

# FILMS À BASE DE CHITOSAN ET COLLAGÈNE: INFLUENCE DE LA MASSE MOLÉCULAIRE DU CHITOSAN SUR LA COMPATIBILITÉ DU BIOPOLYMÈRE

## CHITOSAN AND COLLAGEN COMPOSITE FILMS: CHITOSAN MOLECULAR WEIGHT INFLUENCE UPON THE BIOPOLYMER COMPATIBILITY

Oana Sorina NASTASESCU,<sup>a</sup> Marcel Ionel POPA,<sup>a</sup> Gabriela LISA<sup>a</sup> et Liliana VERESTIUC<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Université Technique Gh.Asachi, Faculté d'Ingénierie Chimique, Département de Chimie-Physique, 71 A, Bd. D. Mangeron, 700050, Iasi, ROUMANIE

<sup>b</sup>Université de Médecine et Pharmacie 'Gr. T. Popa' Faculté de Bioingénierie Médicale, rue Universitatii, nr. 16, 700115, Iasi, ROUMANIE

Reçu le mars 25, 2009

Le travail présente l'obtention et les propriétés des films à base de collagène et de chitosan et l'influence de la masse moléculaire du chitosan sur la compatibilité des polymères du film qui en résulte. Les films ont été caractérisés par: FTIR, analyse thermogravimétrique et AFM. En vue de les utiliser comme pansements pour les brûlures, on a évalué les caractéristiques de dégradation *in vitro*, en présence d'enzymes spécifiques (collagénase, respectivement chitosanase). L'interaction des films collagène-chitosan avec des fluides aqueux est dépendante de la composition de ceux-ci et de la valeur de pH de la solution. Les données concernant la cinétique de dégradation *in vitro*, en présence de chitosanase pour les films à base de collagène et de chitosan ont montré une influence significative du taux de chitosan dans le film polymérique et de la masse moléculaire sur la vitesse et le degré de dégradation.

The paper presents the obtaining and properties of films based on collagen and chitosan; the influence of the molecular weight of the chitosan on the polymers compatibility was analysed. Films were characterised by FTIR, thermo gravimetric analysis, AFM. In the aim to use the collagen-chitosan films as materials for wound dressing, *in vitro* degradation in the presence of specific enzymes (collagenase and chitosanase) was performed. The films interaction with aqueous solutions is highly influenced by films composition and solution pH. Kinetic studies in buffered chitosanase showed a significant influence of the ratio and molecular weight of the chitosan on polymeric films degradation.

### INTRODUCTION

Les matériaux collagènes, individuels aussi bien qu'en mélanges avec d'autres composants MEC (glycosoaminoglicans), polysaccharides ou polymères synthétiques ont toujours été associés à la notion d'ingénierie tissulaire. Le biomatériau obtenu *in vitro* remplit la fonction de support pour les cultures cellulaires, contribuant à refaire les tissus pathologiques.<sup>1-3</sup> Le rôle du support est de constituer une matrice pour les cellules, de permettre leurs différenciations et leurs croissances, et dans certaines situations cette matrice guide l'association des composants extracellulaires sécrétés par la cellule.<sup>4</sup>

L'association du collagène à l'ingénierie tissulaire est due à la très bonne biocompatibilité (il est le matériau de base de la matière vivante) et aux possibilités relativement accrues d'en obtenir des tissus animaux (peau, os).<sup>5</sup>

Le collagène se dégrade naturellement des métalloprotéases, spécifiquement de collagénases et serin-protéases, permettant que sa dégradation soit sous le contrôle local des cellules du tissu cultivé.<sup>6</sup> Le collagène natif est résistant à l'action de dégradation des protéases à pH neutre, mais à l'état dénaturé devient sujet aussi à l'action des protéases non spécifiques (trypsine, pepsine etc). Le biopolymère présente une antigénicité faible, due probablement à la ressemblance des séquences

\* Corespondant : mipopa @ch.tuiasi.ro

d'aminoacides du collagène des différentes espèces (homme, animaux) et à la faible teneur en aminoacides aromatiques.

On a observé que l'écartement sélectif de la composante non hélicoïdale de la molécule de collagène supprime l'antigénicité. De même, l'introduction de liaisons chimiques supplémentaires, par exemple l'aldéhyde glutarique, réduit l'antigénicité, mais ne l'élimine pas complètement.<sup>7,8</sup> Les matrices de collagène stimulent la production de collagène de néoformation par les cellules ensemencées, propriété qu'on ne rencontre pas dans les biomatériaux synthétiques. Ceci est dû à ses domaines de liaison intégrines, qui favorisent l'attachement des cellules de culture, phénomène nécessaire à la croissance, à la différenciation, à la réplication et à l'activité métabolique des cellules. Par exemple, les fibroblastes cultivés sur des matrices de collagène se sont différenciés d'une manière similaire à l'activité cellulaire *in vivo*, manifestant aussi une morphologie et un métabolisme presque identiques.<sup>9</sup>

On a observé que les molécules individuelles de collagène polymérisent spontanément *in vitro* en fibres consistantes, pouvant former ultérieurement des structures organisées plus grandes.<sup>10</sup> Le collagène peut être modifié par réticulation intra- et intermoléculaire, ce qui contribue à la formation de fibrilles, fibres et groupements macroscopiques de fibres qui peuvent servir à la formation de tissu.<sup>11</sup> Les réticulations supplémentaires du collagène, traitées avec des agents de réticulation (sels basiques de chrome, d'aluminium, aldéhyde formique, glutarique, etc.), par des traitements physiques (irradiation UV, réchauffement) ou mélangées à d'autres polymères (acide hialuronique, PLA, PGA, PLGA, chitosan, etc)<sup>12</sup> sont destinés à accroître la résistance mécanique et la résistance à l'action des enzymes, afin d'en augmenter la résistance à la biodégradation, de limiter les caractéristiques de gonflement et d'en diminuer la solubilité.<sup>13</sup> Parmi les polymères, le chitosan présente des propriétés qui le recommande comme partenaire dans l'obtention de supports à performances accrues. Le chitosan est un polysaccharide obtenu en désacétifiant la chitine, il est hydrophile, non toxique, biocompatible et biodégradable. Les matériaux basés sur le chitosan ont été testés par ingénierie tissulaire dans une diversité de formes physiques, depuis les films et matrices poreux jusqu'aux gels. Les structures à base de chitosan démontrent de bonnes propriétés pour l'élevage des cultures d'hépatocytes, la

régénération du cartilage articulaire, et même pour la reconstruction osseuse avec des matériaux anorganiques.<sup>14, 15</sup>

Notre travail présente des données expérimentales concernant l'obtention et l'évaluation des propriétés des films à base de collagène et de chitosan, estimant l'influence de la masse moléculaire du chitosan sur la compatibilité des polymères du film qui en résulte. En vue de les utiliser comme pansements pour les brûlures, on en a évalué les caractéristiques de dégradation *in vitro*, en présence d'enzymes spécifiques (collagénase, respectivement chitosanase).

## MATERIAUX ET METHODE

On a utilisé pour les expérimentations du collagène (Col) obtenu dans notre laboratoire à partir de peau bovine, la protéine est extraite par un traitement combiné acido-basique. La viscosité a été déterminée dans solution aqueuse 0,5M acide acétique à la température de 25°C, ( $[\eta] = 4,256$  dl/g, pH isoélectrique = 4,82). Deux types de chitosan (CS I,  $M_w = 755900$  gmol<sup>-1</sup>, degré d'acétification 79,2% et CS II,  $M_w = 309900$  gmol<sup>-1</sup>, degré d'acétification 79,7%), provenant de Vascon Co. Canada ont été utilisés pour étudier l'influence de la masse moléculaire sur les propriétés des films. Les données concernant le chitosan proviennent du fournisseur.

On a mélangé des solutions de collagène et de chitosan (1% (w/w) dans 0,5M acide acétique), sous forte agitation jusqu'à la formation d'un mélange homogène. On a obtenu les membranes en déposant sur le film de polypropylène une solution de mélange de polymères séché à 37°C, pendant 24 heures. On a maintenu les membranes résultées dans l'excitateur avec CaCl<sub>2</sub> durant 48 heures, afin d'éliminer les traces de dissolvant, les soumettant ensuite à la caractérisation.

### Analyse FTIR et thermique des films de collagène et de chitosan

On a caractérisé les films par spectroscopie avec la transformée de Fourier, en utilisant un appareil Bruker (USA). On a réalisé l'analyse thermogravimétrique avec un derivatograph type Paulik-Paulik-Eddey (Hongrie); dans les conditions suivantes: masse de l'échantillon,  $m_w = 15 \pm 2$ mg, matériel de référence Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, vitesse de réchauffement 10°C/min, domaine de température de 25 à 900°C, conditions statiques. On a réalisé l'interprétation des données thermogravimétriques par la méthode de l'intégration Coats-Redfern.<sup>16</sup>

### Evaluation des caractéristiques de gonflement des films

On a réalisé les tests de gonflement en solution tampon phosphate (PBS) préparées à partir de phosphate disodique et acide citrique monohydraté au pH 5,5, respectivement au pH 7,4. Pour déterminer les propriétés de gonflement des membranes on a utilisé la méthode gravimétrique, faisant les expérimentations à la température de 37°C. On a interprété les données expérimentales dans la direction de l'évaluation de la constante de la vitesse de gonflement et du degré de gonflement. On a calculé le degré de gonflement par la relation:

$$DG = (m/m_0) \times 100 \quad (1)$$

DG = degré de gonflement,  $m_0$  = masse initiale de l'échantillon,  $m$  = masse finale (échantillon + masse du dissolvant absorbé).

### Dégradation *in vitro*

On a réalisé les tests de dégradation *in vitro* par immersion des membranes dans des solutions tampons renfermant des enzymes spécifiques (collagénase, respectivement chitosanase), à la température de 37°C. La quantité de polymère dégradé a été mesurée par des méthodes analytiques (évaluation de la quantité de groupements  $\alpha$ -aminés pour le collagène<sup>17</sup> et la quantité des sucres terminaux formés pour le chitosan – méthode avec le cyanure de potassium).<sup>18</sup>

Avant et après la dégradation on a analysé la surface des membranes par microscopie de force atomique.

### Analyse par microscopie de force atomique (AFM)

Les données de microscopie de force atomique se sont effectuées en vue de caractériser morphologiquement les surfaces des films à base de collagène et de chitosan et pour estimer la rugosité de ces films, avant et après la dégradation *in vitro*. On a évalué la rugosité moyenne carrée (Rrms) et la rugosité moyenne (Rabs). On a utilisé le mode de travail *tapping*, dans l'air, à pointe de nitrure de silicium (NSC35), à une force constante de 7,5 N/m, la fréquence de 240 kHz et pointe à rayon inférieur à 10nm. On a utilisé un microscope Solver PRO-M, NT-MDT, Russie.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Pour caractériser la compatibilité ou l'incompatibilité de deux polymères à l'état solide on utilise diverses méthodes thermiques, telles: thermogravimétrie (TG) et thermogravimétrie dérivative (DTG), thermoanalyse différentielle (DTA) et calorimétrie différentielle (DSC). On peut évaluer la modification énergétique dans les mélanges de polymères en utilisant thermogravimétrie, par l'intermédiaire de la valeur de l'excès d'énergie d'activation  $\Delta E_a$ , que l'on utilise pour apprécier le degré de compatibilité des composants du mélange. Partant de la supposition que le comportement thermique des mélanges de polymères est déterminé par les interactions des composants, la bibliographie suggère<sup>19</sup> une relation d'évaluation de l'énergie d'activation apparente ( $E_a$ ) par la méthode de l'intégration Coats-Redfern<sup>19</sup>, pour la dégradation thermique du mélange dans les mêmes conditions que pour les composants purs:

$$E_{ap} = n_1 E_1 + n_2 E_2 \pm \Delta E_a, \quad (2)$$

où:  $n_1$  et  $n_2$  représentent les fractions gravimétriques des composés;  $E_1$  et  $E_2$  sont les énergies d'activation pour les composants purs à la

dégradation;  $\Delta E_a$  caractérise l'énergie des forces d'interaction entre les composants et constitue un critère d'évaluation du degré de compatibilité des composants du mélange.

Les valeurs de l'énergie d'activation, calculées conformément à la relation (2) (ligne continue) et ceux déterminés expérimentalement (carre) pour les mélanges Col/CS sont présentés dans les Figures 1 et 2. Les échantillons pour lesquels la valeur d'énergie d'activation en fonction du rapport Col/CS ne vérifie pas la relation (2) sont compatibles.<sup>19</sup> C'est des rapports de composition Col/CS de 80/20, 60/40, 40/60 20/80, respectivement des rapports de composition Col/CS II de 80/20 et 60/40.

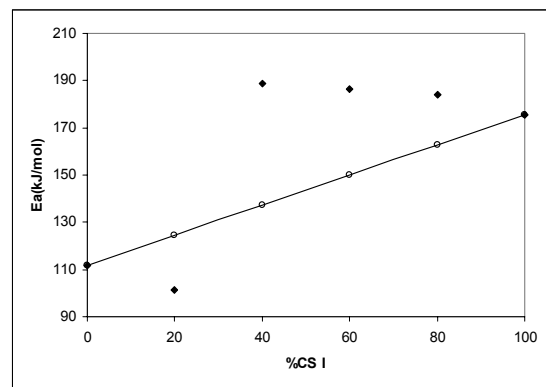


Fig. 1 – Energie d'activation apparente pour le collagène, CS I et les mélanges de polymères de diverses compositions.

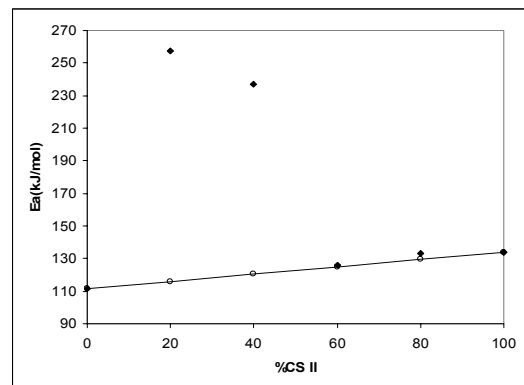


Fig.2 – Energie d'activation apparente pour le collagène, CS II et les mélanges de polymères de diverses compositions.

L'accroissement de la masse moléculaire du chitosan améliore la compatibilité à l'état solide dans les mélanges de collagène.

Les spectres FTIR pour les polymères et les films à base de collagène et de chitosan, aux compositions des mélanges 20/80, sont présentés dans la Figure 3. Les bandes d'absorption du collagène apparaissent aux longueurs d'ondes

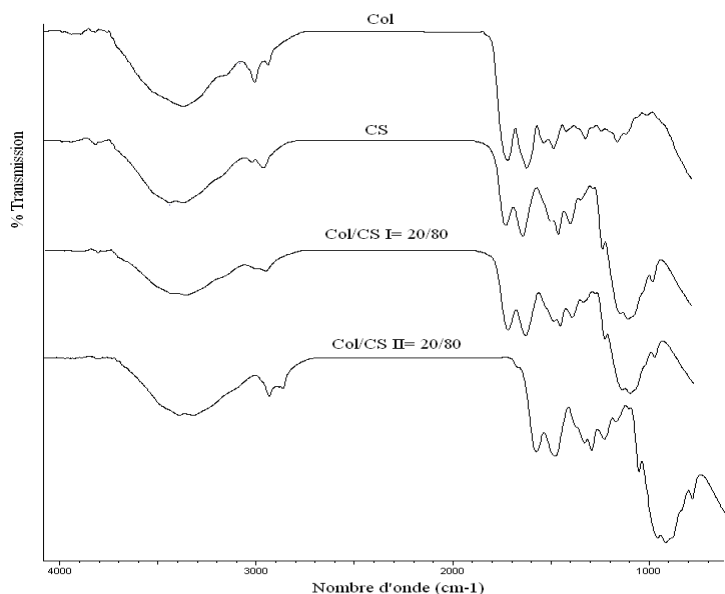


Fig.3 – La spectroscopie FTIR le collagène, CS I et les mélanges de polymères.

suivantes: vibrations de valences de  $\text{-OH}$  –  $3330,5 \text{ cm}^{-1}$ ; vibrations de valences  $\text{C-H}$  de  $\text{-CH}_2$  –  $2959,5 \text{ cm}^{-1}$ ; amide I –  $1651,3 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1454,8 \text{ cm}^{-1}$ ; amide III –  $1240,4 \text{ cm}^{-1}$ . Les bandes d'absorption caractéristiques au chitosan sont:  $3367,3 \text{ cm}^{-1}$  – vibrations de valences de  $\text{-OH}$ ;  $2881,9 \text{ cm}^{-1}$  – vibrations de valence de  $\text{-C-H}$ ;  $1646,5 \text{ cm}^{-1}$  – amide I. Dans le cas des mélanges collagène-chitosan, les spectres FTIR ne montrent pas des différences essentielles en comparaison avec les polymères purs.

Celle-ci indique que les interactions entre le chitosan et le collagène sont de type les liaisons d'hydrogène et partiellement de type ionique entre le groupement  $\text{NH}_3^+$  du chitosan et le groupement  $\text{COO}^-$  du collagène.

Les caractéristiques de gonflement à l'équilibre pour les films à base de collagène et de chitosan, en solutions d'intérêt biologique, sont illustrées dans les Figures 4 et 5. A  $\text{pH} = 5,5$ , les mélanges collagène-chitosan présentent des valeurs plus faibles du degré de gonflement à l'équilibre que celles pour les composants purs, chitosan et collagène.

Le degré de gonflement augmente par l'augmentation du taux de chitosan dans la membrane. Cet effet s'explique par le fait que par l'accroissement du taux de chitosan (que représente le composant plus hydrophile), la capacité de la membrane de retenir la solution aqueuse augmente aussi. A  $\text{pH} = 5,5$ , se produit l'ionisation des groupements  $\text{NH}_2$  du chitosan, en formant l'ion d'ammonium.<sup>19</sup> Par conséquent, ils

peuvent former des liaisons ioniques avec les anions carboxylate du collagène.

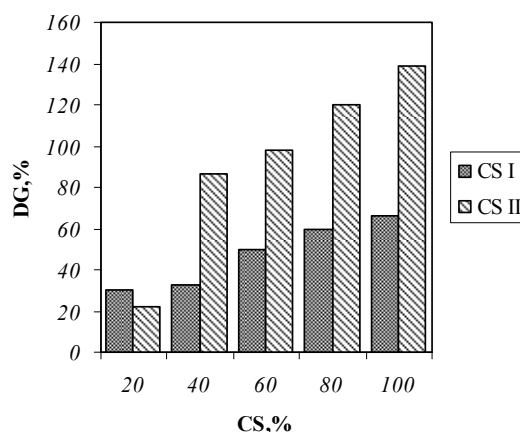


Fig. 4 – Degré de gonflement en solution tampon  $\text{pH}=5,5$  en fonction du taux de CS.

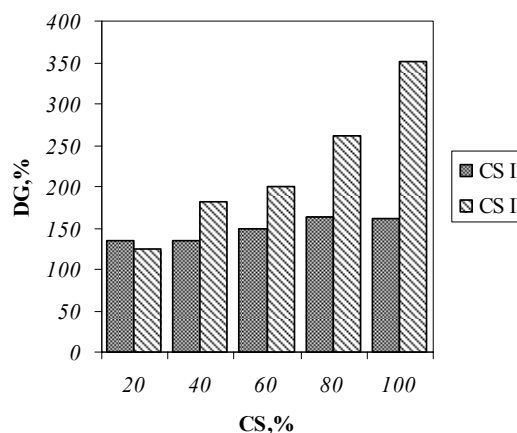


Fig.5 – Degré de gonflement en solution tampon  $\text{pH}=7,4$  en fonction du taux de CS.

A des valeurs de pH > 4,85 (valeur de pH isoélectrique) les groupements fonctionnels du collagène sortent de l'état zwitterionique, par conséquence les groupement aminiques passent à l'état non ionisé et peuvent participer à la formation des liaisons d'hydrogène.

A la valeur du pH = 7,4, les degrés de gonflement à l'équilibre sont beaucoup plus élevés. Ce phénomène est dû surtout à l'ionisation des groupements -COOH qui déterminent l'apparition des répulsions électrostatiques entre les chaînes macromoléculaires et par conséquence l'augmentation du degré de gonflement qui devient plus élevé par comparaison a pH = 5,5.

La cinétique des réactions de dégradation *in vitro*, en milieu tampon à pH=7,4, en présence de la collagénase, est illustrée dans les Figures 6-8.

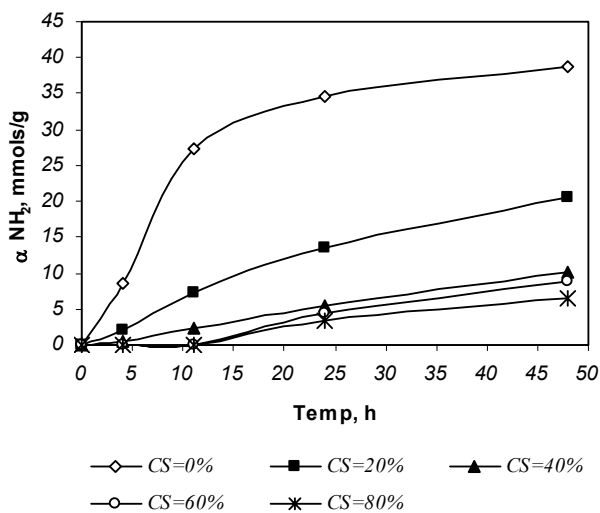


Fig.6 – Dégradation *in vitro*, en présence de collagénase, des films collagène-chitosan CS I.

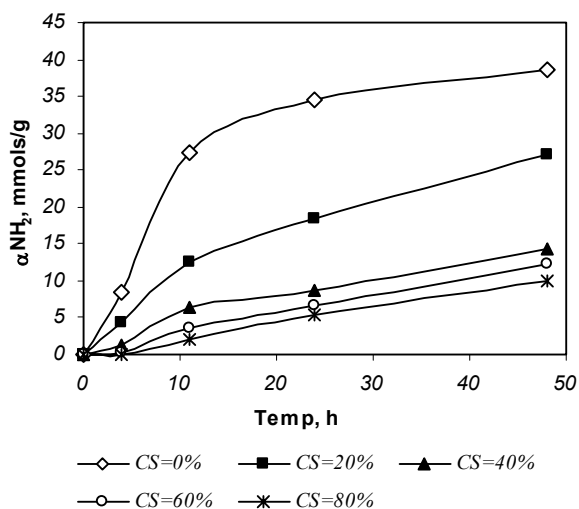


Fig.7 – Dégradation *in vitro*, en présence de collagénase, des films collagène-chitosan CS II.

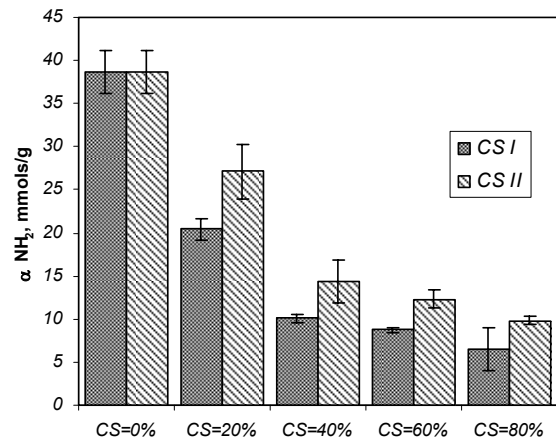


Fig.8 – Degré de dégradation *in vitro*, en présence de collagénase, des films à base de collagène et de chitosan.

Comme on pouvait s'y attendre, l'introduction du chitosan dans les films de collagène détermine la diminution de la vitesse de dégradation du matériau, en présence d'enzyme protéolytique, plus la quantité de chitosan est grande, plus la vitesse de dégradation et le degré de dégradation diminuent. Ce effet est bénéfique pour les applications médicales dans le traitement des brûlures, sachant l'inconvénient des produits collagéniques commerciaux, qui se caractérisent par une biodégradation beaucoup trop rapide par comparaison à la réfection d'un tissu nouveau.

La diminution de la masse moléculaire du chitosan contribue à obtenir des comportements *in vitro* moins accentués, la vitesse de dégradation baisse de façon moins accentuée que le taux de chitosan du mélange. Le degré de dégradation des films à base de collagène et de chitosan CS I est aussi amoindri par rapport au chitosan CS II, qui a une masse moléculaire plus petite. On pense que le phénomène est déterminé par les interactions plus fortes qui se manifestent entre le collagène et le chitosan CS I, ce qui ne permet pas l'accès de l'enzyme aux fonctions peptidiques et la formation de la conformation adéquate du collagène dans les situs actif de l'enzyme.

On présente les résultats expérimentaux de dégradation dans les Figures 9 et 10. Les données concernant la cinétique de dégradation *in vitro*, en présence de chitosanase pour les films à base de collagène et de chitosan à masse moléculaire élevée, mettent en évidence une influence significative du taux de chitosan dans le film biopolymérique sur la vitesse et le degré de dégradation; l'accroissement du taux de CS I jusqu'à 60 % détermine une augmentation de la vitesse et du degré de dégradation. A des quantités

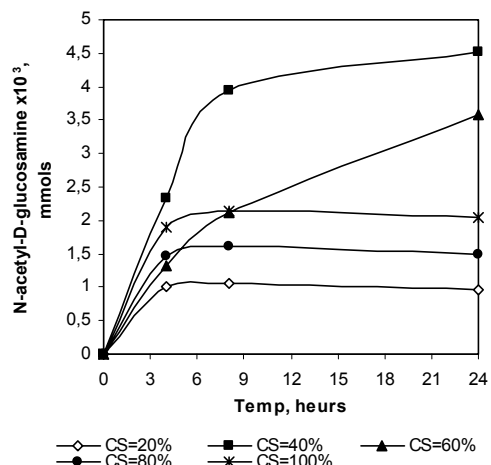


Fig.9 – Dégradation in vitro, en présence de chitosanase, des films de collagène/CS I.

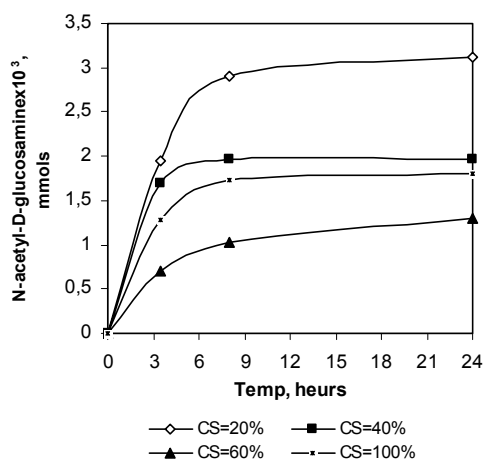


Fig.10 – Dégradation in vitro, en présence de chitosanase, des films de collagène/CS II.

plus élevées de chitosan, le processus de dégradation est plus lent, suite aux interactions inter et intramoléculaires plus accentuées du chitosan, qui ne permettent pas l'accès de l'enzyme aux zones actives pour l'hydrolyse.

On observe aussi le même phénomène dans le cas des films collagène-chitosan II, des films obtenus donc avec du chitosan à la masse moléculaire faible. En ce cas on observe pourtant un niveau plus bas de la dégradation des matériaux par rapport aux films avec du chitosan à la masse moléculaire grande, résultats qui concordent avec les données de la littérature qui indiquent une diminution de la dégradation du chitosan lors de la diminution de la masse moléculaire.<sup>18</sup>

Des données de l'analyse AFM, sont présentées dans les Figures 11-14, on observe que les valeurs de rugosité moyenne carrée (Rrms) et de rugosité moyenne des films non dégradés sont dépendantes de la masse moléculaire moyenne du chitosan utilisé pour obtenir les films.

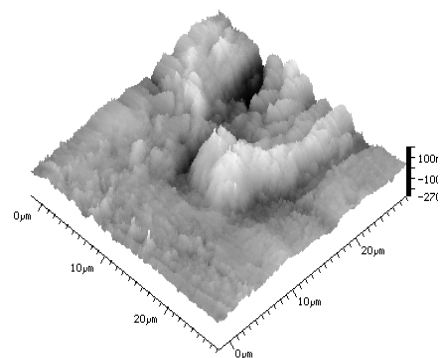


Fig.11 – Film Col/CS I 60/40, w/w  
La valeur de la rugosité (Rrms/Rabs) = (73,94/57,94) nm.

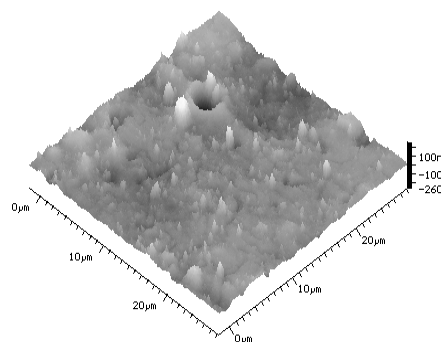


Fig.12 – Film de Col/CSI, 60/40, w/w dégradé par la collagénase  
La valeur de la rugosité (Rrms/Rabs) = (33,59/23,79) nm.

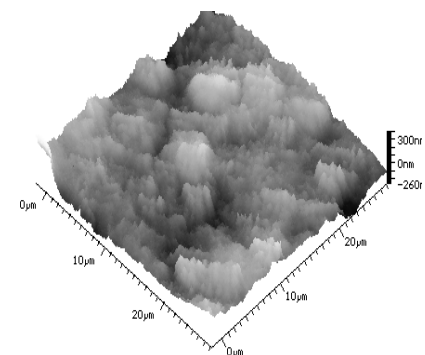


Fig.13 – Film de Col/CS I 60/40, w/w, dégradé par la chitosanase  
La valeur de la rugosité (Rrms/Rabs) = (54,70/39,33) nm.

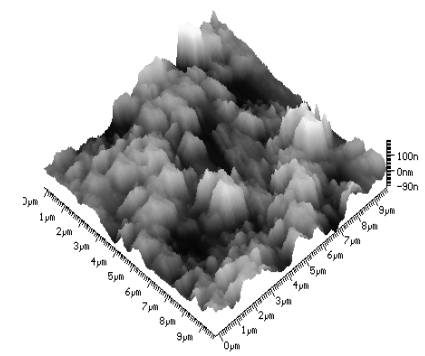


Fig.14 - Film Col/CS II 60/40, w/w  
La valeur de la rugosité (Rrms/Rabs) = (78,54/59,21) nm.

Les résultats indiquent la formation de films plus uniformes dans le cas des systèmes collagène-CS I, c'est en corrélation avec les données rapportées à la compatibilité des polymères, obtenus par l'analyse thermogravimétrique.

Le maintien des films en milieu avec l'enzyme spécifique au collagène, détermine l'écartement de la membrane de fragments de protéine, qu'on observe finalement sur les films dégradés par une diminution de la rugosité. Le phénomène se manifeste aussi dans le cas de l'action de la chitosanase sur les membranes.

## CONCLUSIONS

Des films à base de collagène et de chitosan, synthétisés par le procédé de mélange en solution des biopolymères et la formation par séchage ont été caractérisés par: FTIR, analyse thermogravimétrique, l'évaluation des caractéristiques d'interaction avec des solutions tampon, cinétique et degré de dégradation *in vitro*, sous l'action des enzymes spécifiques (collagénase et chitosanase).

Les valeurs de l'énergie d'activation, évaluées à partir des données de thermogravimétrie, indiquent une compatibilité pour les mélanges Col/CS I à des rapports de composition de 80/20, 60/40, 40/60 et 20/80, tandis qu'ils sont pour les mélanges Col/CS II à des rapports de masse de 80/20 et 60/40. L'accroissement de la masse moléculaire du chitosan améliore la compatibilité à l'état solide dans les mélanges de collagène.

L'interaction des films collagène-chitosan avec des fluides aqueux est dépendante de la composition de ceux-ci et de la valeur de pH de la solution: des valeurs de pH plus hautes, l'accroissement de la teneur en chitosan dans le mélange et la masse moléculaire de celui-ci déterminent l'augmentation de la capacité d'absorption des solutions tampon.

L'introduction du chitosan dans les films de collagène détermine une diminution de la vitesse de dégradation à l'action de la collagénase; plus la quantité de chitosan dans la composition est grande, plus la vitesse et le degré de dégradation diminuent. Les données concernant la cinétique de dégradation *in vitro*, en présence de chitosanase pour les films à base de collagène et de chitosan à la masse moléculaire élevée ont montré une

influence significative du taux de chitosan dans le film polymérique et de la masse moléculaire sur la vitesse et le degré de dégradation. Les résultats montrent la possibilité de régler la vitesse de dégradation des films collagène-chitosan par la modification de la composition et de la masse moléculaire des biopolymères, action d'importance significative dans leurs applications dans la régénération des tissus.

*Remerciement:* Ce travail a été financé par le programme PNII 41017/2007.

## REFERENCE

1. T.Tsuruta, "Biomedical Applications of Polymeric Materials", CRC Press, Boca Raton, 1993, p.18-23.
1. I.Jones, L.Currie et R.Martin, *Brit. J. Plastic Surg.*, **2002**, *55*, 185-193.
2. S.D.Bruck, "Properties of Biomaterials in the Physiological Environment", Boca Raton FL, CRC Press, 1980, p.165-179.
3. M.Jarman-Smith, T. Bodamyali, C. Stevens, J.A.Howell, M. Horrocks et J.B.Chaudhuri, *Biochem.Eng.J.*, **2004**, *20*, 217-222.
4. K. Purna Sai et M.Babu, *Burns*, **2000**, *26*, 54-62.
5. D.Rothamel, F.Schwarz, M.Sager, M.Herten, A.Sculean, J.Becker, *Clin. Oral Implants Res.*, **2005**, *16*, 369-378.
6. H.C.Goo, Y.S.Hwang, Y.R.Choi, H.N.Cho et H.Suh, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 5099-5113.
7. H.O.Ho, C.W.Lin et M.T.Sheu, *J.Controlled Rel.*, **2001**, *77*, 97-105.
8. M.Nemeth-Csoka, *Acta Histochem.*, **1964**, *19*, 249-253.
9. E.Gentleman, A.N.Lay, D.A.Dickerson, E.A.Nauman, G.A.Livesay et K.C.Deer, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 3805-3813.
10. S.N Park., J.K.Kim et H Suh., *Biomaterials*, **2004**, *25*, 3689-3698.
11. T.Taguchi et J.Tanaka, *J.Biomater. Sci.Polym.*, **2002**, *13*, 43-52.
12. F.J.O'Brien, B.A.Harley, I.V.Yannas et L.J.Gibson, *Biomaterials*, **2005**, *26*, 433-441.
13. A.Wang, Q.Ao, W.Cao, C.Zhao, Y.Gong, N.Zhao et X.Zhang, *Tsi. Sci. Eng.*, **2005**, *10*, 449-453.
14. A.Di Martino, M.Sittinger et M.V.Risbu, *Biomaterials*, **2005**, *26*, 5983-5990.
15. A.W. Coats et J. P. Redfern, *Nature*, **1964**, *201*, 68-73.
16. M. Colt., M.D. Bucevschi, "Le valorisation non conventionnel de la peau", Ed. Gh.Asachi Iasi, 1999, p. 308.
17. R.A.A.Muzzarelli, M. Mattioli-Belmonte, M.Miliani, C.Muzzarelli, F. Gabbanelli et G. Biagini, *Carbohydr.Polym.*, **2002**, *48*, 15-21.
18. R. Miranda, J.Yang, C. Roy et C. Vasile, *Polym. Degrad. Stab.*, **2001**, *72*, 469-491.
19. D.Ren, H.Yi, W.Wang et X.Ma, *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 2403-2410.