOGENE

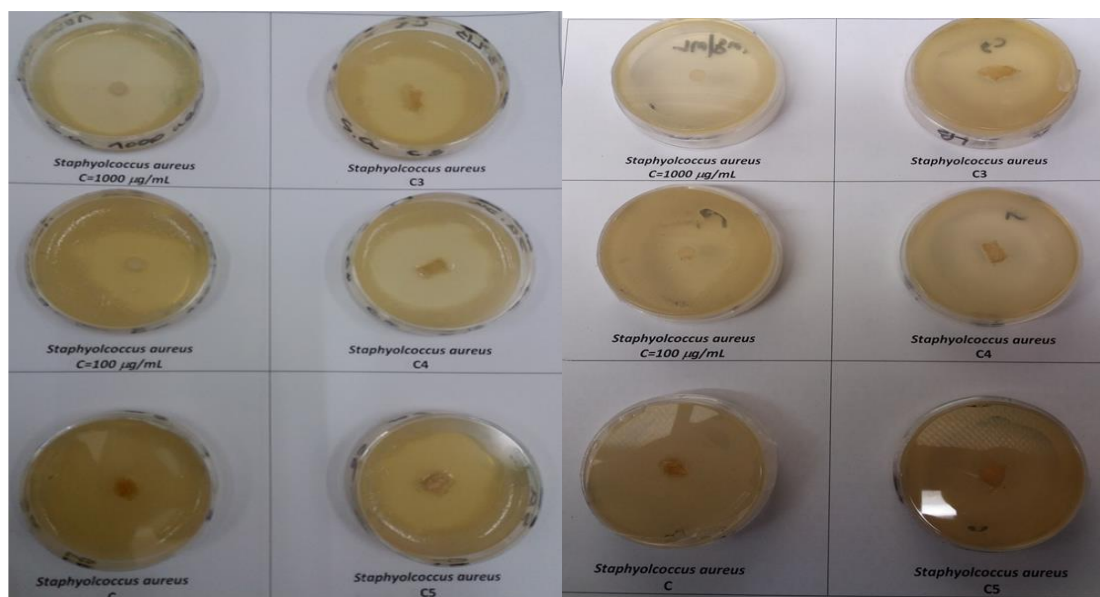
Tabelul 7.2 prezintă rezultatele obținute pentru materialele pe bază de colagen testate împotriva diferiților agenți patogeni. Din acest tabel se poate observa că pentru bacteria *Escherichia coli* s-au obținut cele mai bune rezultate pentru buretele care conține 1g ciprofloxacina/g colagen, rezultatul fiind similar cu cel obținut pentru soluțiile de 1000 μg/mL ciprofloxacina. Rezultate similare au fost obținute și pentru celelalte materiale colagen – ciprofloxacina arătând că *E. coli* este sensibilă la produsele testate [163].

Tabel 7.2. Diametrul de inhibiție al bureților testați împotriva diferiților agenți patogeni.

Proba	Diametrul de inhibiție, mm			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilopsis</i>
100 μg ciprofloxacina/mL	35,0 ± 1,75	0	0	0
1000 μg ciprofloxacina/mL	42,5 ± 2,12	44,0 ± 2,20	0	0
Burete de colagen (C)	10,5 ± 0,52	0	0	0
Burete de colagen și ciprofloxacina (0,5 g ciprofloxacina / g colagen) (C3)	37,0 ± 1,85	42,0 ± 2,10	0	0
Burete de colagen și ciprofloxacina (0,75 g ciprofloxacina / g colagen) (C4)	40,0 ± 2,00	42,0 ± 2,10	0	0
Burete de colagen și ciprofloxacina (1 g ciprofloxacina / g colagen) (C5)	38,5 ± 1,92	44,5 ± 2,22	0	0

Rezultate importante (Figura 7.4) au fost obținute și atunci când materialele sintetizate au fost testate împotriva *Staphylococcus aureus*. Se cunoaște că ciprofloxacina nu este un antibiotic cu activitate asupra microorganismelor gram pozitive. Cu toate acestea, microorganismul studiat este sensibil la substanța activă, cel mai bun rezultat fiind obținut pentru proba de 1g ciprofloxacina / g ciprofloxacina (diametru de inhibiție de 44,5 ± 2,22 mm), diametrul de inhibiție fiind mai mare decât cel observat pentru ciprofloxacina 100μg /mL. Rezultatele obținute în timpul acestui studiu confirmă faptul că mecanismul substanței active (ciprofloxacina) este inhibarea sintezei ADN. Rezultatele pozitive obținute în cazul microorganismelor gram pozitive (*Staphylococcus aureus*) se pot datora faptului că cercetarea s-a făcut cu tulpini microbiene din colecții standardizate, fără mutații care pot impregna rezistență la antibioticul testat. Aceste rezultate sunt similare cu cele obținute de F. Puoci [134], subliniind faptul că materialele pe bază de colagen cu ciprofloxacina ar putea fi utilizate pentru aplicațiile dorite [163].

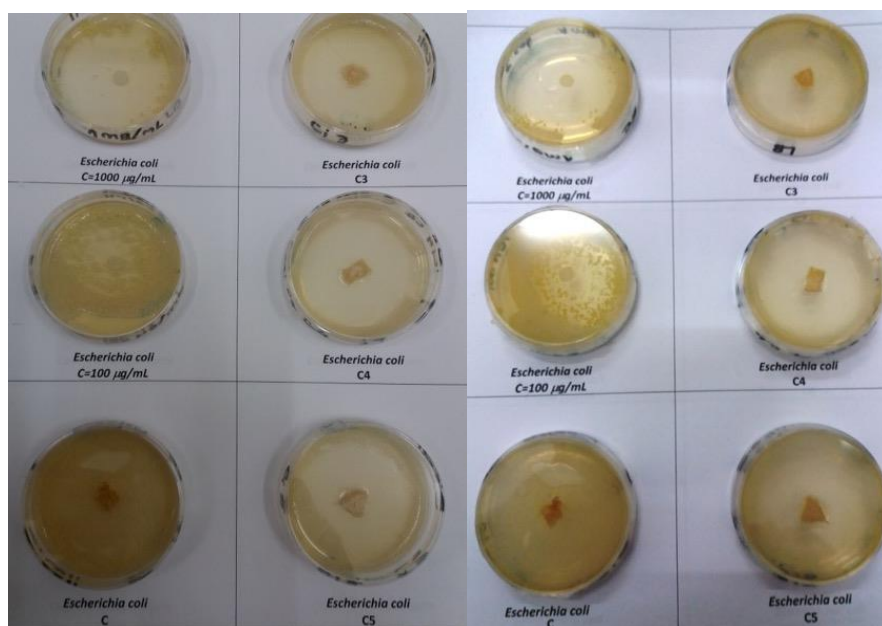
În cazul bacteriei *Escherichia coli* (fig.7.5) cele mai bune rezultate se obțin în cazul probei C5, rezultatele fiind similare cu cele obținute în cazul în care se testează o soluție de ciprofloxacina de concentrație 1000 μg/mL. În cazul probelor C4 și C3 s-au obținut rezultate similare. În consecință pe baza rezultatelor obținute se apreciază că microorganismul studiat este sensibil la produsele testate [163].



(a)

(b)

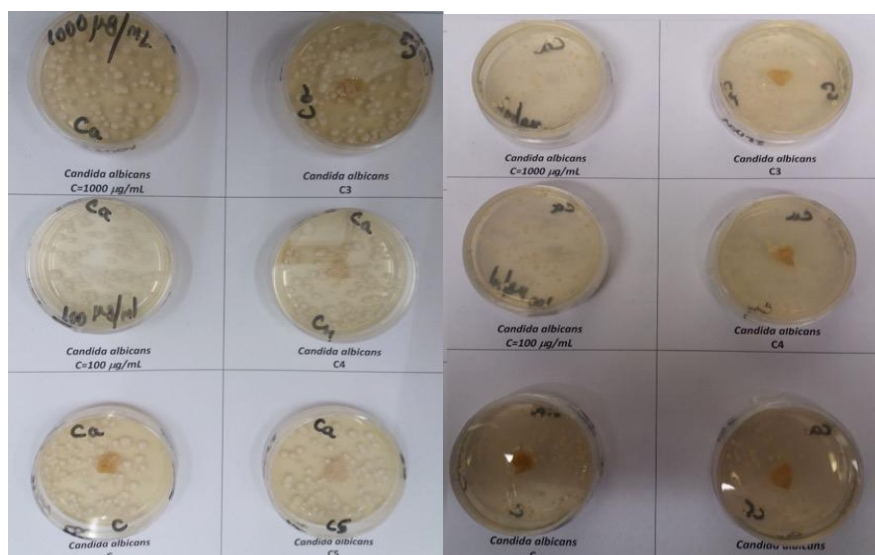
Figura 7.4 Efectul materialelor pe bază de colagen și ciprofloxacină asupra *Staphylococcus Aureus*. (a) – vedere frontală și (b) – vedere dorsală – pentru exemplu de cod, a se vedea tabelul 7.2.



(a)

(b)

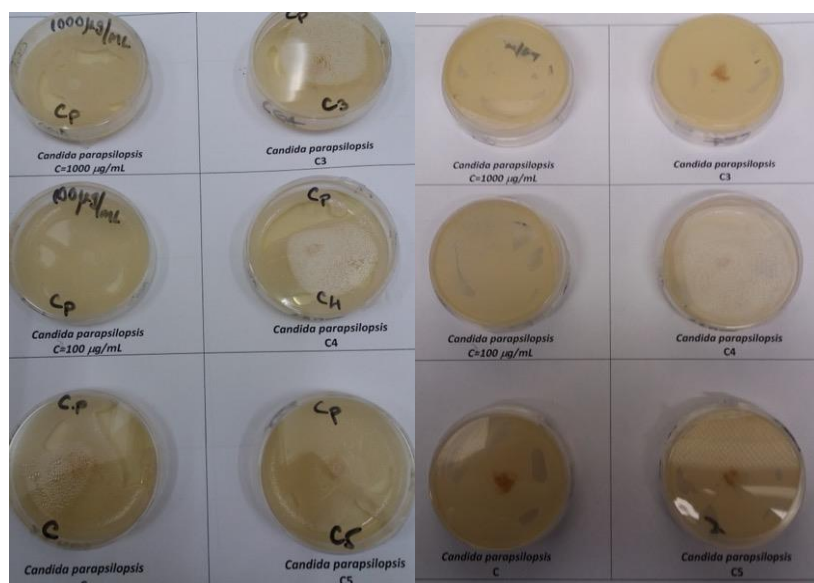
Figura 7.5 Efectul materialelor pe bază de colagen și ciprofloxacină asupra *Echerichia coli*. (a) – vedere frontală și (b) – vedere dorsală – pentru exemplu de cod, a se vedea tabelul 7.2.



(a)

(b)

Figura 7.6 Efectul materialelor pe bază de collagen și ciprofloxacina asupra *Candida parapsilosis*. (a) – vedere frontală și (b) – vedere dorsală – pentru exemplu de cod, a se vedea tabelul 7.2.



(a)

(b)

Figura 7.7 Efectul ciprofloxacinei – materiale pe bază de collagen asupra *Candida albicans*. (a) – vedere frontală și (b) – vedere dorsală – pentru exemplu de cod, a se vedea tabelul 7.2.

7.5. STUDIUL CITOTOXIC AL MATERIALELOR PE BAZĂ DE COLAGEN PE CELULE NORMALE – TESTE *IN VITRO*

Rezultatele au arătat că, în cazul liniei celulare testate după 6 ore și 24 de ore de expunere, se obține un IP mai mare de 1, sugerând că celulele sunt stimulate de bureți. După 48 de ore de expunere, IP scade și se apropie de 1 atunci când celulele au fost tratate cu materiale pe bază de ciprofloxacina. Mai mult, în cazul probei care conținea 1g ciprofloxacina/g collagen la 48 h scăderea IP a fost semnificativă (IP = 0,77) arătând că

acest burete devine citotoxic dacă este utilizat mai mult de 24 h pentru aceste celule [163].

Tabel 7.6 Proliferarea celulelor HUVEC la momente diferite de expunere la materialele pe bază collagen și ciprofloxacina.

Proba	Indice de proliferare (IP)		
	6 h	24 h	48h
100 µg ciprofloxacina /mL	1,17 ±0,0234	1,21 ± 0,0182	1,08 ± 0,0216
Burete de Collagen	1,34 ± 0,0268	1,29 ± 0,0194	1,23 ± 0,0246
Burete de collagen cu ciprofloxacina (0,5 g ciprofloxacina /g collagen)	1,46 ± 0,0292	1,48 ± 0,0222	0,94 ± 0,0188
Burete de collagen cu ciprofloxacina (0,75 g ciprofloxacina /g collagen)	1,56 ± 0,0312	1,36 ± 0,0204	1,04 ± 0,2080
Burete de collagen cu ciprofloxacina (1 g ciprofloxacina /g collagen)	1,24 ± 0,0248	1,16 ± 0,0174	0,77 ± 0,0154

7.6. CONCLUZII PARȚIALE

Studiul de față [163] a arătat că se pot sintetiza, sub formă de burete, materiale pe bază de collagen și ciprofloxacina. Rezultatele obținute sugerează că astfel de bureți absorb o cantitate importantă de apă, aceste materiale putând fi folosite în chirurgia capului și gâtului, deoarece se pot degrada destul de repede, aproximativ 40-50%, în primele 24 de ore. Mai mult, pentru același interval de timp, procentul cumulat de eliberare a ciprofloxacinei a fost între 61,70-81,63%, profilurile cinetice prezentând o alură bifazică care vizează prevenirea și controlul infecției locale asociate cu chirurgia capului și gâtului, evitând invazia sau proliferarea bacteriană ulterioară.

Soluțiile de substanță activă (Ciprofloxacina) în concentrații de 1000 µg/mL inhibă dezvoltarea bacteriilor studiate, (la aceasta concentrație bacteriile studiate manifestă fenomenul de sensibilitate).

La o concentrație de substanță activă de 100 µg/mL, bacteriile studiate manifesta fenomen de rezistență, dezvoltarea acestora nefiind influențată de prezența substanței active – Ciprofloxacina.

În cazul levurilor de tip *Candida sp.* nici unul din materialele testate nu a inhibat creșterea microorganismelor testate. Din acest motiv se apreciază că levurile de tip *Candida sp.* manifestă rezistență la toate materialele testate.

Totodată, aceste materiale au evidențiat efectul bacteriostatic, prin inhibarea dezvoltării bacteriilor gram negative precum *Escherichia coli* și a bacteriilor gram pozitive precum *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus sp.* de colecție comercială internațională, care nu manifestă fenomenul de chimiorezistență).

O altă constatare importantă este că aceste materiale prezintă și un efect stimulatив asupra liniei celulare normale HUVEC și, prin urmare, nu prezintă efect

citotoxic pentru timpi de expunere mai mici de 24 de ore. Datorită faptului că bureții cu 1g ciprofloxacină/g colagen prezintă un efect citotoxic asupra liniei celulare HUVEC după 24 h de expunere se poate concluziona că *in vitro* se obține un efect optim (antimicrobian și nu citotoxic) pentru bureții cu 0,50 g ciprofloxacină/g colagen și 0,75 g ciprofloxacină/g colagen.

CAPITOLUL 8. MATERIALE PE BAZA DE COLAGEN, CIPROFLOXACINĂ ȘI PIROXICAM CU POTENȚIALE APLICAȚII CHIRURGICALE ORALE - TESTE PRELIMINARE

Având în vedere rezultatele obținute pentru materialele spongioase pe bază de colagen funcționalizat cu ciprofloxacină sau piroxicam s-au proiectat materiale pe baza de colagen care să conțină atât ciprofloxacină cât și piroxicam ținând cont de faptul că cele două medicamente sunt complementare și dorindu-se un efect sinergic al acestora.

Astfel s-au preparat urmând procedura prezentată în capitolul 4 bureți ce conțin atât ciprofloxacină cât și piroxicam. Materialele spongioase pe bază de colagen au avut un conținut de 0,05 g ciprofloxacină/g colagen și 0,15% piroxicam (proba PC 1), respectiv 0,5g ciprofloxacină/g colagen și 1,5% piroxicam (proba PC 2).

Pentru început acest studiu preliminar a vizat pentru aceste materiale doar experimentele de absorbție de apă și de degradare a bureților în prezență de colagenază.

8.1. EXPERIMENTE DE ABSORBȚIE DE APĂ

Figura 8.1 prezintă comparativ rezultatele obținute în cadrul experimentelor de testare privind absorbția de apă. Se observă că adăugarea de medicament conduce la o creștere importantă a absorbției de apă față de matricea de colagen simplă.

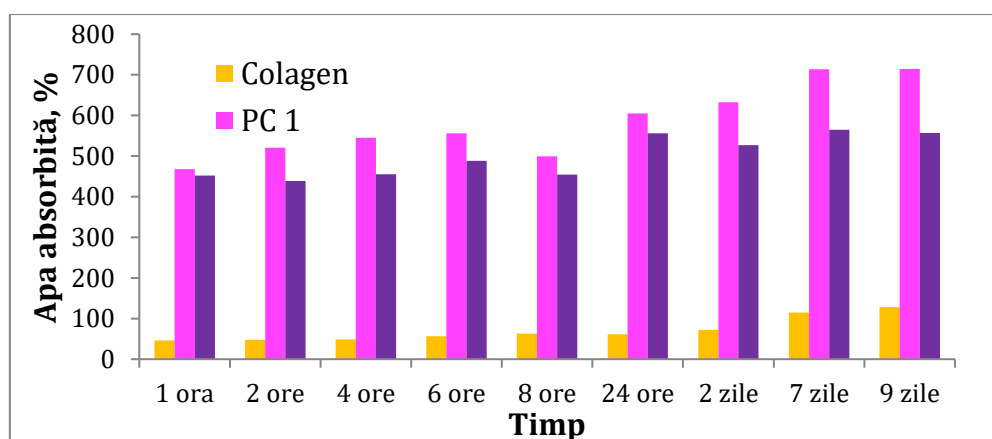


Figura 8.1 Absorbția de apă pentru probele ce conțin ambele substanțe medicamentoase prin comparație cu un burete de colagen

Comparând procentul de apă absorbită de către buretele ce conține ambele substanțe medicamentoase cu procentele de apă absorbite de către bureții funcționalizați cu doar un medicament se poate observa un efect sinergic. Dacă atunci când buretele conține doar un medicament procentul de apă absorbită este similar (cu o ușoară creștere

în cazul buretelui cu piroxicam) buretele ce conține atât ciprofloxacină cât și piroxicam absoarbe o cantitate de apă de aproximativ 5 ori mai mare.

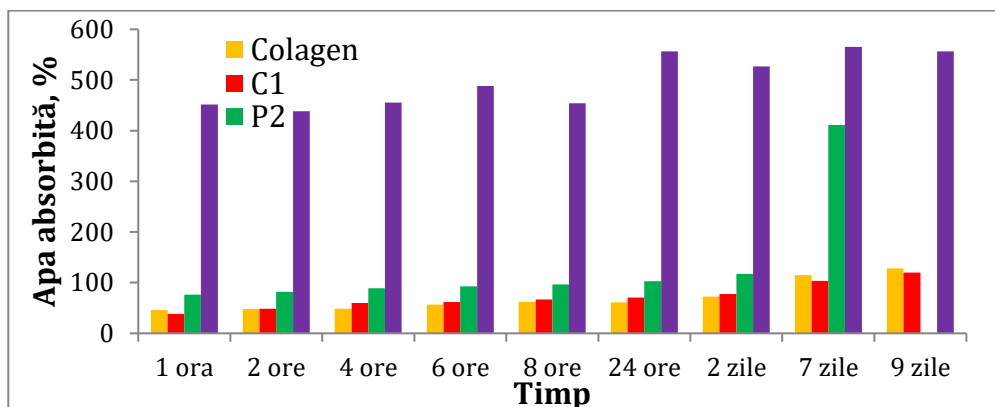


Figura 8.2 Comparație privind absorbția de apă pentru probele ce conțin aceeași concentrație de ciprofloxacină sau piroxicam C1 – burete de colagen ce conține 0,5 g ciprofloxacină/ g colagen; P2 – burete de colagen ce conține 1,5 % piroxicam; PC2 – burete de colagen ce conține 0,5 g ciprofloxacină/ g colagen și 1,5 % piroxicam

8.2. EXPERIMENTE DE DEGRADARE ENZIMATICĂ

Experimentele de degradare enzimatică au arătat că adăugând substanțe medicamentoase degradarea buretelui are loc mai repede, o concentrație mai mare de medicament conducând la o degradare mai rapidă (figura 8.3). Imersarea probelor ce conțin ciprofloxacină și piroxicam în soluție ce conține colagenază a condus la rezultate ce sugerează că în primele 8 ore există o competiție între absorbția de apă și degradarea buretelui, apa absorbită compensând masa de colagen degradată. Mai mult în prima oră buretele ce conține ambele medicamente absoarbe mai multă apă decât masa de burete degradată. După 24 de ore proba ce conține cele mai mari cantități de medicamente prezintă o degradare mai accentuată. De remarcat că ambele probe spongioase cu ciprofloxacină și piroxicam s-au dezintegrat abia după 72 de ore.

Dacă se urmărește comparația comportamentului la acțiunea colagenazei (figura 8.4) se poate afirma că și în acest caz alăturarea celor două substanțe medicamentoase conduce la un efect sinergic. În general prezența ciprofloxacinei sau a piroxicamului are drept efect accelerarea degradării. În plus prezența piroxicamului determină și dezintegrarea matricii spongioase după 8 ore de imersare. Cu toate acestea când cele două medicamente sunt alăturate într-un burete degradarea matricii în prezență de colagenază este încetinită, iar matricea se dezintegrează după 6 zile.

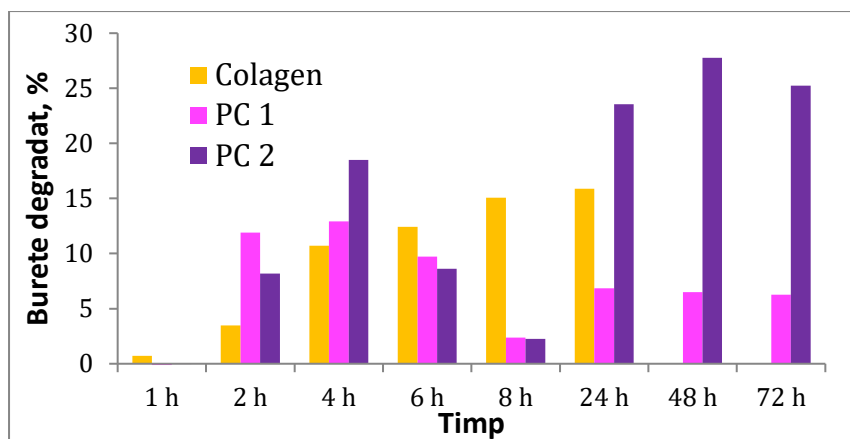


Figura 8.3 Degradarea enzimatică pentru probele ce conțin ambele substanțe medicamentoase prin comparație cu un burete de colagen

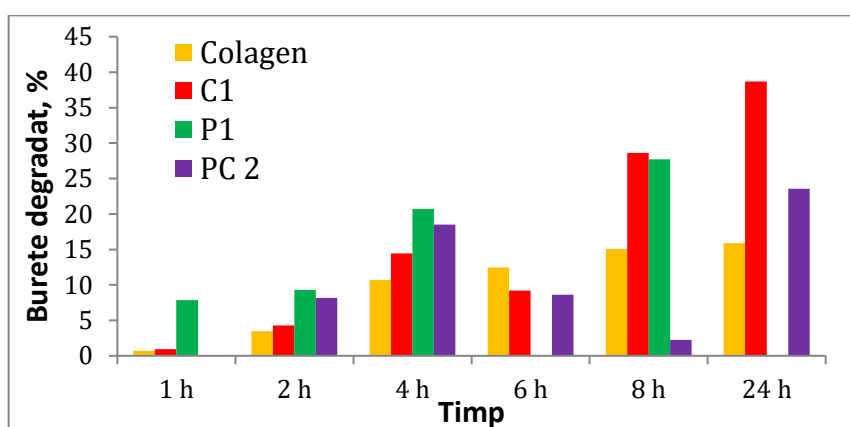


Figura 8.4 Comparație privind degradarea enzimatică pentru probele ce conțin aceeași concentrație de ciprofloxacina sau piroxicam C1 – burete de colagen ce conține 0,5 g ciprofloxacina/ g colagen; P2 – burete de colagen ce conține 1,5 % piroxicam; PC2 – burete de colagen ce conține 0,5 g ciprofloxacina/ g colagen și 1,5 % piroxicam

8.3. CONCLUZII PARȚIALE

Studiul efectuat asupra materialelor pe bază de colagen funcționalizat cu ciprofloxacina și piroxicam a arătat că alăturarea celor două substanțe medicamentoase are ca efect o îmbunătățire a proprietăților de absorbție a apei, respectiv a rezistenței la acțiunea colagenazei.

Cantitatea mare de apă absorbită, de 5 ori mai mult decât în cazul materialului ce conține doar ciprofloxacina sau doar piroxicam, conduce la gonflarea buretelui, fapt ce ar putea fi benefic pentru aplicațiile din domeniul chirurgiei oro – maxilo – faciale.

Acest studiu urmează a fi completat cu teste de activitate antimicrobiană, citotoxicitate și de eliberare a medicamentelor. Având în vedere rezultatele obținute pe materialele ce conțin doar unul din medicamente este de așteptat ca și acest material să prezinte activitate antimicrobiană și citotoxicitate similare cu cele obținute în cazul materialelor ce conțin doar ciprofloxacina.

CONCLUZII

C.1. CONCLUZII GENERALE

În întreaga lume durerea reprezintă un simptom important și problematic după orice fel de intervenție chirurgicală, indiferent de tipul intervenției chirurgicale, dimensiunile plăgii sau patologia asociată pacientului. Cercetările actuale în medicină se bazează pe dezvoltarea oricăror potențiale cure pentru rezolvarea nevoilor pacientului, scopul principal fiind reducerea și ameliorarea durerii, a inflamației și a senzației și intensificarea procesului de recuperare. Toate aceste aspecte vor contribui la îmbunătățirea calității vieții pacientului, acesta fiind unul dintre principalele motive pentru utilizarea unei varietăți de medicamente în tratamentul durerii cronice și acute.

Înainte, în timpul sau după intervenția chirurgicală pot apărea infecții sau suprainfecții. Preoperatoriu, în cele mai multe cazuri, sunt factori traumatici sau formațiuni suprainfectate netratate la timp care determină infecții, în timp ce în timpul intervenției chirurgicale pot apărea factori patogeni prin contaminarea plăgii. Suprainfecția postoperatorie poate apărea datorită igienei locale deficitare și în unele cazuri rare poate exista o reacție negativă sau alergică a organismului sau pot exista seroame.

În prezenta teză de doctorat s-au studiat materiale pe bază de colagen și funcționalizarea acestora cu ciprofloxacina și piroxicam. Scopul acestui studiu a fost de îmbinare a proprietăților și implicit a beneficiilor colagenului cu două substanțe medicamentoase respectiv un antibiotic și un antiinflamator, ciprofloxacina și piroxicamul, medicamente care pot fi eliberate local, la nivelul plăgii chirurgicale în vederea regenerării tisulare locale mai eficiente și a unei vindecări locale optime.

În etapele acestui studiu s-au efectuat mai multe teste în ceea ce privește atât viabilitatea acestor bureți de colagen pe bază de antibiotic și antiinflamator cât și pentru a determina o interacțiune benefică între aceste elemente, materialul spongios pe bază de colagen, antibioticul – ciprofloxacina, antiinflamatorul – piroxicamul dar și pentru a determina și timpul optim de resorbție sau degradare al acestui compus.

Scopul acestei cercetări a fost așadar proiectarea, crearea, realizarea și caracterizarea acestor materiale spongioase pe bază de colagen, antiinflamator și antibiotic, aceste materiale fiind create pentru a avea un rol benefic în procesul de vindecare și cu aplicații în diferite specailități chirurgicale, în special în Chirurgia Oro-Maxilo-Facială.

Rezultatele obținute în timpul stagiului doctoral au condus la următoarele concluzii:

- Este posibilă obținerea prin liofilizare de materiale spongioase cu concentrații diferite de antiinflamator, antibiotic sau o combinație a acestor două medicamente;
- Funcție de concentrația de antiinflamator materialele obținute pot găsi aplicații în medicina umană sau veterinară.

Pentru materialele cu conținut ridicat de piroxicam principalele concluzii sunt :

- Imaginile microscopiei optice au prezentat o structură fibrilară cu pori interconectați în toți bureții obținuți dar și cu agregări de piroxicam dat fiind conținutul mare de medicament;

- Buretele de colagen fără conținut de piroxicam a absorbit o cantitate importantă de apă, iar atunci când medicamentul a fost adăugat în compoziția buretelui de colagen, cantitatea de apă absorbită a scăzut. Se poate concluziona că absorbția de apă pentru bureții studiați scade odată cu creșterea dozei de medicament;
- Un conținut ridicat de medicament conduce la dezintegrarea buretelui. Nu se poate afirma că probele sunt total degradate în sensul pierderii de masă, acestea se dezintegrează și practic fibrele de colagen cu piroxicam sunt prezente în soluție (PBS cu collagenază);
- Studiile cinetice au indicat o eliberare bifazică a medicamentului, favorabilă pentru asigurarea unei concentrații adecvate de piroxicam la locul de aplicare pentru a gestiona inflamația și durerea consecutivă asociată cu diferite boli orale;
- Aceste rezultate preliminare sugerează că astfel de bureți cu doze mari de piroxicam ar putea fi utilizați pentru diferite tratamente la animale mari, cum ar fi cabaline și bovine.

Studiul concentrat pe sinteza și caracterizarea de noi materiale pe bază de colagen cu concentrații mai reduse de piroxicam a demonstrat că aceste noi materiale pot avea aplicații biomedicale, în special în stomatologie. Aceste materiale noi, materiale spongioase pe bază de colagen, obținute prin metoda liofilizării, au fost caracterizate prin diverse tehnici precum microscopia optică, spectroscopia IR, absorbția apei, degradarea enzimatică și eliberarea cinetică *in vitro*. Principalele concluzii ale acestui studiu sunt :

- Rezultatele obținute privind hidroliza și degradarea enzimatică au arătat rolul inhibitor al agentului de reticulare, în timp ce prezența piroxicamului determină o creștere a degradării buretelui în prezența collagenazei care conduce în final la dezintegrarea buretelui.
- Profilurile cinetice determinate pentru eliberarea piroxicamului sugerează un profil bifazic de eliberare a medicamentului, în timp ce valorile obținute pentru exponentul de eliberare ($< 0,5$) au evidențiat un mecanism complex de eliberare care include gonflarea, difuzia și eroziunea.
- Rezultatele obținute sugerează că în viitorul apropiat biomaterialele pe bază de piroxicam-colagen ar putea reprezenta cu ușurință o soluție viabilă și modernă pentru tratarea diferitelor tipuri de plăgi care apar în chirurgia oro-maxilo-facială, cumulând cele mai bune proprietăți ale collagenului și ale antiinflamatorului nesteroidian.

Studiul realizat pe materialele spongioase funcționalizate cu ciprofloxacina a arătat că se pot sintetiza, sub formă de burete, materiale pe bază de colagen și ciprofloxacina. Rezultatele obținute sugerează că:

- Astfel de bureți absorb o cantitate importantă de apă, aceste materiale putând fi folosite în chirurgia capului și gâtului, deoarece se pot degrada destul de repede, aproximativ 40-50%, în primele 24 de ore;
- Pentru același interval de timp, procentul cumulat de eliberare a ciprofloxacinei a fost între 61,70-81,63%, profilurile cinetice prezentând o alură bifazică care

vizează prevenirea și controlul infecției locale asociate cu chirurgia capului și gâtului, evitând invazia sau proliferarea bacteriană ulterioară;

- Soluțiile de substanță activă (Ciprofloxacină) în concentrații de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibă dezvoltarea bacteriilor studiate, (la aceasta concentrație bacteriile studiate manifestă fenomenul de sensibilitate);
- La o concentrație de substanță activă de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bacteriile studiate manifestă un fenomen de rezistență, dezvoltarea acestora nefiind influențată de prezența substanței active – Ciprofloxacină;
- În cazul levurilor de tip *Candida sp.* nici unul din materialele testate nu a inhibat creșterea microorganismelor testate. Din acest motiv se apreciază că levurile de tip *Candida sp.* manifestă rezistență la toate materialele testate;
- Aceste materiale au un efect bacteriostatic, prin inhibarea dezvoltării bacteriilor gram negative precum *Escherichia coli* și a bacteriilor gram pozitive precum *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus sp.* de colecție comercială internațională, care nu manifestă fenomenul de chimiorezistență);
- Aceste materiale prezintă și un efect stimulativ asupra liniei celulare normale HUVEC și, prin urmare, nu prezintă efect citotoxic pentru timpuri de expunere mai mici de 24 de ore. Datorită faptului că bureții cu 1g ciprofloxacină/g colagen prezintă un efect citotoxic asupra liniei celulare HUVEC după 24 h de expunere se poate concluziona că *in vitro* se obține un efect optim (antimicrobian și nu citotoxic) pentru bureții cu 0,50 g ciprofloxacină/g colagen și 0,75 g ciprofloxacină/g colagen;

Coroborând experimentul de eliberare a medicamentului și rezultatele fizico-chimice, un burete de colagen conținând 0,75 g ciprofloxacină pentru 1 gram de colagen ar putea fi recomandat pentru testele *in vivo* pentru a confirma rezultatele prezentate în această lucrare.

Studiul efectuat asupra materialelor pe bază de colagen funcționalizat cu ciprofloxacină și piroxicam a permis obținerea următoarelor concluzii:

- Alăturarea celor două substanțe medicamentoase are ca efect o îmbunătățire a proprietăților de absorbție a apei, respectiv a rezistenței la acțiunea colagenazei.
- Cantitatea mare de apă absorbită, de 5 ori mai mult decât în cazul materialului ce conține doar ciprofloxacină sau doar piroxicam, conduce la gonflarea buretelui, fapt ce ar putea fi benefic pentru aplicațiile din domeniul chirurgiei oro – maxilo – faciale.

Acest studiu urmează a fi completat cu teste de activitate antimicrobiană, citotoxicitate și de eliberare a medicamentelor. Având în vedere rezultatele obținute pe materialele ce conțin doar unul din medicamente este de așteptat ca și acest material să prezinte activitate antimicrobiană și citotoxicitate similare cu cele obținute în cazul materialelor ce conțin doar ciprofloxacină.

Se poate concluziona că materialele spongioase realizate și caracterizate în această teză își pot găsi aplicații în diverse intervenții chirurgicale, cu păstrarea proprietăților de bază și avantajul generării unor noi caracteristici prin combinarea

colagenului cu un antiinflamator nesteroidian și un antibiotic. Aceste materiale pot avea un triplu rol activ: hemostază locală prin absorbția de fluide, accelerare a procesului de vindecare și rezervor pentru substanțele medicamentoase.

C.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Această lucrare de doctorat aduce contribuții originale în obținerea de materiale pe bază de colagen, materiale funcționalizate cu un antiinflamator nesteroidian – piroxicam și/sau un antibiotic din clasa fluorochinolonelor – ciprofloxacina.

Elementele de originalitate care se disting în cadrul acestei teze sunt următoarele:

- obținerea de materiale spongioase noi (colagen – piroxicam) ce pot fi folosite în managementul durerii pentru animale mari;
- obținerea de materiale spongioase noi (colagen – piroxicam) cu proprietăți eficiente în ceea ce privește absorbția de apă, degradarea enzimatică și cedarea medicamentului, materiale ce își pot găsi aplicații în diverse ramuri ale chirurgiei;
- obținerea de materiale spongioase noi (colagen – ciprofloxacina), materiale ce au dovedit proprietăți antimicrobiene și citotoxice superioare comparativ cu antibioticul simplu;
- obținerea de materiale spongioase noi ce conțin atât antiinflamator cât și antibiotic.

C.3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ

Rezultatele obținute pe durata stagiului doctoral deschid direcții noi de cercetare având în vedere aplicațiile acestor materiale. Astfel pentru dezvoltarea acestor materiale și pentru valorificarea acestora prezentele studii trebuie continuate cu studii *in vivo*.

Studiul preliminar efectuat pe materialele ce conțin atât piroxicam cât și ciprofloxacina va fi completat cu teste de activitate antimicrobiană, citotoxicitate și de eliberare a medicamentelor, precum și cu studii *in vivo*.

LISTA DE LUCRĂRI

1. **Daniel – Cristian Ioan**, I. Rău, G.T. Tihan, R.G. Zgarian, M.V. Ghica, M.G. Albu Kaya, E.C. Dinu-Pîrvu, Piroxicam-Collagen-Based Sponges for Medical Applications, International Journal of Polymer Science, 2019, Article Number: 6062381 F.I. (2019) = 1,646
2. **Daniel – Cristian Ioan**, I. Rău, M. G. Albu Kaya, N. Radu, M. Bostan, R. G. Zgârian, G. T. Tihan, C.-E. Dinu-Pîrvu, A. Lupuliasa, M.-V. Ghica, Ciprofloxacina-Collagen-Based Materials with Potential Oral Surgical Applications, Polymers 2020, 12 (9), pp. 1 – 13, art. No. 1915, F.I. (2020) = 4,329
3. **Daniel – Cristian Ioan**, I. Rău, M. Albu-Kaya, R. Zgârian, G. Tihan, C. Dinu-Pîrvu, L. Popa, M. Ghica, Collagen based sponges for veterinary applications, U.P.B. Sci. Bull., Series B 2024, 86, (1), pp 135 – 144, F.I. = 0,5

F.I. cumulată = 6,475

PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE

Daniel – Cristian Ioan, G. T. Tihan, R. G. Zgârian, M. V. Ghica, M. G. Albu-Kaya, C. Dinu-Pîrvu, I. Rău, RICCE Conference 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, „New collagen-piroxicam based materials for oral applications” Poster, 2017.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] <http://rezidentiat.ms.ro/curricule/2020/chirurgie-dento-alveolara-2020.pdf> accesat la data de 17.11.2021
- [2] http://rezidentiat.ms.ro/curricule/2017/chirurgie_orala_si_maxilo_faciala_2017.pdf accesat in data de 23.10.2021
- [3] R. J. Fonseca, Oral and Maxillofacial Surgery, Ed. Elsevier, China, 2018
- [23] R. Khan and M. H. Khan, “Use of collagen as a biomaterial: an update,” Journal of Indian Society of Periodontology, **vol. 17**, no. 4, 539–542, 2013.
- [36] P. Fratzl, „Collagen structure and mechanics”, Ed.Springer, 2008, ISBN: 978-0-387-73905-2.
- [37] V. Trandafir, G. Popescu, M.G. Albu, H. Iovu, M. Georgescu „Bioproduse pe bază de colagen”, Ars Docendi Universitatea Din București, 2007, ISBN 978-973-558-291-3.
- [43] D. Iordăchescu, A. Câmpean, C. Stan, „Modelarea matricei extracelulare - aplicații în ingineria tisulară”, Ed. Pro Transilvania, 2004.
- [44] R. W. Posletwhaite, J. E. Dunphy, W. Van Winkle, Editors, „Repair and regeneration in: The scientific basis for surgical practice”, In Journal of the American Medical Association, **vol.208**, no.10, 1767 – 1972, 1969.
- [45] C. J. Doillon, „Studies of novel hyaluronic acid-collagen sponge materials composed of two different species of type i collagen”, Journal of Biomaterials, **2(4)**, 562, 1988.
- [46] C. J. Doillon, F. H. Silver, “Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing”, Journal of Biomaterials, **7(1)**, 3 – 8, 1986.
- [47] A. C. Abramo, J. C. Viola, „Heterologous collagen matrix sponge: histologic and clinical response to its implantation in third-degree burn injuries”, Br. Journal of Plastic Surgery, **45(2)**, 117 – 122, 1992.
- [52] M. Ghica, M. Albu Kaya, C.-E. Dinu-Pîrvu, D. Lupuleasa and D. Udeanu, “Development, optimization and in vitro/in vivo characterization of collagen-dextran spongy wound dressings loaded with flufenamic acid,” Molecules, **vol. 22**, no. 9, 1 – 22, 2017.
- [67] R. M. Maciel, R. D. Mazaro, J. P. F. Silva, D. M. Lorenzetti, A. Herbichi, M. C. Paz, C. C. Danesi, R. A. Figuera, “Periodontal disease and its complications in cats from a shelter in the Central Region of Rio Grande do Sul”, In Pesquisa Veterinaria Brasileira, Brazilian Journal of Veterinary Research, **vol 40**, no.9, 696-706, 2020.
- [68] N. Staubil, J. C. Schmidt, C. A. Rinne, S. L. Signer-Buset, F. R. Rodriguez, C. Walter, “Animal experiments in periodontal and peri-implant research: Are there any changes?”, In Dentistry Journal, **vol.7**, no.46, 1-6, 2019.
- [72] El Akogwu, SA Saganuwan, PA Onyeyili, “Effects of piroxicam on tissue distribution of sulfamidine in West African Dwarf male and female goats”, in Human and Experimental Toxicology, **vol.37**, no.1, 61-68, 2018.

- [73] R. Oluchukwu Okafor, B.D. Remi-Adewunmi, S. Tanko Fadason, "Effect of piroxicam and/or ascorbic acid postoperative pain in orchidectomised goats", in *Journal of Animals*, Article Id 923170, 8, 2014.
- [74] M. Grassi, G. Grassi, R. Lapasin, I. Colombo, „Understanding drug release and absorption mechanisms – a physical and mathematical approach”, Ed. Crc Press, 2007.
- [80] A. M. Crăciun, M. L. Bărhălescu, M. Agop, L. Ochiuz, „Theoretical modeling of long-time drug release from nitrosalicyl-imine-chitosan hydrogels through multifractal logistic type laws”, In *Computational And Mathematical Methods In Medicine*, Article Id 4091464, 2019.
- [81] R. Goyal, L. K. Macri, H.M. Kaplan, J. Kohn, „ Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery”, In *Journal of Controlled Release*, **vol. 240**, 77 – 92, 2016, Doi:10.1016/J.Jconrel.2015.10.049.
- [82] M. J. Rathbone, R. Gurny, “Controlled release veterinary drug delivery, biological and pharmaceutical considerations”, Ed. Elsevier, 9-13, 2000.
- [83] C. Li, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, G. Wei, Y. Huang, H. Yu, Y. Gan, Y. Wang, L. Mei, H. Chen, H. Hu, Z. Zhang, Y. Jin, „Recent progress in drug delivery”, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **9**(6), 1145–1162, 2019, Doi.Org/10/1016/J.Apsb.2019.08.003.
- [84] D. Wojcik-Pastuzka, J. Krzak, B. Macikowski, R. Berkowski, B. Osinski, W. Musial, „Evaluation Of the release kinetics of pharmacologically active substance from model intra-articular implants replacing the cruciate ligaments of the knee”, In *J. of Materials*, **12**(8), 1 – 13, 2019. Doi:10.3390/Ma12081202.
- [85] H. A. E. Benson, J. E. Grice, Y. Mohammed, S. Namjoshi And M. S. Roberts, „Current drug delivery, topical and trasdermal drug delivery: from simple potions to smart technologies”, In *Current Drug Delivery Journal*, **16**(5), 444-460, 2019.
- [115] D. Narayanan, M. G. Geena, H. Lakshmi, M. Koyakutty, S. Nair and D. Menon, “Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug ibuprofen-sodium: an in vitro and in vivo analysis,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **vol. 9**, no. 6, 818–828, 2013.
- [157] **Daniel – Cristian Ioan**, I. Rău, M. Albu-Kaya, R. Zgârian, G. Tihan, C. Dinu-Pîrvu, L. Popa, M. Ghica, „Collagen based sponges for veterinary applications”, *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, **86**, (1), 135 – 144, 2024.
- [158] **Daniel – Cristian Ioan**, I. Rău, G. T. Tihan, R. G. Zgarian, M. V. Ghica, M. G. Albu Kaya, E. C. Dinu-Pirvu, „Piroxicam-Collagen-Based sponges for medical applications”, *International Journal of Polymer Science*, 2019, Article Number: 6062381
- [159] T. Riaz, R. Zeeshan, F. Zarif et al., „FTIR analysis of natural and synthetic collagen”, *Applied Spectroscopy reviews*, **vol.53**, no.9, 703-746, 2018.
- [160] V. Perez-Puyana, A. Romero and A. Guerrero, „ Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties”, *Journal of Biomedical Materials Research*, **vol.104**, no.6, 1462-1468, 2016.
- [161] M. K. Trivedi, S. Patil, H. Shettigar, K. Bairwa and S. Jana, „Effect of biofield treatment on spectral properties of paracetamol and piroxicam”, *Chemical Sciences Journal*, **vol.6**, no.3, 1- 6, 2015.

[162] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou and C. Petibois, „Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **vol.395**, no.3, 829-837, 2009.

[163] Daniel – Cristian Ioan, I. Rău, M. G. Albu Kaya, N. Radu, M. Bostan, R. G. Zgârian, G. T. Tihan, C.-E. Dinu-Pîrvu, A. Lupuliasa, M.-V. Ghica, „Ciprofloxacin-Collagen-Based materials with potential oral surgical applications”, *Polymers* 2020, **12**(9), 1 – 13, art. No. 1915, 2020.