

POROUS GELATIN HYDROGELS BASED ON CLAY PROMOTED BY CALCIUM MINERALIZATION

HIDROGELURI POROASE DE GELATINĂ PE BAZĂ DE ARGILĂ ACTIVATĂ PRIN MINERALIZARE CU CALCIU

Tao ZHANG^{1,2}, Ying GONG^{1,3}, Xiaoling LIU¹, Bo TENG¹, Wuyong CHEN^{1*}

¹ National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610065, China, email: wuyong.chen@163.com

² Department of Chemie, Technische Universität Dresden, Dresden, 01069, Germany, email: Tao.Zhang@mailbox.tu-dresden.de

³ College of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, 650500, Kunming, China, email: gongying_2004@163.com

POROUS GELATIN HYDROGELS BASED ON CLAY PROMOTED BY CALCIUM MINERALIZATION

ABSTRACT. A bioclean method was proposed to prepare porous gelatin-based hydrogels using clay as porogen, water as solvent and calcium as promoter: firstly, laponite clay and gelatin were individually dissolved in deionized water to get aqueous solutions; then the two solutions were blended and exposed to -20°C for 24 h to form physically crosslinked hydrogel; finally the hydrogel was soaked in a calcium chloride solution at room temperature for 48 h to obtain matrixes with well-defined voids. The gelatin molecules intercalated into the clay slices gaining uniform composites, which were confirmed by atomic force microscopy, infrared spectrum, X-ray diffraction and differential scanning calorimetry analyses. As proved by scanning electron microscopy study, in the matrix containing 5% gelatin and 2% clay, the voids were interconnecting, and the size of pores focused on a range of 100-200 μm . Such matrix might serve as scaffolds for tissue engineering because of its typical pore structure and size distribution. Additionally, such material could be used as wound dressings, for it was able to provide a fine moist environment for a surface.

KEY WORDS: hydrogel, gelatin, clay.

HIDROGELURI POROASE DE GELATINĂ PE BAZĂ DE ARGILĂ ACTIVATĂ PRIN MINERALIZARE CU CALCIU

REZUMAT. S-a propus o metodă curată de preparare a hidrogelurilor poroase pe bază de gelatină utilizând argilă ca agent porogen, apă ca solvent și calciu ca activator: mai întâi, s-au dizolvat separat laponita (argilă) și gelatina în apă deionizată pentru a obține soluții apoase; apoi s-au amestecat cele două soluții și au fost expuse la -20°C timp de 24 h, pentru a forma un hidrogel reticulat fizic; în cele din urmă hidrogelul a fost înmuiat într-o soluție de clorură de calciu la temperatura camerei, timp de 48 h, pentru a obține matrice cu pori bine definiți. Moleculele de gelatină s-au intercalat între discurile de argilă, alcătuind compozite uniforme, fapt confirmat prin microscopie de forță atomică, spectroscopie în infraroșu, difracție de raze X și calorimetrie diferențială de baleiaj. După cum s-a dovedit prin studiul de microscopie electronică de baleiaj, în matricea care conține 5% gelatină și 2% argilă, porii s-au interconectat, iar dimensiunile porilor s-au concentrat în intervalul 100-200 μm . O asemenea matrice ar putea servi ca suport pentru ingineria țesuturilor datorită structurii sale poroase și distribuției dimensiunilor porilor. În plus, un astfel de material ar putea fi folosit ca pansament, întrucât este în măsură să ofere un mediu fin și umed pentru o altă suprafață.

CUVINTE CHEIE: hidrogel, gelatină, argilă.

DES HYDROGELS POREUX DE GÉLATINE À BASE D'ARGILE ACTIVÉE PAR LA MINÉRALISATION À L'AIDE DE CALCIUM

RÉSUMÉ. On a proposé une méthode bio de préparer des hydrogels poreux à base de gélatine en utilisant de l'argile comme agent porogène, de l'eau comme solvant et du calcium comme activateur: tout d'abord, l'argile laponite et la gélatine ont été individuellement dissoutes dans de l'eau déminéralisée pour obtenir des solutions aqueuses; ensuite les deux solutions ont été mélangées et exposées à -20°C pendant 24 heures pour former un hydrogel réticulé physiquement; enfin l'hydrogel a été trempé dans une solution de chlorure de calcium à la température ambiante pendant 48 heures pour obtenir des matrices à pores bien définis. Les molécules de gélatine sont intercalées dans les tranches d'argile en formant des composites uniformes, qui ont été confirmées par microscopie à force atomique, spectres infrarouge, diffraction de rayons X et calorimétrie différentielle à balayage. Comme le prouve l'étude de microscopie électronique à balayage, dans la matrice contenant 5% de gélatine et 2% d'argile, les pores sont interconnectés, et les tailles des pores sont concentrées sur une gamme de 100-200 μm . Cette matrice peut servir comme substrat pour l'ingénierie tissulaire en raison de sa structure poreuse et la distribution granulométrique. En outre, un tel matériau pourrait être utilisé comme pansement, car il est en mesure de fournir un environnement doux et humide pour une autre surface.

MOTS CLÉS: hydrogel, gélatine, argile.

*Correspondence to: Wuyong CHEN, National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610065, China, email: wuyong.chen@163.com

INTRODUCTION

In recent years, considerable efforts have been put into natural macromolecule based hydrogels, since such materials hold incomparable biocompatibility, biodegradability and bioactivity which are precisely pre-requisite in a biosystem. Furthermore, the controlled porosity, pore size, degradation rate, as well as tissue matching mechanical properties and appropriate biological response obtained from biocompatible and biodegradable materials are essential for tissue engineering [1].

Gelatin, as a kind of natural polypeptide obtained from collagen, consists of 18 different amino acids of various active groups such as amino, carboxyl, hydroxyl and phenolic hydroxyl. These side groups endow gelatin with excellent physical and chemical characteristics such as film-forming, surface activity, reversible sol-gel transformation, polyampholyte, and high reactivity [2]. In this article, two biocompatible materials, gelatin and clay, were proposed to prepare porous hydrogels in an aqueous medium. This technique, avoiding the use of organic solvent, may provide a simple and clean technique to fabricate macroporous scaffolds for tissue engineering applications or other related fields.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Gelatin (type B, G9382, isoelectric point 4.7-5.2), derived from bovine hide with an alkaline hydrolysis process, was purchased from Sigma (USA). The clay (Iaponite, W233) with an average diameter of 25 nm was kindly supplied by Weipu Co. Ltd. (China) and its chemical compositions are SiO₂ 55~57%, MgO 23.5~25.0%, Na₂O 2.8~3.8%, Li₂O 1.2~1.5%, F 5~5.8%. Calcium chloride and other reagents were analytical grade.

INTRODUCERE

În ultimii ani, s-au depus eforturi considerabile pentru dezvoltarea hidrogelurilor pe bază de macromoleculă naturale, întrucât aceste materiale dețin biocompatibilitate, biodegradabilitate și bioactivitate incomparabile, care constituie condiții necesare într-un biosistem. Mai mult, porozitatea controlată, dimensiunea porilor, gradul de degradare, precum și proprietățile mecanice comparabile cu cele ale țesuturilor și răspunsul biologic adecvat obținut de la materialele biocompatibile și biodegradabile sunt esențiale pentru ingineria tisulară [1].

Gelatina, un tip de polipeptidă naturală obținută din collagen, are în compoziția sa 18 aminoacizi cu diferite grupări active precum amino, carboxil, hidroxil și hidroxil fenolice. Aceste grupări secundare oferă gelatinei proprietăți fizice și chimice excelente cum ar fi: capacitatea de a forma pelicule, activitate de suprafață, transformare sol-gel reversibilă, caracter poliamfolit și reactivitate mare [2]. În acest articol s-au propus două materiale biocompatibile, gelatina și argila, pentru prepararea unor hidrogeluri poroase într-un mediu apos. Neimplicând utilizarea solvenților organici, această tehnică poate oferi o modalitate simplă și curată de a realiza suporturi macroporoase pentru utilizări în ingineria tisulară sau în alte domenii conexe.

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Gelatina (tip B, G9382, punct izoelectric 4,7-5,2), obținută din piele bovină printr-un proces de hidroliză alcalină, a fost achiziționată de la Sigma (USA). Argila (Iaponită, W233) cu diametru mediu de 25 nm a fost furnizată de Weipu Co. Ltd. (China), iar compoziția chimică a acesteia este SiO₂ 55~57%, MgO 23,5~25,0%, Na₂O 2,8~3,8%, Li₂O 1,2~1,5%, F 5~5,8%. Clorura de calciu și ceilalți reactivi au fost de calitate analitică.

Fabrication Process

Procesul de fabricare

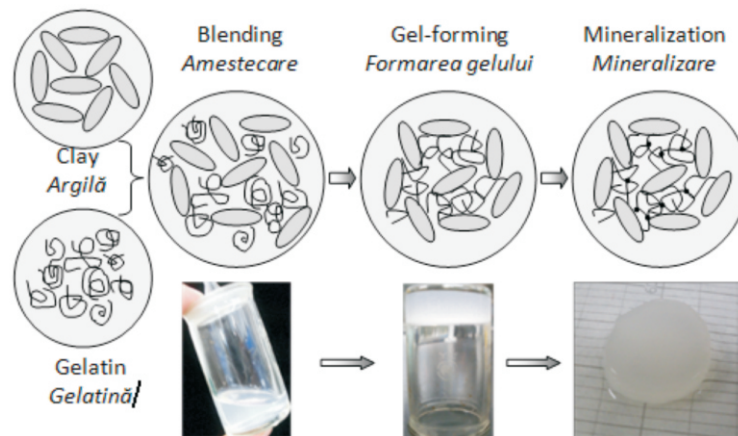


Figure 1. Schematic diagram for fabrication of gelatin-based hydrogels
 Figura 1. Diagrama schematica pentru fabricarea hidrogelurilor pe baza de gelatina

As schematically illustrated in Figure 1, the preparation for gelatin-based hydrogels consisted of three procedures: blending, gel-forming and mineralization. The operations were as follows. Firstly X g ($X=0.2, 0.3, 0.4$ and 0.5 , respectively) gelatin was dissolved in 5 ml deionized water at 50°C for 2 h to get solution a, and 0.2 g clay was dispersed in another 5 ml deionized water at 25°C with rapid agitation to get solution b. Next, the two solutions were blended with agitation, and the blends turned into a translucent sol after high-speed shear-stirring for about 5 min. Thereafter, the composite sol was poured into a cylinder mold ($\Phi 3 \times 4 \text{ cm}$) and then exposed to a cryogenic environment at -20°C for 24 h to obtain hydrogels with physical cross-linking. Finally, the hydrogel was soaked in a 0.5 M CaCl_2 solution for 48 h, getting the final product.

Characterization

A SPM-9600 atomic force microscope (Shimadzu, Japan) was used to examine the microstructure change of the hydrogel at each procedure of fabrication. The IR spectra of lyophilized pure gelatin and final products were obtained on KBr pellet and performed on an MAGNA IR560 spectrophotometer (Nicolet, USA). The thermal stability of lyophilized pure gelatin and the hydrogel were assessed with DSC-60 (Shimadzu, Japan) over a temperature range of $30\text{--}200^{\circ}\text{C}$. X-ray diffraction curves for clay and hydrogels were recorded at $2^{\circ}/\text{min}$ between 3° and 55° on a X'Pert Pro X-ray diffractometer

După cum ilustrează Figura 1, prepararea hidrogelurilor pe bază de gelatină a constat în trei proceduri: amestecare, formarea gelului și mineralizare. Operațiunile s-au desfășurat astfel: mai întâi s-au dizolvat X g ($X=0,2, 0,3, 0,4$, respectiv $0,5$) de gelatină în 5 ml de apă deionizată la 50°C timp de 2 h pentru a obține soluția a, și s-au dizolvat 0,2 g argilă în alte 5 ml de apă deionizată la 25°C cu agitare rapidă pentru a obține soluția b. Apoi, cele două soluții s-au amestecat prin agitare, și s-au transformat în sol translucid după agitare la viteză mare timp de aproximativ 5 min. După aceea, s-a turnat solul compozit într-o formă cilindrică ($\Phi 3 \times 4 \text{ cm}$) și apoi a fost expus la un mediu criogenic la -20°C timp de 24 h pentru a obține hidrogeluri prin reticulare fizică. În cele din urmă, hidrogelul a fost înmuiat într-o soluție de $0,5 \text{ M CaCl}_2$ timp de 48 h, obținând astfel produsul final.

Caracterizare

S-a utilizat un microscop de forță atomică A SPM-9600 (Shimadzu, Japonia) pentru a examina modificările microstructurii hidrogelului în cadrul fiecărei proceduri de fabricare. Spectrele IR ale gelatinei pure liofilizate și ale produselor finale au fost obținute pe pastile de KBr și au fost efectuate cu un spectrofotometru MAGNA IR560 (Nicolet, SUA). Stabilitatea termică a gelatinei pure liofilizate și a hidrogelului a fost determinată cu aparatul DSC-60 (Shimadzu, Japonia) într-un interval de temperatură de $30\text{--}200^{\circ}\text{C}$. S-au înregistrat curbele rezultate în urma difracției cu raze X pentru argilă și hidrogeluri la $2^{\circ}/\text{min}$

(Philips, Netherlands) using CuK α radiation ($\gamma=0.154$ nm) at a voltage of 40kV and a current of 35 mA. The cross-sections in matrixes were observed with a JSM-5900 scanning electron microscope (Philips, Netherlands) to get the microstructure of pores. Then an image analyzer program (Photoshop CS 8.0, Adobe) was used to obtain the top view of the voids in SEM images, in which at least 55 pores were measured to obtain the average diameter. The solvent replacement method was used for porosity measurements [3]. The sample was equilibrated in deionized water for 1 h and weighed before being maintained at 37°C and 40% relative humidity in an incubator (MJ-160B-II, Shanghai). The water evaporation rate was measured by weighing the sample at consecutive intervals. The percentage weight remaining (WR) of composite was calculated by:

$$WR (\%) = \frac{W_r}{W_i} \times 100\% \quad (1)$$

where W_i is the initial weight of wet gels, and W_r is the weight of material at each interval time.

între 3° și 55° cu un difractometru de raze X, X'Pert Pro (Philips, Olanda) utilizând radiația CuK α ($\gamma=0,154$ nm) la un voltaj de 40kV și un curent de 35 mA. S-au observat secțiunile transversale ale matricelor cu un microscop electronic cu baleiaj JSM-5900 (Philips, Olanda) pentru a obține microstructura porilor. Apoi s-a utilizat un program de analiză a imaginii (Photoshop CS 8.0, Adobe) pentru a obține imagini SEM cu vedere de sus a porilor, în care s-au măsurat cel puțin 55 de pori pentru a obține diametrul mediu. Pentru măsurarea porozității s-a utilizat metoda de înlocuire a solventului [3]. Proba s-a adus la echilibru în apă deionizată timp de 1 h și s-a cântărit înainte, fiind menținută la 37°C și 40% umiditate relativă într-un incubator (MJ-160B-II, Shanghai). Gradul de evaporare a apei a fost măsurat prin cântărirea probei la intervale consecutive. Procentul de greutate rămasă (WR) a compozitului s-a calculat prin:

unde W_i este greutatea inițială a gelurilor umede, iar W_r este greutatea materialului în fiecare interval de timp.

RESULTS AND DISCUSSION

Fabrication Precision

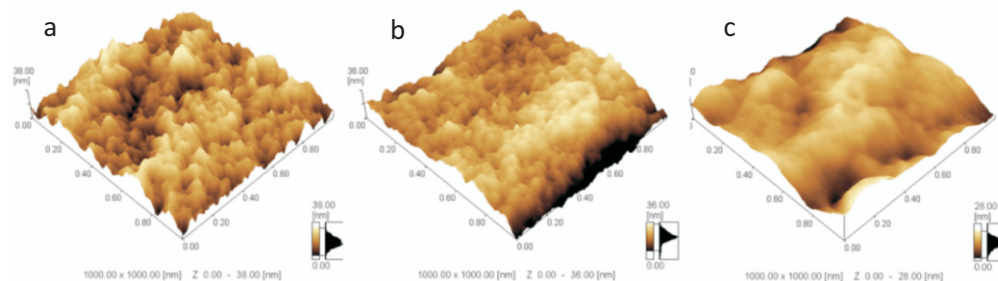


Figure 2. AFM images of the composites during the fabrication process (a, b and c for the composites containing 2% gelatin and 2% clay at the end of each step)
 Figura 2. Imagini AFM ale compozitelor în timpul procesului de fabricare (a, b și c pentru compozitele care conțin 2% gelatină și 2% argilă la sfârșitul fiecărei etape)

The composite hydrogels were prepared with three procedures including blending, gel-forming and mineralization. The micro-morphology of the composite at the end of each step was observed by AFM and shown in Figure 2. During the blending, gelatin molecules combined with clay molecules to form multi-dispersed amorphous matter (Figure 2a).

Precizia procesului de fabricare

S-au pregătit hidrogelurile compozite utilizând trei proceduri, și anume: amestecarea, formarea gelului și mineralizarea. Micro-morfologia compozitelor la finalul fiecărei etape a fost observată prin microscopie de forță atomică (AFM) și este prezentată în Figura 2. În timpul amestecării, moleculele de gelatină s-au combinat cu moleculele de argilă pentru a forma o materie amorfă

While in the following two steps, the composite presented a more smoother and homogenous surface (Figure 2b, 2c), which suggested the gelatin molecules may interpenetrate into the interlayer region of clay molecules to obtain uniform composite.

The laponite clay has a layer structure, which, in dispersion in water, is in the form of disc-shaped crystals. The crystals become arranged into stacks which were held together electrostatically by sharing of sodium ions in the interlayer region between adjacent crystals. As indicated in Figure 3, although the 2θ had slight decrease from 28.35° to 23.83° , the XRD curve for the final composite had similar pattern to that for the clay of non-crystal properties. These data demonstrated that the gelatin molecules did not destroy the platelets of the clay except increasing their distance by intercalating into the interlayer space and forming a heterogeneous network.

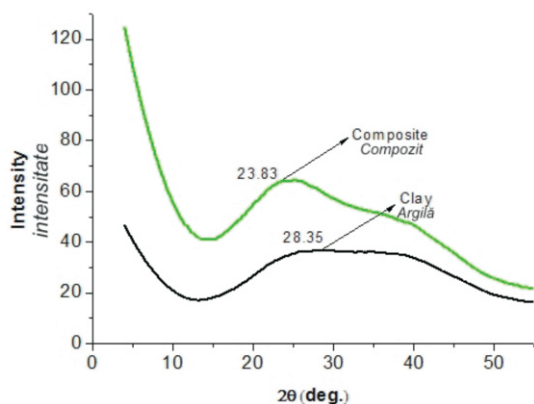


Figure 3. XRD patterns of clay and the composite (both gelatin and clay content as 2%)

Figura 3. Curbe XRD pentru argilă și compozit (ambele conțin 2% gelatină și argilă)

multi-dispersa (Figura 2a). În următoarele două etape, compozitul a prezentat o suprafață mai netedă și mai omogenă (Figura 2b, 2c), ceea ce sugerează că moleculele de gelatină pot pătrunde în regiunea stratului intermediar al moleculelor de argilă pentru a obține un compozit uniform.

Laponita are o structură stratificată, care, în dispersie apoasă, se prezintă ca niște cristale sub formă de disc. Cristalele se aranjează în straturi unite electrostatic prin intermediul ionilor de sodiu. După cum indică Figura 3, deși 2θ a scăzut ușor de la $28,35^\circ$ la $23,83^\circ$, curba XRD a compozitului final a avut o alură asemănătoare cu cea a argilei cu proprietăți non-cristaline. Aceste date au demonstrat că moleculele de gelatină nu au distrus discurile de argilă, ci doar au mărit distanța dintre acestea prin intercalarea în spațiul stratului intermediar și formarea unei rețele eterogene.

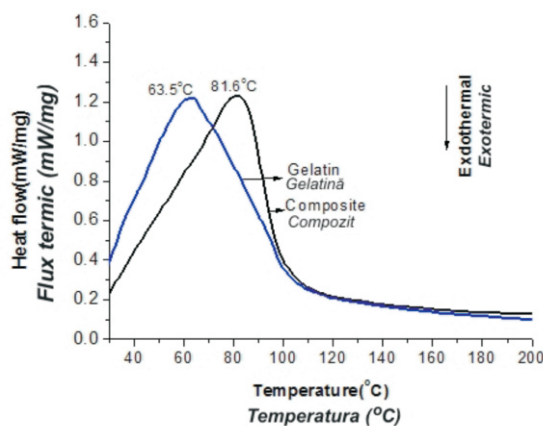


Figure 4. DSC thermographs of gelatin and the composite with 2% gelatin and 2% clay
Figura 4. Termograme DSC pentru gelatină și compozit cu 2% gelatină și 2% argilă

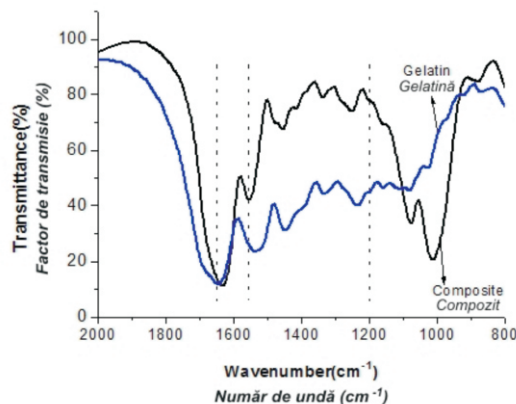


Figure 5. IR spectra of gelatin and the composite (both gelatin and clay content as 2%)

Figura 5. Spectre IR pentru gelatina și compozit (ambele conțin 2% gelatină și argilă)

Figure 4 shows the DSC thermographs of the gelatin and hydrogel. The two curves were similar with only one endothermic peak associated to the helix-coil transition of gelatin, which was the denaturation temperature (T_d). In theory, crosslinking degree increases the thermal stability of gelatin, as shown by the shift of the T_d to higher values. In addition, it is generally accepted that the endothermic process present in the DSC thermogram of collagenous materials involves rupture of hydrogen bonds and a rearrangement of the triple helix into a random configuration. On the other hand, the increased thermal stability exhibited by gelatin, has been ascribed to the presence of crosslinking, which breaks exothermically. The T_d of the composite rose by 18°C compared with the gelatin, which indicated that there was interaction between the gelatin and clay.

Gelatin is characterized by the amides of protein, IR spectra of which are located on two regions with amide I (anti-symmetric carboxylate absorbance or C=O stretching vibration) and amide II bands (C-N stretching vibration or N-H bending vibration). In this respect, the IR spectra for the hydrogel and gelatin were presented in Figure 5. Compared with gelatin, the amide peak of hydrogels hold a shift to higher wavenumber, to be specific, the spectra of $\delta(\text{NH}_2)$ at 1537 and 1235 cm^{-1} disappeared while the spectra of $\delta(\text{NH}_3^+)$ at 1553 and 1251 cm^{-1} emerged, indicating that the $-\text{NH}_2$ in the gelatin was protonized in the fabrication process. Besides another significant change from 1645 to 1632 cm^{-1} , attention was attracted by the $1460\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$ region, since certain differences can be seen in it: characteristic for the gelatin is at 1450 cm^{-1} with a shoulder at 1390 cm^{-1} ; for the hydrogel, a doublet at 1454 and 1417 cm^{-1} with a shoulder at 1473 cm^{-1} . It is well known, in the spectral region considered, the bands of the deformation vibrations of $-\text{C}-\text{H}$ groups and the symmetrical stretching vibrations of $-\text{C}-\text{O}$ groups of ionized $-\text{COO}^-$ groups appeared, the latter of which might be helpful for the formation of coordinate bonding. Otherwise, the characteristic absorption peaks of Si-O tetrahedron at 1013 cm^{-1} was found in the spectra of the composite, indicating the presence of silicate clay in the hydrogels.

As mentioned above, the formation of $-\text{NH}_3^+$ and $-\text{COO}^-$ was demonstrated by IR analyses. Also, the gelatin molecules interpenetrated into the interlayer region in the laponite clay forming a multiphase network. These results were available to elaborate the

Figura 4 prezintă termogramele DSC pentru gelatină și hidrogel. Cele două curbe au fost asemănătoare cu un singur pic endotermic asociat tranziției helix-ghem a gelatinei, care a fost temperatura de denaturare (T_d). Teoretic, gradul de reticulare crește stabilitatea termică a gelatinei, așa cum arată deplasarea T_d spre valori mai mari. În plus, se acceptă în general că procesul endotermic prezent în termograma DSC a materialelor colagenice implică ruperea legăturilor de hidrogen și rearanjarea triplului helix într-o configurație aleatorie. Pe de altă parte, stabilitatea termică crescută a gelatinei a fost atribuită prezenței legăturilor încrucișate, care se rup exotermic. T_d a compozitului a crescut cu 18°C în comparație cu cea a gelatinei, ceea ce a indicat că a existat o interacțiune între gelatină și argilă.

Gelatina este caracterizată de amidele proteinei, ale cărei spectre IR sunt localizate în două regiuni cu benzile amidă I (absorbanță carboxilat antisimetrică sau vibrația de întindere C=O) și amidă II (vibrația de întindere C-N sau vibrația de îndoire N-H). În acest sens, spectrele IR pentru hidrogel și gelatină sunt prezentate în Figura 5. În comparație cu gelatina, picurile amidă ale hidrogelurilor se deplasează spre numere de undă mai mari, mai exact, spectrele $\delta(\text{NH}_2)$ de la 1537 și 1235 cm^{-1} dispar, în timp ce apar spectrele $\delta(\text{NH}_3^+)$ de la 1553 și 1251 cm^{-1} , indicând faptul că $-\text{NH}_2$ din gelatină a fost protonizat în procesul de fabricare. În afară de o modificare semnificativă de la 1645 la 1632 cm^{-1} , atenția s-a îndreptat spre regiunea de la $1460\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$, întrucât aici se pot observa anumite diferențe: picul caracteristic pentru gelatină se situează la 1450 cm^{-1} cu un umăr la 1390 cm^{-1} ; pentru hidrogel, un dublet la 1454 și 1417 cm^{-1} cu un umăr la 1473 cm^{-1} . Este binecunoscut faptul că, în regiunea spectrală luată în considerare, apar benzile de vibrații de deformare ale grupărilor $-\text{C}-\text{H}$ și vibrațiile de întindere simetrice ale grupărilor $-\text{C}-\text{O}$ ale grupărilor ionizate $-\text{COO}^-$, cele din urmă putând ajuta la formarea legăturilor coordinative. Altfel, picurile de absorbție caracteristice ale tetraedrului Si-O la 1013 cm^{-1} au fost găsite în spectrele compozitului, indicând prezența silicaturii în hidrogeluri.

După cum am menționat mai sus, formarea $-\text{NH}_3^+$ și $-\text{COO}^-$ a fost demonstrată prin analize IR. De asemenea, moleculele de gelatină s-au întrepătruns în regiunea stratului intermediar al laponitei formând o rețea multifazică. S-au utilizat aceste rezultate pentru elaborarea procesului de fabricare a hidrogelurilor pe

fabrication process of the gelatin-based hydrogels. The laponite clay consists of the platelets tightly bound together, which might be exfoliated and dispersed homogeneously in a solution by absorbing water into interlayer region. In this study, the clay was firstly dispersed in water with rapid agitation, the interlayer surface of which had a negative charge. After high shear blending, the gelatin in the mixture (pH = 8.5, higher than that of the gelatin) also had a negative charge, resulting in a polydispersed composite at the end of the first procedure, "blending". Because of small localized positive charges at the edges of the interlayer of the clay generated by absorption of hydroxyl groups, gelatin could interpenetrate into the interlayer region by electrostatic forces in the following cryogenic processing. In the final calcium mineralization step, some $-NH_2$ groups in the gelatin turned into $-NH_3^+$ in the presence of calcium chloride, imparting gelatin partial cationic charge, which may be helpful for the electrostatic bonding between the platelets of the clay and the gelatin. Otherwise, calcium ion may suppress the electric double layer surrounding the platelets of the clay and cause the flocculation of the clay, which leads to the strengthened interactions between the clay and the gelatin by shortening their distance. Furthermore, calcium ion could form coordinate or ionic linkage between gelatin and gelatin, as well as gelatin and clay, which ultimately intensified the crosslinking and stability of the whole system.

Effect of the Gelatin Content on the Micro-morphology

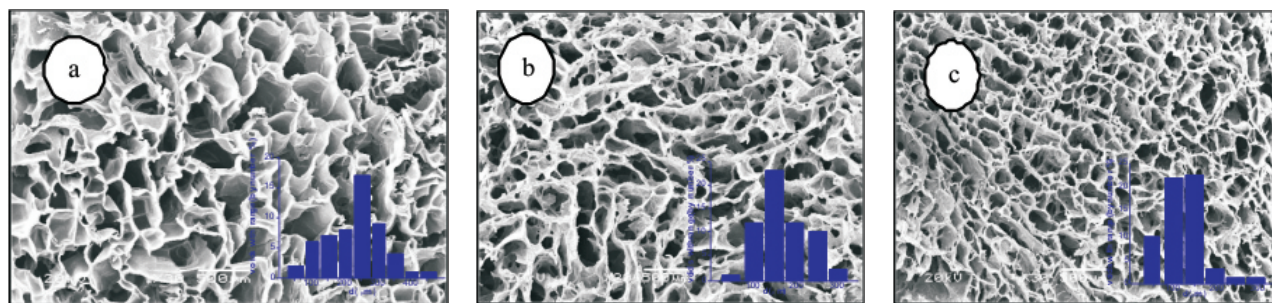


Figure 6. SEM images of the porous hydrogels (gelatin content as a, 3%; b, 4%; c, 5%; clay content as 2%)

Figura 6. Imagini SEM ale hidrogelurilor poroase (conținutul de gelatină: a - 3%, b - 4%, c - 5%; conținutul de argilă 2%)

Three types of hydrogels with different gelatin content were prepared and their SEM images and the

bază de gelatină. Laponita constă din discuri legate strâns, care se pot exfolia și dispersa omogen într-o soluție prin absorbția de apă în regiunea stratului intermediar. În acest studiu, argila a fost mai întâi dispersată în apă prin agitare rapidă, suprafața stratului intermediar având o sarcină negativă. După amestecare cu forță de forfecare mare, gelatina din amestec (pH = 8,5, mai mare decât cel al gelatinei) a avut o sarcină negativă, având ca rezultat un compozit polidispers la finalul primei proceduri de „amestecare”. Din cauza sarcinilor pozitive mici localizate la marginile stratului intermediar al argilei, generate de absorbția grupelor hidroxil, gelatina a putut întrepătrunde în regiunea stratului intermediar prin forțele electrostatice la prelucrarea criogenică ulterioară. În etapa finală de mineralizare cu calciu, unele grupări $-NH_2$ din gelatină s-au transformat în $-NH_3^+$ în prezența clorurii de calciu, conferind gelatinei o încărcare cationică parțială, care ar putea fi utilă pentru formarea de legături electrostatice între discurile de argilă și gelatină. În caz contrar, ionul de calciu poate suprima stratul electric dublu din jurul discurilor din argilă și poate provoca flocularea argilei, ceea ce duce la interacțiuni consolidate între argilă și gelatină prin scurtarea distanței dintre acestea. În plus, ionul de calciu poate forma legături coordinative sau ionice între gelatină și gelatină, precum și între gelatină și argilă, ceea ce a intensificat, în cele din urmă, reticularea și stabilitatea întregului sistem.

Influența conținutului de gelatină asupra micro-morfologiei

S-au pregătit trei tipuri de hidrogeluri cu conținut diferit de gelatină, iar imaginile lor SEM și distribuția

pore size distribution were displayed in Figure 6. The average pore diameter was calculated and shown in Table 1. As indicated, both the porosity and the pore size decreased with an increasing content of gelatin in the hydrogels. There are two possible explanations for the observed findings. First, a higher gelatin concentration could result in an increasing growth rate of nucleation in the composites of gelatin and silicate and thus in a higher amount of pores. Nucleation depends on the instability of the liquor phase as well as the diffusion of atoms into clusters, the former increases with decreasing of temperature, and the latter increases with increasing of temperature. Higher gelatin content resulted in a decrease of the freezing temperature of the solvent. As a result, the mobility of the atoms to diffuse into clusters was higher, and the nucleation rate increased. Second, by comparison of the gelatin content, the more concentrated materials could possess a decreased heat and protein transfer and thus result in smaller pores. A combination of both is likely the most plausible explanation.

mărimii porilor sunt prezentate în Figura 6. S-a calculat diametrul mediu al porilor, care este prezentat în Tabelul 1. După cum s-a indicat, atât porozitatea, cât și mărimea porilor au scăzut la un conținut mare de gelatină în hidrogeluri. Există două explicații posibile pentru constatările observate. În primul rând, o concentrație mai mare de gelatină ar putea conduce la o rată de creștere tot mai mare a nucleației în compozitele de gelatină și silicat și, astfel, la o cantitate mai mare de pori. Nucleația depinde de instabilitatea fazei lichide, precum și de difuzia atomilor în grupuri; prima crește odată cu scăderea temperaturii, iar cea din urmă crește odată cu creșterea temperaturii. Conținutul mai mare de gelatină a dus la o scădere a temperaturii de congelare a solventului. Ca urmare, mobilitatea atomilor de a difuza în grupuri a fost mai mare, iar rata de nucleație a crescut. În al doilea rând, prin compararea conținutului de gelatină, materialele mai concentrate ar putea deține un transfer de căldură și de proteine scăzut și, astfel, rezultă pori mai mici. Cea mai plauzibilă explicație este probabil o combinație a celor două.

Table 1: The morphological properties of porous gelatin-based hydrogels
Tabelul 1: Proprietățile morfologice ale hidrogelurilor poroase pe bază de gelatină

Sample Probă	a	b	c
Clay content (w/v) Conținut argilă (m/v)	2%	2%	2%
Gelatin content (w/v) Conținut gelatină (m/v)	3%	4%	5%
Porosity Porozitate	87.21±3.7%	86.24±3.1%	85.23±1.9%
Average pore diameter* Diametru mediu al porilor*	249±16μm	192±21μm	146±10μm

*At least 55 pores were assessed and the values were statistically analyzed and also expressed as the mean ± standard deviation.

*S-au evaluat cel puțin 55 de pori, iar valorile au fost analizate statistic și exprimate ca ± abatere standard medie.

Figure 6 also demonstrated the morphology of the pores in the gelatin-based hydrogels. The pores were interconnecting in the four hydrogels, and their average size decreased with the rising gelatin content in the gels. Furthermore, in this material containing 5% gelatin, the pore volume ranged from 50-350 μm, focusing on a range of 100-200 μm. Such pore size and matrix structure are coincidentally preferred by biomaterials [4], since gradient through this kind of matrix can help oxygen and nutrients diffuse to the cells, and waste products to drain out of the matrix,

Figura 6 a demonstrat, de asemenea, morfologia porilor în hidrogelurile pe bază de gelatină. Porii s-au interconectat în cele patru hidrogeluri, iar dimensiunea medie a acestora a scăzut odată cu creșterea conținutului de gelatină din gel. În plus, în acest material care conține 5% gelatină, volumul porilor a variat între 50-350 μm, cu accentul pe intervalul 100-200 μm. Astfel de dimensiuni ale porilor și structură a matricei sunt întâmplător preferate de biomateriale [4], deoarece gradientul prin acest tip de matrice poate ajuta oxigenul și substanțele nutritive să difuzeze în celule și deșeurile să se scurgă

whereas the pore interconnectivity can promote cell migration and angiogenesis.

Effect of the Gelatin Content on the Solvent Evaporation Rate

The weight of the hydrogels was determined at different time intervals when exposed to a condition of 37°C and 40% relative humidity. The weight of the material decreased linearly in the initial 2.5 h, while gently lowered with the prolonged time (Figure 7). Additionally, the evaporation rate of water slowed with the rising gelatin content. The total volume of the liquid absorbed by gel consists of the solvating solvent bound to polymer network and the capillary solvent filling macropores which can evaporate easier. There was more water absorbed in the large amount of microscopic subunits in the hydrogel with 5% gelatin, resulting in the slowest water evaporation. In addition, the water content in such matrix could be retained higher than 75% even if after 24 h in this case. It is reported that a commercially available dressing loses about 50% of its bound water after 12 h and retains about 30% water after 24 h. Therefore the gelatin-based hydrogels could be considered as a potential wound dressing because they could provide a fine moist environment for healing wound surface [5].

afară din matrice, iar interconectivitatea porilor poate promova migrarea celulelor și angiogeneza.

Influența conținutului de gelatină asupra gradului de evaporare a solventului

Greutatea hidrogelurilor s-a determinat la diferite intervale de timp când acestea au fost expuse la o temperatură de 37°C și umiditate relativă de 40%. Greutatea materialului a scăzut liniar în primele 2,5 h, și a scăzut ușor în timp (Figura 7). În plus, gradul de evaporare a apei s-a micșorat odată cu creșterea conținutului de gelatină. Volumul total al lichidului absorbit de gel constă din solventul de dizolvare legat la rețeaua polimerică și solventul capilar ce umple macroporii care se pot evapora ușor. S-a absorbit mai multă apă în cantitatea mare de subunități microscopice din hidrogelul cu 5% gelatină, având ca rezultat cea mai lentă evaporare a apei. În plus, conținutul de apă într-o astfel de matrice poate fi menținut peste 75%, chiar și după 24 h în acest caz. S-a raportat că un pansament disponibil în comerț pierde circa 50% din apa legată după 12 h și reține circa 30% apă după 24 de ore. Prin urmare, hidrogelurile pe bază de gelatină pot fi considerate un potențial pansament pentru răni, deoarece pot oferi un mediu umed pentru vindecarea rănilor de suprafață [5].

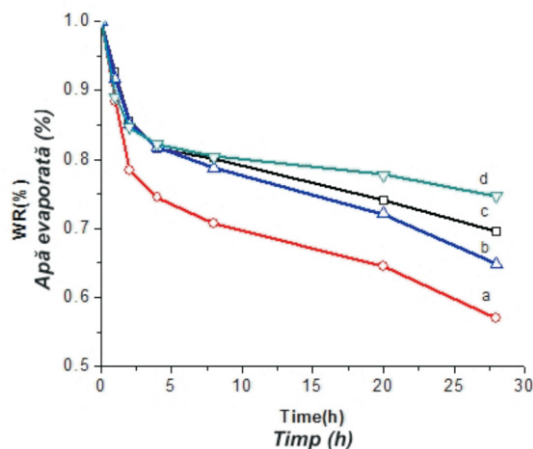


Figure 7. Evaporative water losses from the hydrogels (gelatin content as a, 2%; b, 3%; c, 4%; d, 5%; clay content as 2%)
 Figura 7. Apa evaporată din hidrogeluri (conținut gelatină: a - 2%, b - 3%, c - 4%, d - 5%; conținut argilă 2%)

CONCLUSIONS

An aqueous system was proposed and confirmed for preparing porous hydrogels with gelatin and laponite clay. The fabrication was identified as blending, gel-forming and mineralization three steps. The pore morphology, the pore size and the water evaporation rate could be easily controlled by varying the gelatin content. The hydrogel, consisting of 5% gelatin and 2% clay, had interconnecting pores with size focusing on a range of 100-200 μm , which would be available as scaffolds and wound dressings. This approach offers the advantage of fabricating the hierarchical organization of organic/inorganic components without using organic solvents and could be extended to develop new porous materials for a wide range of technological applications.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministry of Science and Technology of China for financial support of the cooperation project (No.2009DFA42850 and No. 40-3).

CONCLUZII

S-a propus și confirmat un sistem apos pentru pregătirea unor hidrogeluri poroase cu gelatină și argilă de tip laponită. Procesul de fabricare s-a desfășurat în trei etape: amestecare, formarea gelului și mineralizare. Morfologia porilor, dimensiunea porilor și gradul de evaporare a apei pot fi controlate cu ușurință prin variația conținutului de gelatină. Hidrogelul, constând din 5% gelatină și 2% argilă, are porii interconectați cu dimensiuni în intervalul 100-200 μm și poate fi realizat sub formă de suport și pansament. Această abordare oferă avantajul fabricării componentelor organice/anorganice organizate ierarhic fără a utiliza solvenți organici și s-ar putea extinde în vederea dezvoltării unor noi materiale poroase pentru o gamă largă de aplicații tehnologice.

Mulțumiri

Autorii doresc să mulțumească Ministerului Științei și Tehnologiei din China pentru susținerea financiară a proiectului de cooperare (nr. 2009DFA42850 și nr. 40-3).

REFERENCES

1. Barbetta, A. et al., "Porous gelatin hydrogels by gas-in-liquid foam templating", *Soft Matter*, **2010**, 6, 8, 1785-1792.
2. Bigi, A. et al., "Relationship between triple helix content and mechanical properties of gelatin films", *Biomaterials*, **2004**, 25, 25, 5675-5680.
3. Lai, J.Y., Li, Y.T., "Functional assessment of cross-linked porous gelatin hydrogels for bioengineered cell sheet carriers", *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 5, 1387-1397.
4. Vlierberghe, S.V. et al., "Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis", *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 2, 331-337.
5. Mu, C.D. et al., "Collagen cryogel cross-linked by dialdehyde starch", *Macromol. Mater. Eng.*, 2010, 295, 2, 100-107.