

DOSE-DEPENDENT EFFECTS OF GAMMA IRRADIATION ON COLLAGEN IN VEGETABLE TANNED LEATHER BY MOBILE NMR SPECTROSCOPY

STUDIUL EFECTULUI DOZEI DE RADIAȚII GAMMA ASUPRA COLAGENULUI DIN PIELEA TĂBĂCITĂ VEGETAL UTILIZÂND SPECTROSCOPIA RMN

Claudiu ȘENDREA^{1,2*}, Elena BADEA^{1,3}, Ioana STĂNCULESCU^{4,5}, Lucreția MIU¹, Horia IOVU²

¹National Research and Development Institute for Textile and Leather (INCDTP), ICPI Division, Ion Minulescu 93, 031215 Bucharest, Romania

²Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, University Politehnica of Bucharest, 1-7 Polizu Str., 011061 Bucharest, Romania

³Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Craiova, 107 Calea Bucuresti, 200512 Craiova, Romania

⁴Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering (HH-IFIN), Radiation Processing Center, Magurele, Romania

⁵University of Bucharest, Department of Physical Chemistry, 4-12 Regina Elisabeta Av., Bucharest, Romania

DOSE-DEPENDENT EFFECTS OF GAMMA IRRADIATION ON COLLAGEN IN VEGETABLE TANNED LEATHER BY MOBILE NMR SPECTROSCOPY

ABSTRACT. The dose dependent effect of gamma irradiation on collagen in vegetable tanned leather was studied by unilateral nuclear magnetic resonance (NMR). Examination of the irradiated samples after 1 week of treatment revealed variations of both spin-lattice (T_1) and spin-spin (T_2) proton relaxation times. To evaluate the long-term effects of gamma irradiation, the irradiated samples were further exposed to accelerated ageing at 40°C and weekly alternate 30% and 75% relative humidity (RH) for 12 weeks. The synergistic action of temperature and relative humidity caused distinct variations of both T_1 and T_2 relaxation times suggesting distinct modifications within the collagen fibril structure. Structural variations were attributed to cross-linking, the prevalent pattern at 25 kGy dose, while polypeptide chain scission was shown to be prevailing at higher doses.

KEY WORDS: collagen, vegetable tanned leather, gamma irradiation, unilateral NMR

STUDIUL EFECTULUI DOZEI DE RADIAȚII GAMMA ASUPRA COLAGENULUI DIN PIELEA TĂBĂCITĂ VEGETAL UTILIZÂND SPECTROSCOPIA RMN

REZUMAT. S-a studiat efectul dozei de iradiere gamma asupra colagenului din pielea tăbăcită vegetal prin rezonanță magnetică nucleară unilaterală (RMN). Examinarea probelor iradiate după 1 săptămână de tratament a indicat variații atât ale timpilor de relaxare a protonilor spin-rețea (T_1), cât și a celor spin-spin (T_2). Pentru a evalua efectele pe termen lung ale iradierii gamma, probele iradiate au fost expuse în continuare la îmbătrânire accelerată la 40°C și s-a alternat săptămânal umiditatea relativă (UR) în intervalul 30%-75% timp de 12 săptămâni. Acțiunea sinergică a temperaturii și umidității relative a produs modificări distincte ale timpilor de relaxare T_1 și T_2 , sugerând modificări distincte în structura fibrilelor de colagen. Până la doza de 25 kGy mecanismul predominant a fost reticularea, în timp ce la doze mai mari a predominat scindarea lanțului polipeptidic.

CUVINTE CHEIE: colagen, piele tăbăcită vegetal, iradiere gamma, RMN unilaterală

L'EFFET DE L'IRRADIATION GAMMA SUR LE COLLAGÈNE DU CUIR À TANNAGE VÉGÉTAL EN UTILISANT LA SPECTROSCOPIE RMN

RÉSUMÉ. On a étudié l'effet de la dose d'irradiation gamma sur le collagène du cuir à tannage végétal par la résonance magnétique nucléaire unilatérale (RMN). L'analyse des échantillons irradiés après 1 semaine de traitement a montré des variations des temps de relaxation des protons spin-réseau (T_1) et spin-spin (T_2). Pour évaluer les effets à long terme de l'irradiation gamma, les échantillons irradiés ont été davantage exposés à un vieillissement accéléré à 40°C et on a modifié chaque semaine l'humidité relative (HR) entre 30% à 75% pendant 12 semaines. L'action synergique de la température et l'humidité relative ont produit des changements distincts dans les temps de relaxation T_1 et T_2 , ce qui suggère des changements distincts dans la structure des fibrilles de collagène. À la dose de 25 kGy le mécanisme prédominant était la réticulation, tandis qu'aux doses plus élevées le clivage de la chaîne polypeptidique a été prédominant.

MOTS-CLÉS: collagène, cuir tanné végétal, irradiation gamma, RMN unilatérale

INTRODUCTION

Historical and archaeological leather objects, and artefacts are an infinite source of information of historical and cultural interest; they represent repositories of tangible-intangible cultural heritage

INTRODUCERE

Obiectele istorice și arheologice, precum și artefactele din piele sunt o sursă infinită de informații de interes istoric și cultural; acestea reprezintă depozite inestimabile de valori culturale tangibile și

* Correspondence to: Claudiu ȘENDREA, INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, sector 3, 031215 Bucharest, e-mail: claudiușendrea@yahoo.com

and illustrate the evolution of social customs, habits, aesthetics and technology, but also the perpetuation of popular and religious traditions. It is vital therefore that these materials and artefacts remain well preserved.

Old leather is a biomaterial composed of animal hides that have been chemically treated mainly by tanning to increase chemical and physical durability over time and confer desired handling and working characteristics. The tanning procedure permanently alters the chemical structure of the collagen. The tannin molecules stabilise the collagen matrix by linking to the amino acid chains via hydrogen and/or covalent bonding, depending on the tannin type [1]. The oldest system of tanning relies on the chemical action of vegetable extracts containing tannins, while tanning with chromium salts was introduced at the end of the 19th century. The vegetable tannins are natural polyphenols; the chemical structure of this group of compounds was described by HPLC-ESI-MS/MS method [2]. Tannins act by displacing the hydrogen bonded water on the collagen molecule and consolidating the collagen fibre network of the dermis. By taking up most of the available hydrogen bonding sites of collagen, the tannins promote dehydration and consequently cross-linking, resulting in a material more stable against temperature changes, water resistant, and much more durable than the raw animal hide. However, natural polymers such as collagen are intrinsically degradable. Biodegradation is due to insects and microorganisms like bacteria or fungi for which collagen is an excellent nutrient. Water, oxygen, polluting gases from the atmosphere, acids (e.g. from soil in the case of buried objects or those produced into the leather during its ageing), temperature, and light are aggressive agents inducing structural modification by converting collagen into gelatin and causing polypeptide chain scission. Not rarely biological, physical and chemical deterioration factors synergistically act and accelerate the degradation kinetics. In fact, the variety of biodeterioration phenomena observed on collagen materials of cultural heritage is determined

intangibile, ilustrând evoluția cutumelor sociale, a obiceiurilor, esteticii și tehnologiei, dar și perpetuarea tradițiilor populare și religioase. Prin urmare, este esențial ca aceste materiale și obiecte să fie bine conservate și transmise generațiilor viitoare.

Pielea veche este un biomaterial realizat din piei de origine animală care au fost tratate chimic, în principal prin tăbăcire, pentru a le crește durabilitatea chimică și fizică în timp și pentru a le conferi proprietățile tactile și caracteristicile de folosință dorite. Procesul de tăbăcire modifică permanent structura chimică a colagenului. Moleculele taninului stabilizează matricea de colagen prin legarea la lanțurile de aminoacizi prin legături de hidrogen și/sau covalente, în funcție de tipul de tanin [1]. Unul dintre cele mai vechi sisteme de tăbăcire se bazează pe acțiunea chimică a extractelor vegetale care conțin taninuri, în timp ce tăbăcirea cu săruri de crom a fost introdusă ca procedeu de prelucrare a pieilor la sfârșitul secolului al XIX-lea. Taninurile vegetale sunt polifenoli naturali; structura chimică a acestei grupe de compuși poate fi identificată prin metoda HPLC-ESI-MS/MS [2]. Taninul acționează prin deplasarea apei legate prin legături de hidrogen de molecula de colagen și prin consolidarea rețelei de fibre de colagen din dermă. Prin ocuparea celor mai multe poziții disponibile pentru legăturile de hidrogen, tăbăcirea facilitează deshidratarea și în consecință reticularea colagenului, având ca rezultat un material mai stabil la schimbările de temperatură, rezistent la apă și la acțiunea microorganismelor deci mult mai durabil decât pielea brută. Cu toate acestea, polimerii naturali precum colagenul sunt materiale supuse proceselor de biodegradare. Biodegradarea se datorează insectelor și microorganismelor cum ar fi bacteriile sau fungii. Pentru acestea, colagenul este un nutrient excelent. Apa, oxigenul, gazele poluante din atmosferă, acizii (de exemplu, acizii din sol în cazul obiectelor îngropate, sau cei produși în piele în timpul îmbătrânirii), temperatura și lumina sunt agenți agresivi care induc modificări structurale prin transformarea colagenului în gelatină și care provoacă scindarea lanțurilor polipeptidice. Nu rareori factorii de deteriorare biologică și fizico-chimică acționează sinergic accelerând viteza de degradare. De fapt, varietatea fenomenelor de biodegradare observate

by several factors, such as the chemical composition and nature of the material itself, the climate and exposure of the object, in addition to the manner and frequency of surface cleaning and housekeeping in museums, archives and libraries. The degradation of leather, which is mainly composed of collagen, is in fact a complex process, which involves the chemical oxidative deterioration of amino acid chains and hydrolytic cleavage of the peptide structure.

Different methods against biodeterioration have been established and used, especially those based on antifungal and antibacterial products, either synthetic or natural, as well as on anoxic treatments and fumigation with gases (e.g. ethylene oxide). Recently, due to a number of advantages, gamma irradiation was taken in consideration as a low-cost method for mass disinfections and conservation purposes. For example, gamma irradiation treatment associates no risk for the operator, restorer, curator, visitor, or environment; no toxic or radioactive residues remain in the treated item; excellent efficiency is extended to the whole inner volume based on the excellent penetration of gamma radiation; large amounts of objects can be treated simultaneously in a short time [3]. This treatment, however, may affect the structural and mechanical properties of materials because the dose required to annihilate the microorganisms is rather high. Therefore, a systematic research is needed to investigate the effects of gamma irradiation on collagen materials.

The present investigation has been undertaken with the object of obtaining new information on the effect of gamma irradiation on collagen in vegetable tanned leather. Such information, besides being of theoretical interest, is of practical importance with respect to the increasing use of ionizing radiation for the treatment of historical collagenous materials such as leather, parchment, bones and mummies. So far, only few studies concerning the effect of gamma irradiation on fibrillar collagen from bone and rat-tail tendon were reported [4-6]. Recently the

la materialele colagenice din patrimoniul cultural este determinată de mai mulți factori, cum ar fi compoziția chimică și natura materialului însuși, microclimatul în care au fost depozitate și/sau expuse, precum și modul și frecvența de curățare superficială și eventualele tratamente de conservare aplicate. Degradarea pielii, care este compusă în principal din collagen, este un proces complex, care implică deteriorarea oxidativă a lanțurilor de aminoacizi și scindarea hidrolitică a structurii peptidice.

De-a lungul timpului au fost utilizate diferite mijloace de combatere a biodegradării, în special cele bazate pe utilizarea produselor antifungice și antibacteriene, sintetice sau naturale, precum și tratamentele anoxice și de fumigație cu gaze (de exemplu, oxid de etilenă). Ca urmare a unei serii de avantaje, iradierea cu radiații gamma a fost recent reconsiderată, aceasta fiind o metodă necostisitoare, adecvată pentru decontaminarea în masă a colecțiilor. De exemplu, tratamentul prin iradiere gamma nu se asociază cu riscuri pentru operatori, restauratori, curatori, vizitatori sau pentru mediul înconjurător; nu produce reziduuri toxice sau radioactive în elementul tratat; tratamentul este eficient în întregul volum datorită capacității de penetrare a radiațiilor gamma; cantități mari de obiecte pot fi tratate simultan; timpul de tratare este scurt [3]. Acest tratament poate însă afecta proprietățile structurale ale materialelor, doza necesară pentru a anihila fungi, bacterii, larve, insecte fiind relativ ridicată. De aceea, este necesară o cercetare minuțioasă a efectelor iradierii cu radiații gamma asupra materialelor pe bază de collagen precum pielea și pergamentul.

Rezultatele ce vor fi prezentate în această lucrare fac parte dintr-un studiu amplu al cărui scop constă în obținerea de noi informații privind efectul radiațiilor gamma asupra collagenului din pielea tăbăcită vegetal. Astfel de informații, pe lângă faptul că sunt de mare interes teoretic, au și o importanță practică în ceea ce privește utilizarea tot mai frecventă a radiațiilor ionizante pentru decontaminarea materialelor colagenice istorice, cum ar fi pielea, pergamentul, oasele și mumiile. Până în prezent, au fost raportate doar câteva studii privind efectul

gamma irradiation effects on the colour and texture of parchment documents was reported and the maximum gamma radiation dose (D_{max}) that could guarantee parchment documents decontamination treatment, without significant alteration of their physical properties was estimated [7]. However, no studies on collagen in leather have yet been reported. The present work focused on the dose-dependent effect of gamma irradiation on collagen in leather obtained by tanning calf hides with condensed tannins (i.e. quebracho wood and mimosa bark commercial extracts). Moreover, the leather samples exposed to irradiation were then subjected to accelerated ageing to explore the long-term effect of gamma irradiation, too. Some of us have reported that denaturation of collagen induces modifications of the structure that can be followed by proton relaxation time determination [8, 9]. This paper presents both T_1 relaxation time, also called spin-lattice, and T_2 spin-spin relaxation time measured by the unilateral Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique, to evaluate the dose dependences of structural changes occurring in collagen within short- and long-time periods after gamma irradiation treatment. For this purpose, the irradiated leather samples were exposed to accelerated ageing at 40°C and weekly alternate 30% and 75% relative humidity (RH) for 12 weeks.

This is the very first time when unilateral NMR is applied to achieve a characterisation of the effect of gamma irradiation on molecular water-collagen interaction in vegetable tanned leather.

EXPERIMENTAL

Materials

New vegetable tanned leathers were prepared from calf hides with mimosa-bark and quebracho-wood commercial extracts using a method based on a traditional recipe [10] developed at the National Research and Development Institute for Textile and

iradierii cu radiații gamma asupra colagenului fibrilar din oase și din tendon (din coadă de șobolan) [4-6]. Recent, s-au raportat efectele iradierii gamma asupra culorii și texturii documentelor pe suport de pergament și s-a estimat doza maximă de radiații gamma (D_{max}), care să garanteze un tratament de decontaminare eficient fără alterarea semnificativă a proprietăților fizice ale documentelor [7]. Cu toate acestea, nu au fost încă raportate studii privind colagenul din pielea tăbăcită. În lucrarea de față s-a urmărit efectul dozei de radiații gamma asupra colagenului din piele de vițel tăbăcită cu taninuri condensate, și anume extracte tanante comerciale de quebracho și mimosa. Mai mult decât atât, probele de piele expuse la iradiere au fost apoi supuse la tratamente de îmbătrânire accelerată (40°C, UR 30% și 75%, alternând săptămânal umiditatea relativă (UR) între 30% și 75%, timp de 12 săptămâni) pentru a explora efectul pe termen lung al iradierii. Unii dintre autorii lucrării au arătat că denaturarea colagenului în pergament și piele induce modificări ale structurii care pot fi relevate prin determinarea timpului de relaxare a protonilor apei legate din structura acestor materiale [8, 9]. Lucrarea de față prezintă variația valorilor timpului de relaxare spin-rețea, T_1 , și a timpului de relaxare spin-spin, T_2 , măsurați prin tehnica de rezonanță magnetică nucleară (RMN) unilaterală, în funcție de doza de radiații gama aplicată și de efectul tratamentului de îmbătrânire artificială.

Acesta este primul studiu bazat pe utilizarea tehnicii de RMN unilaterală în vederea caracterizării efectului radiațiilor gamma asupra interacțiunii apă-colagen la nivel molecular în pielea tăbăcită vegetal.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Materiale

S-au realizat piei noi de vițel tăbăcite vegetal cu extracte comerciale de mimosă și quebracho folosind o metodă bazată pe rețete tradiționale [10] pusă la punct la Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Textile și Pielărie, Sucursala ICPI, București. Probele de

Leather, ICPI Division, Bucharest. Quebracho and mimosa leather samples were exposed to ^{60}Co gamma rays at the IRASM Center for Technological Irradiations of the Horia Hulubei National Institute for Physics and Nuclear Engineering (HH-IFIN), Bucharest. IRASM facility is a category IV gamma irradiator. The radiation doses applied were 10, 25, 50 and 100 kGy with a dose uniformity ratio (DUR) of 1.14. The quebracho leather samples were then used to evaluate the short-time effect of the irradiation treatment by measuring the proton relaxation times T_1 and T_2 after the treatment. The mimosa leather samples were further exposed to accelerated ageing by heating at 40°C in controlled atmosphere at weekly alternating 30% and 70% RH for 12 weeks and used to evaluate the long-term effect of gamma irradiation. The artificially ageing treatments were carried out with a Binder APT Line KBF-ICH test chamber.

Method

Unilateral NMR measurements were performed using a cylindrical shape unilateral NMR-MOUSE bar magnet with a frequency of 20.05 MHz. The NMR-MOUSE[®] (Mobile Universal Surface Explorer) is a small portable, non-destructive, single-sided NMR device [11]. The MOUSE equipment was connected to a Bruker-Minispec spectrometer which works as an amplifier in the transmission of radio frequency (RF) pulses and as a preamplifier in reception. This system can measure proton relaxation times T_1 and T_2 . The longitudinal relaxation time T_{1r} , also called spin-lattice relaxation time, was measured using a saturation recovery sequence with an echo-time of about 25 s. The spin-spin relaxation time $T_{2\text{eff}}$ was measured using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence. The relaxation times were extracted from the experimental data with the help of exponential functions (Figure 1).

piele tăbăcită cu extracte de quebracho și mimoză au fost expuse razelor gamma ^{60}Co la Centrul de Iradiere Tehnologice IRASM din cadrul Institutului Național de Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei (IFIN-HH), București. Echipamentul din cadrul IRASM este un iradiator gamma de categoria IV. Dozele de radiații aplicate au fost de 10, 25, 50 și 100 kGy, cu un raport al uniformității dozei (DUR) de 1,14. Probele de piele tăbăcită cu quebracho au fost apoi folosite pentru a evalua efectul pe termen scurt al tratamentului de iradiere prin măsurarea timpilor de relaxare a protonilor T_1 și T_2 imediat după tratament. Probele de piele tăbăcită cu mimoză au fost expuse în continuare la îmbătrânire accelerată prin încălzire la 40°C în atmosferă controlată, alternându-se săptămânal UR între 30% și 70%, timp de 12 săptămâni și utilizate pentru a evalua efectul pe termen lung al iradierii gamma. Tratamentele de îmbătrânire artificială au fost efectuate cu o cameră de testare Binder APT Line KBF-ICH.

Metodă

Experimentele au fost realizate cu ajutorul unui echipament NMR-MOUSE sub formă de magnet cilindric cu o frecvență de 20,05 MHz. NMR-MOUSE[®] (Mobile Universal Surface Explorer) este un dispozitiv mic, portabil, care permite analiza probelor și a artefactelor în mod ne-invaziv și nedistructiv [11]. Echipamentul NMR MOUSE a fost conectat la un spectrometru Bruker-Minispec (care funcționează ca un amplificator la transmisia impulsurilor la frecvențe radio (RF) și ca un preamplificator la recepție) pentru măsurarea timpilor de relaxare ai protonilor T_1 și T_2 . Timpul de relaxare longitudinal T_{1r} , numit și timp de relaxare spin-rețea, a fost măsurat folosind o secvență de recuperare a saturației cu un timp de ecou de aproximativ 25 s. Timpul de relaxare spin-spin $T_{2\text{eff}}$ a fost măsurat folosind o secvență de impuls Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Figura 1).

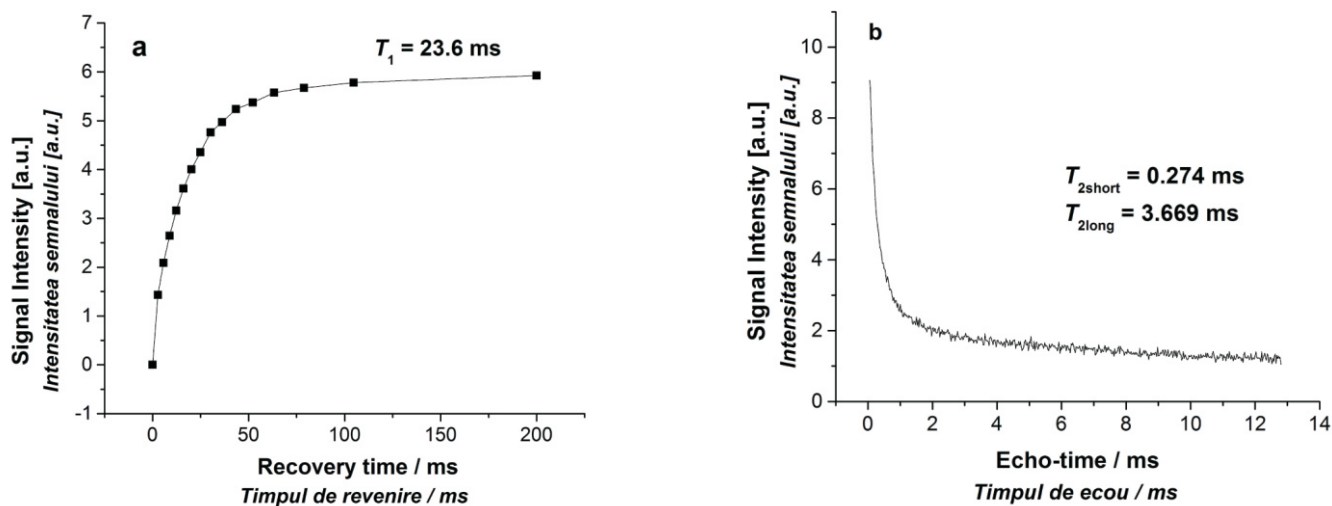


Figure 1. (a) Determination of T_1 spin-lattice relaxation time and (b) T_{2eff} spin-spin relaxation time with the help of exponential functions for new quebracho leather

Figura 1. Ilustrarea modului de determinare a (a) timpului de relaxare spin-rețea T_1 și a (b) timpului de relaxare spin-spin T_{2eff} cu ajutorul unor funcții exponențiale pentru pielea tăbăcită cu quebracho

RESULTS AND DISCUSSION

The structure of collagen was studied by various methods commensurate with different levels of its hierarchic organization, from molecules that successively pack into fibrils, to fibres and bundles (Figure 2) [12]. Microfibrils of collagen are composed of tropocollagen (which consists of three polypeptide chains, and each of them having a left-handed helix conformation, twisted together into a right-handed coiled coil and forming a triple helix or "super helix") oriented in parallel bundles which results in structural anisotropy. Water molecules are bound to collagenous tissue and their motion is greatly restricted. The relaxation time is considered to be a measure of the mobility of water in the matrix, varying from about 10^{-6} s for frozen water to 2–3 s for liquid water [13]. Collagen deterioration affects the interactions between water and collagen molecules resulting in the variation of proton relaxation time values. To improve strength and durability, collagen may be cross-linked by chemical (e.g. tanning) or physical methods (e.g. ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatments) [14, 15]. However, denaturation, the unwinding of the triple helical structure of the collagen molecule,

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Structura colagenului a fost studiată prin diverse metode adecvate fiecărui nivel de organizare ierarhică în parte, molecule, fibrile și fibre. (Figura 2) [12]. Microfibrilele de colagen sunt compuse prin asocierea longitudinală și transversală a moleculelor de tropocolagen (o moleculă constă din trei lanțuri polipeptidice, fiecare dintre acestea având o conformație elicoidală levogiră, răsucite împreună într-un „șnur” spiralat dextrogir numit triplu helix sau „super-helix”) și sunt orientate paralel, în fascicule, fapt care determină anizotropia specifică materialelor colagenice. Moleculele de apă sunt legate de structura colagenică și mișcarea lor este, prin urmare, foarte limitată. Timpul de relaxare este considerat a fi o măsură a mobilității apei în matricea colagenică, acesta variind de la aproximativ 10^{-6} s în cazul apei în stare solidă până la 2-3 s pentru apa lichidă [13]. Deteriorarea colagenului afectează interacțiunile dintre moleculele de apă și diversele niveluri structurale ale colagenului conducând la variația valorilor timpilor de relaxare ai protonilor. Pentru a-i îmbunătăți rezistența și durabilitatea, colagenul poate fi reticulat prin metode chimice (de exemplu, tăbăcire) sau fizice (de exemplu, iradiere cu raze ultraviolete și tratamente de deshidratare termică) [14, 15]. Cu toate acestea, denaturarea, adică pierderea structurii de triplu helix, reduce semnificativ

markedly reduces its strength and increases the rate of biodegradation by fungal/bacterial enzymes [16, 17].

rezistența materialelor colagenice și le crește susceptibilitatea față de procesele de biodegradare induse de enzimele fungice și bacteriene [16, 17].

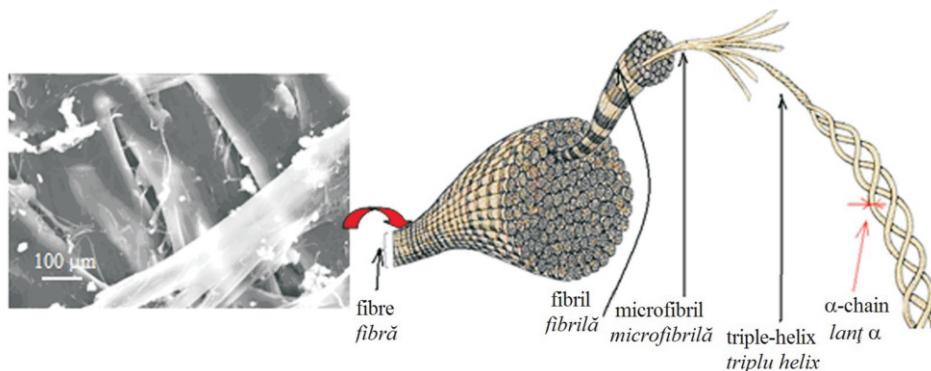


Figure 2. Hierarchical structure of collagen-based materials. Each collagen molecule is a right-handed triple-helix made of three left-handed α -chains. Collagen molecules aggregate both in lateral and longitudinal directions to form fibrils. Multiple fibrils make up collagen fibres mainly through crosslinking.

This Figure is reproduced from the online version of Chimica e Industria [12].

Figura 2. Structura ierarhică a materialelor pe bază de colagen. Fiecare moleculă de colagen este o structură de tip triplu helix dextrogir, compusă din trei lanțuri polipeptidice de tip α , levogire.

Moleculele de colagen se asociază atât în direcție laterală, cât și longitudinală pentru a forma fibrile.

Mai multe fibrile compun fibrele de colagen, asociindu-se în principal prin reticulare.

Această figură este reprodusă din versiunea electronică a revistei Chimica e Industria [12].

Dose-Dependent Effect of Gamma Radiation. Short-Term Modifications of Collagen-Water Interaction

The recovery of longitudinal component of the water protons magnetisation has been characterised by a single T_{1r} , whereas we have found that the T_2 exponential decay can be well described by two components: T_{2short} and T_{2long} (where $T_{2short} < T_{2long}$). Table 1 lists the T_{1r} , T_{2short} and T_{2long} values obtained for the quebracho leather samples exposed to increasing doses of gamma irradiation. Interactions of water molecules with complex systems like collagen–ligand (e.g. tannin matrix) are known to influence the structural ordering of both water and proteins. In a ternary system like collagen–tannin–water, alterations in the hydration structure of the macromolecular complex collagen–tannin are expected when structural modifications occur in collagen. The fluctuating cloud of water molecules surrounding polar residues in collagen can be affected by such modifications. In fact, the longitudinal T_1 relaxation time increases as the gamma irradiation dose increases (Figure 3). The increase is

Efectul dozei de iradiere gamma. Modificări pe termen scurt ale interacțiunii colagen-apă

Timpul de relaxare longitudinal, T_{1r} , a fost obținut prin fitarea datelor experimentale cu o funcție exponențială, iar timpul de relaxare transversal, T_2 , a fost caracterizat prin două componente: T_{2short} și T_{2long} (unde $T_{2short} < T_{2long}$), cu ajutorul altei funcții cu două exponențiale. În Tabelul 1 sunt prezentate valorile T_{1r} , T_{2short} și T_{2long} obținute pentru probele de piele tăbăcită cu quebracho expuse la doze crescătoare de radiații gamma. Se știe că interacțiunile dintre moleculele de apă cu sisteme complexe precum cele de tipul colagen-ligand (de exemplu, colagen-tanin) influențează geometria structurală atât a apei, cât și a proteinei. Într-un sistem ternar precum cel reprezentat de colagen-tanin-apă, sunt de așteptat modificări în structura de hidratare a complexului macromolecular colagen-tanin ca urmare a modificărilor structurale ale moleculei de colagen. Norul fluctuant al moleculelor de apă din jurul reziduurilor polare din molecula de colagen poate fi afectat de aceste modificări. De fapt, s-a observat că timpul de relaxare longitudinal T_1 crește pe măsură ce

rather low up to a 50 kGy dose (e.g. 10%) and reaches 21% for the 100 kGy dose (Table 1, column 2). The transverse relaxation times $T_{2\text{short}}$ and $T_{2\text{long}}$ have been attributed to the bound water and weakly bound water fractions [18, 19] respectively. It was previously showed that the values of $T_{2\text{short}}$ are more strongly influenced by the nature of the ligand bound to collagen [19]. It is worth mentioning that our recent results clearly demonstrate that $T_{2\text{short}}$ depends on the tannin type, i.e. condensed or hydrolysable [20]. On the other hand, the results in Table 2 indicate that gamma irradiation treatment does not affect the $T_{2\text{short}}$ value, whereas $T_{2\text{long}}$ values display a clear dependence on the gamma irradiation dose. The component $T_{2\text{long}}$ showed a maximum decrease of 16% for the 25 kGy dose and then increased but without reaching the initial level of the not treated sample. Rodin and Nikerov [21] have attributed the short component $T_{2\text{short}}$ to the water fractions in microfibrils, while the long component $T_{2\text{long}}$ was supposed to be associated with water molecules in the interfibrillar space. This later water fraction has more mobile molecules than that the microfibrillar water fraction being thus more susceptible to the variation of the hydration level, i.e. dehydration as a result of the cross-linking or swelling caused by a structural disorganization of the collagen macromolecules (e.g. polypeptide chain scissions) and the subsequent uptake of water [22, 23]. As a consequence, the $T_{2\text{long}}$ behaviour indicates an increase of cross-links up to 25 kGy dose while polypeptide chain scission predominates at higher doses.

crește doza de iradiere (Figura 3). Creșterea este destul de limitată, aproximativ 10%, până la o doză de 50 kGy, dar ajunge la 21% la doza de 100 kGy (Tabelul 1, coloana 2). Timpii de relaxare transversali $T_{2\text{short}}$ și $T_{2\text{long}}$ măsurăți în pielea tăbăcită cu quebracho au fost atribuiți apei legate puternic, respectiv apei legate mai slab [18, 19]. Studii precedente au arătat că valorile $T_{2\text{short}}$ sunt puternic influențate de natura ligandului legat la collagen [19], fapt confirmat de rezultate obținute recent care demonstrează în mod clar că $T_{2\text{short}}$ depinde de tipul de tanin, făcând posibilă distincția între taninurile de tip condensat și cele hidrolizabile [20]. Pe de altă parte, rezultatele din Tabelul 2 indică faptul că tratamentul cu radiații gamma nu afectează valoarea $T_{2\text{short}}$ în timp ce valorile $T_{2\text{long}}$ indică o dependență clară de doza de iradiere. Componenta $T_{2\text{long}}$ prezintă o scădere maximă de 16% la o doză de 25 kGy, după care tendința se inversează și $T_{2\text{long}}$ crește, dar fără a atinge nivelul inițial al probei netratate. Rodin și Nikerov [21] au atribuit componenta scurtă $T_{2\text{short}}$ fracțiunilor de apă din microfibrile, în timp ce componenta lungă $T_{2\text{long}}$ a fost corelată cu moleculele de apă din spațiul interfibrilar. Această ultimă fracțiune prezintă molecule cu o mobilitate mai mare decât cele din interiorul microfibrilelor și este mai susceptibilă la variația nivelului de hidratare, de exemplu prin deshidratare în urma reticulării sau prin gonflare cauzată de destabilizarea structurii macromoleculare (de exemplu, prin scindări ale lanțului polipeptidic) care determină crearea mai multor situri de legare a apei [22, 23]. În consecință, comportamentul $T_{2\text{long}}$ indică prevalența proceselor de reticulare până la o doză de 25 kGy, în timp ce la doze mai mari predomină scindările lanțului polipeptidic.

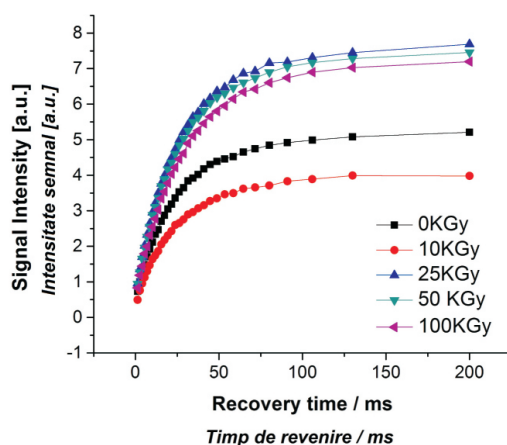


Figure 3. Variation of spin-lattice relaxation time T_1 as a function of gamma irradiation dose in quebracho tanned leather
Figura 3. Variația timpului de relaxare spin-rețea T_1 în funcție de doza de iradiere gamma în pielea tabăcită cu quebracho

Dose-Dependent Effect of Gamma Radiation. Long-Term Modifications of Collagen-Water Interaction

Table 2 lists the T_1 , $T_{2\text{short}}$ and $T_{2\text{long}}$ values obtained for the mimosa leather samples exposed to increasing doses of gamma irradiation and then subjected to accelerated ageing at 40°C and weekly alternating 30% and 70% RH for 12 weeks. The general trend observed for T_1 is represented by a rather limited increase which reaches its maximum (10%) for the 25 kGy dose (Table 2, column 2). The less influential dose is 10 kGy with a T_1 variation of 3%. Again, the short component $T_{2\text{short}}$ of the spin-spin relaxation time is affected neither by the gamma irradiation long-term effect, nor by accelerated ageing treatment. On the contrary, the long component $T_{2\text{long}}$ displays a more complex behaviour: it slightly increases in the sample exposed to the lowest gamma irradiation dose, then decreases for 25 kGy dose (e.g. 8%) and shows almost no variation for the highest doses, i.e. 50 and 100 kGy. The slight increase could be attributed to a slight hydration effect caused by the accelerated ageing treatment. This is very likely due to a less effective cross-linking induced by low irradiation doses. The significant decrease of $T_{2\text{long}}$ for the sample exposed to 25 kGy confirms that the maximum concentration of cross-links is reached at this dose, whereas the polypeptide chain scission becomes the prevailing deterioration pattern for higher irradiation doses, i.e. 50 and 100 kGy, as also suggested by the increase of the longitudinal relaxation times T_1 .

Efectul dozei de iradiere gamma. Modificări pe termen lung ale interacțiunii colagen-apă

Tabelul 2 prezintă valorile T_1 , $T_{2\text{short}}$ și $T_{2\text{long}}$ obținute pentru probele de piele tăbăcită cu mimosă expuse la doze crescătoare de radiații gamma și apoi supuse tratamentului de îmbătrânire accelerată. Tendința generală observată pentru T_1 este aceea a unei creșteri relativ limitate, care atinge maximum (10%) la o doză de 25 kGy (Tabelul 2, coloana 2). Doza mai puțin influentă este cea de 10 kGy care induce o variație a T_1 de numai 3%. Și în acest caz, componenta scurtă a timpului de relaxare spin-spin, $T_{2\text{short}}$, nu este afectată tratamentul combinat de iradiere cu radiații gamma și de îmbătrânire accelerată. Pe de altă parte, componenta lungă $T_{2\text{long}}$ prezintă un comportament complex: crește ușor la proba expusă la cea mai mică doză de iradiere gamma, scade în cazul unei doze de 25 kGy (8%) și apoi crește, rămânând aproape invariabilă la dozele maxime, respectiv 50 și 100 kGy. Ușoara creștere inițială ar putea fi datorată unui efect de hidratare ușoară cauzat de tratamentul de îmbătrânire accelerată, hidratare favorizată de reticulări mai puțin eficiente induse de dozele mici de iradiere. Scăderea mai semnificativă a $T_{2\text{long}}$ în cazul probei expuse la 25 kGy confirmă faptul că la această doză de iradiere se obține concentrația maximă de legături încrucișate. Creșterea timpilor de relaxare longitudinali T_1 sugerează un mecanism prevalent de deteriorare prin scindarea lanțului polipeptidic la doze de iradiere mai mari, adică 50 și 100 kGy.

Table 1: Variation of T_1 , $T_{2\text{short}}$ and $T_{2\text{long}}$ relaxation times of collagen in quebracho leather as a function of gamma irradiation dose after the irradiation treatment

Tabelul 1: Variația timpilor de relaxare T_1 , $T_{2\text{short}}$ și $T_{2\text{long}}$ ai colagenului din pielea tăbăcită cu quebracho în funcție de doza de radiații gamma

Dose (kGy) Doză (kGy)	T_1 (ms)	$T_{2\text{short}}$ (ms)	$T_{2\text{long}}$ (ms)
0	23.06 ± 0.35	0.274 ± 0.010	3.669 ± 0.236
10	24.25 ± 0.13	0.275 ± 0.006	3.291 ± 0.144
25	25.14 ± 0.90	0.280 ± 0.007	3.066 ± 0.225
50	25.25 ± 0.07	0.277 ± 0.002	3.441 ± 0.249
100	27.95 ± 0.78	0.281 ± 0.007	3.423 ± 0.444

Table 2: Variation of T_1 , $T_{2\text{short}}$ and $T_{2\text{long}}$ relaxation times of collagen in mimosa leather as a function of gamma irradiation dose after the accelerated ageing treatment (12 weeks at 40°C and weekly alternating 30% and 70% RH)
 Tabelul 2: Variația timpilor de relaxare T_1 , $T_{2\text{short}}$ și $T_{2\text{long}}$ ai colagenului din pielea tăbăcită cu mimosa în funcție de doza de iradiere gamma după îmbătrânire accelerată (12 săptămâni la 40°C și alternând săptămânal RH la 30% și 70%)

Dose (kGy) Doză (kGy)	T_1 (ms)	$T_{2\text{short}}$ (ms)	$T_{2\text{long}}$ (ms)
0	17.20 ± 0.57	0.281 ± 0.006	2.327 ± 0.109
10	17.84 ± 1.09	0.282 ± 0.002	2.373 ± 0.015
25	19.04 ± 0.77	0.272 ± 0.006	2.138 ± 0.161
50	18.61 ± 0.59	0.274 ± 0.004	2.321 ± 0.100
100	18.17 ± 0.06	0.270 ± 0.006	2.375 ± 0.900

CONCLUSIONS

New vegetable tanned leather was exposed to increasing doses of gamma irradiation ranging from 10 to 100 kGy. The dose-dependent effect of gamma irradiation on collagen in leather was investigated by unilateral NMR using a portable NMR MOUSE equipment. Examination of irradiated samples after the treatment revealed variations of both spin-lattice (T_1) and spin-spin (T_2) proton relaxation times: T_1 monotonously increased with increasing of dose, while $T_{2\text{long}}$ showed a minimum for the 25 kGy irradiation dose. To evaluate the long-term effect of gamma irradiation, the irradiated samples were further exposed to accelerate ageing at 40°C and weekly alternate 30% and 75% relative humidity (RH) for 12 weeks. The synergistic action of temperature and relative humidity caused distinct variations of both T_1 and $T_{2\text{long}}$ relaxation times. $T_{2\text{long}}$ showed a minimum at 25 kGy and a maximum at 100 kGy suggesting distinct modifications within the collagen fibril structure by cross-linking and hence dehydration at 25 kGy, and polypeptide chain destabilisation resulting in a very likely increasing of the swelling capacity, at higher doses. Moreover, T_1 displayed an increase up to 25 kGy dose and then slightly decreased. These results suggest that a critical level of

CONCLUZII

Pielea nouă tăbăcită vegetal a fost expusă la doze crescătoare de radiații gamma: 10, 25, 50 și 100 kGy. Efectul dozei de radiații gamma asupra colagenului din piele a fost investigat prin RMN unilaterală utilizând un dispozitiv portabil NMR-MOUSE. Examinarea probelor iradiate imediat după tratament a relevat variații ale timpilor de relaxare ai protonilor spin-rețea (T_1) și spin-spin (T_2): T_1 a crescut monoton odată cu creșterea dozei, în timp ce $T_{2\text{long}}$ a prezentat o valoare minimă la doza de 25 kGy. Pentru a evalua efectul pe termen lung al radiațiilor gamma, probele iradiate au fost expuse în continuare la îmbătrânire accelerată la 40°C cu alternarea săptămânală a umidității relative (UR) la 30% și la 75%, timp de 12 săptămâni. Acțiunea sinergică a temperaturii și a umidității relative a determinat variații ale timpilor de relaxare T_1 și $T_{2\text{long}}$. $T_{2\text{long}}$ a prezentat o valoare minimă la 25 kGy și una maximă la 100 kGy sugerând modificări distincte în structura fibrilelor de colagen, și anume reticulare și, implicit, deshidratare la 25 kGy, și scindarea lanțului polipeptidic (care a dus la o creștere a capacității de gonflare) la doze mai mari. Mai mult decât atât, T_1 a prezentat un comportament dual, crescând până la doza de 25 kGy și apoi scăzând ușor. Aceste rezultate sugerează cu mare probabilitate un nivel critic de iradiere corespunzător

structural modifications is reached at 25 kGy irradiation dose.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the national project PN 09 10 03 13, "Study of Collagen-Based Artefact Deterioration Using Nuclear Magnetic Resonance Techniques and Equipment", national project TEXLECONS 213/2012, "Improvement of Occupational Environment Quality in Cultural Heritage Deposits. Validation of Gamma Irradiation Treatment of Textile and Leather Cultural Goods", and the Sectorial Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 POSDRU/159/1.5/S/132395.

dozei de 25 kGy, nivel la care se înregistrează modificările structurale cele mai evidente.

Mulțumiri

Această lucrare a fost realizată în cadrul proiectului național PN 09 10 03 13 „Studiul deteriorării artefactelor pe bază de colagen utilizând tehnici și echipamente de rezonanță magnetică nucleară”, a programului Parteneriate derulat cu sprijinul MEC-UEFISCDI, proiectul nr. 213/2012 „Îmbunătățirea calității mediului de lucru în depozitele de patrimoniu cultural. Validarea tratamentului bunurilor culturale textile și din piele cu radiații gamma” și a Programului Sectorial Operațional Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013 POSDRU/159/1.5/S/132395.

REFERENCES

1. Covington, A.D., Modern tanning chemistry, *Chem Soc Rev*, **1997**, 26, 111-26.
2. Zywicki, B., Reemtsma, T., Jekel, M., *J Chromatogr A* **1970**, **2002**, 191-200.
3. Da Silva Aquino, K.A., *Intech Journals*, www.intechopen.com.
4. Maslennikova, A., Kochueva, M., Ignatieva, N., Vitkin, A., Zakharkina, O., Kamensky, V., Sergeeva, E., Kiseleva, E., Bagratashvili, V., *Int J Radiat Biol*, **2015**, 91, 3, 240-247.
5. Leontiou, I., Matthopoulos, D.P., Tzaphlidou, M., Glaros, D., *Micron*, **1993**, 24, 13-16.
6. Ohan, M.P., Dunn, M.G., *Wiley Periodicals*, **2003**.
7. Nunes, I., Mesquita, N., CaboVerde, S., Trigo, M., Ferreira, A., Carolino, M.M., Portugal, A., Botelho, M.L., *Radiat Phys Chem*, **2012**, 81, 1943-1946.
8. Badea, E., Miu, L., Budruga, P., Giurginca, M., Mašić, A., Badea, N., Della Gatta, G., *J Therm Anal Calorim*, **2008**, 91, 17-27.
9. Sendrea, C., Badea, E., Miu, L., Ignat, M., Iovu, H., Proceedings of The 5th International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS), Bucharest, 23-25 October **2014**, 555-560.
10. Miu, L., Brătulescu, V., Gaidău, C., Bocu, V., Niculescu, O., Process for making natural leather for patrimony book binding, Romanian patent no. 122098, **2008**.
11. Oligschlaeger, D., Gloeggler, S., Watzlaw, J., Brendel, K., Jaschtschuk, D., Colell, J., Zia, W., Vossel, M., Schnakenberg, U., Bluemich, B., *Appl Magn Reson*, **2015**, 46, 181-202.
12. Della Gatta, G., Badea, E., Saczuk, M., Odlyha, M., Larsen, R., *Chimica e Industria*, **2010**, 4, 106-111.
13. Lambert, J.B., Graham, E., Smith, M.T., Frye, J.S., *Ancient Mesoamerica*, **1994**, 5, 55-60.
14. Cheung, D., Perelman, N., Tong, D., Nimni, M., *J Biomed Mater Res*, **1990**, 24, 581-589.
15. Grant, R.A., Cox, R.W., Kent, C.M., *J Anat*, **1973**, 115, 29-43.
16. Ohan, M.P., Weadock, K.S., Dunn, M.G., *J Biomed Mater Res*, **2002**, 60, 384-391.
17. Chirila, C., Deselnicu, V., Crudu, M., Comparative Study Regarding the Resistance of Wet-White and Wet-Blue Leather to the Growth of Fungi, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2014**, 14, 2, 107-120.

18. Grigera, J.R, Berendsen, H.J.C., *Biopolymers*, **1979**, 18, 47–57.
 19. Nishad Fathimaa, N., Baiasc, M., Bluemich, B., Ramasami, T., *Int J Biol Macromol*, **2010**, 47, 590–596.
 20. Badea, E., Şendrea, C., Carşote, C., Adams, A., Bluemich, B., Iovu, H., *Microchem J*, **2015** (in press).
 21. Victor Rodin, V., Victor Nikerov, A., *Tissue Eng*, **2014**, 3, 47-61.
 22. Badea, E. Della Gatta, G., Usacheva, T., *Polym. Degrad. Stab.*, **2012**, 97, 346-353.
 23. Badea, E., Usacheva, T., Della Gatta, G., *Rossiiskii Khimicheskii Zhurnal - Zhurnal Rossiiskogo Khimicheskogo Obshchestva im. D.I. Mendeleeva* (Russian Chemistry Journal), **2015**, 59, 1, 28-41.
-

Article received/Data primirii articolului: 29.07.2015

Accepted/Acceptat la data: 25.09.2015