## PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN MATRICES OBTAINED AT DIFFERENT FREEZING TEMPERATURES

## PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA MATRICILOR DE COLAGEN OBȚINUTE LA DIFERITE TEMPERATURI DE ÎNGHEȚARE

### Madalina Georgiana ALBU<sup>1\*</sup>, Anton FICAI<sup>2</sup>, Adriana LUNGU<sup>3</sup>

<sup>1</sup>INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, 031215, Bucharest, Romania, albu\_mada@yahoo.com

<sup>2</sup>University Politehnica of Bucharest, 313 Spl. Independentei, Bucharest, Romania, anton\_ficai81@yahoo.com

<sup>3</sup>University Politehnica of Bucharest, Department of Polymer Science and Technology, 149 Calea Victoriei, Bucharest, Romania, adriana\_lungu2006@yahoo.com

#### PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN MATRICES OBTAINED AT DIFFERENT FREEZING TEMPERATURES

ABSTRACT. Porous collagen matrices with defined physical, chemical and biological characteristics are interesting materials for tissue engineering and drug delivery systems. In this study type I collagen gels were cross-linked with glutaraldehyde and then dried using different freezing temperatures during the lyophilization process. The obtained matrices were analyzed by DSC, TGA/DTG, FT-IR and SEM. The results show that triple helical structure of collagen is preserved during the lyophilization process and the pore sizes of collagen structure depend on the freezing temperature. KEY WORDS: collagen, freeze-drying, biomaterial, porosity.

#### PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA MATRICELOR DE COLAGEN OBȚINUTE LA DIFERITE TEMPERATURI DE ÎNGHEȚARE

REZUMAT. Matricile poroase de colagen având caracteristici fizice, chimice și biologice bine definite sunt materiale de interes pentru ingineria tisulara și pentru sistemele de cedare a medicamentelor. În acest studiu, gelurile de colagen de tip I au fost reticulate cu glutaraldehidă și apoi uscate utilizând diferite temperaturi de înghețare în timpul procesului de liofilizare. Matricile obținute au fost analizate prin metodele DSC, TGA/DTG, FT-IR și SEM. Rezultatele demonstrează că structura triplu helicoidală a colagenului se păstrează în timpul procesului de liofilizare și dimensiunile porilor din structura colagenului depind de temperatura de înghețare. CUVINTE CHEIE: colagen, liofilizare, biomaterial, porozitate.

#### PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DE MATRICES DE COLLAGÈNE OBTENUES À DES TEMPÉRATURES DE CONGÉLATION DIFFÉRENTES

RÉSUMÉ. Les matrices poreuses de collagène ayant des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques définies sont intéressantes pour l'ingénierie tissulaire et les systèmes de distribution des médicaments. Dans cette étude, les gels de collagène de type I ont été réticulés avec du glutaraldéhyde, puis séchés en utilisant des températures de congélation différentes pendant le processus de lyophilisation. Les matrices obtenues ont été testées par DSC, TGA/DTG, FT-IR et MEB. Les résultats montrent que la structure en triple hélice de collagène est préservée pendant le processus de lyophilisation et la taille des pores de la structure du collagène dépend de la température de congélation.

MOTS CLÉS: collagène, lyophilisation, biomaterial, porosité.

### INTRODUCTION

The use of collagen as biocompatible and bioresorbable biomaterial is well known both at international and national level. Irrespective of the progress in the field of biomaterials based on synthetic polymers, collagen remains one of the most important natural biomaterials for connective tissue prosthetic in which it is the main protein [1-9].

Collagen is the main structural protein of the majority of soft, hard and soft and rigid connective tissues (skin, bone, tendon, basal membrane, etc.),

## INTRODUCERE

Utilizarea colagenului ca biomaterial biocompatibil și bioresorbabil este bine cunoscută pe plan național și internațional. Indiferent de progresul în domeniul biomaterialelor pe bază de polimeri sintetici, colagenul rămâne unul din cele mai importante biomateriale naturale pentru protezele pentru țesutul conjunctiv, în care acesta este principala proteină [1-9].

Colagenul este principala proteină structurală a majorității țesuturilor conjunctive moi, dure și a celor moi și rigide (piele, os, tendon, membrană bazală, etc.),

<sup>\*</sup> Correspondence to: Madalina Georgiana ALBU, INCDTP – Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu, 031215, Bucharest, Romania, email: albu\_mada@yahoo.com

which mainly ensure the tissue's structural integrity [1, 10].

The main source of type I collagen is the dense connective tissue of animal skin. In order to use it as a biomaterial, the extracted collagen structure must be as close as possible to the native one characteristic for the collagen molecule [15].

Renaturation, chemical modification, compatibility with bioactive compounds, drying or conditioning in the final form are considered as key operations in the processes elaborated for obtaining biomaterials based on undenatured collagen [1].

Cross-linking lead to the formation of supplementary chemical bonds among collagen molecules and/or fibrils, increasing the mechanical and chemical stability and thus decreasing the biodegradability.

Chemical cross-linking consists in collagen's reaction with aldehydes, diisocyanates, carboimides, acyl-azide, polyepoxydes and polyphenolic compounds which leads to the formation of ionic or covalent bonds between molecules and fibrils.

Glutaraldehyde (GA) is one of the most used cross-linking agents due to its great efficiency in stabilization of collagen biomaterials. Cross-linking with GA involves reactions of aldehyde groups with the free -amino groups of lysine or hydroxylisine from the polypeptide chains [20].

The collagen-based biomaterials have a large variety of forms and applications, presented – together with the conditioning processes – in Table 1 [1, 16, 22].

care asigură integritatea structurală a țesutului [1, 10].

Principala sursă de colagen de tip I este ţesutul conjunctiv dens al pielii animale. Pentru a fi utilizat ca biomaterial, structura de colagen extrasă trebuie să fie cât mai aproape de cea originală caracteristică moleculei de colagen [15].

Renaturarea, modificarea chimică, compatibilitatea cu compuși bioactivi, uscarea sau condiționarea în formă finală sunt considerate operațiuni cheie în procesele elaborate pentru a obține biomateriale pe bază de colagen nedenaturat [1].

Reticularea duce la formarea legăturilor chimice suplimentare între moleculele de colagen şi/sau fibrile, sporind stabilitatea mecanică și chimică, și astfel diminuând biodegradabilitatea.

Reticularea chimică constă în reacția colagenului cu aldehide, diizocianați, carboimide, acil-azide, compuși poliepoxidici și polifenolici care duc la formarea legăturilor ionice sau covalente între molecule și fibrile.

Glutaraldehida (GA) este unul din cei mai utilizați agenți de reticulare datorită eficienței mari în stabilizarea biomaterialelor colagenice. Reticularea cu GA implică reacții ale grupelor aldehidice cu grupele amină libere ale lizinei sau ale hidroxilizinei din lanțurile polipeptidice [20].

Biomaterialele pe bază de colagen au o mare varietate de forme și aplicații, prezentate – împreună cu procesele de condiționare – în Tabelul 1 [1, 16, 22]. Table 1: Physical forms, conditioning processes and applications of collagen biomaterials [1, 16, 22] Tabelul 1: Forme fizice, procese de condiționare și aplicații ale biomaterialelor colagenice [1, 16, 22]

Biomaterial form	Conditioning process	Medical applications
Forma biomaterialului	Proces de condiționare	Aplicații medicale
Gels/hydrogels Geluri/filme	Chemical and physical modifications (cross-linking) <i>Modificări chimice și fizice</i> (reticulare)	<ul> <li>Supports for the release both of drugs and bioactive substances;</li> <li>Suporturi pentru cedarea medicamentelor şi a substanţelor bioactive;</li> <li>Injectables into ocular vitreous body or under the skin;</li> <li>Injectabile în corpul vitros ocular sau subcutanat;</li> <li>Cosmetics.</li> <li>Cosmetice.</li> </ul>
Membranes/films <i>Membrane/filme</i>	Free drying <i>Uscare liberă</i>	<ul> <li>Dialysis membranes;</li> <li>Membrane pentru dializă;</li> <li>Antiadhesion membranes;</li> <li>Membrane antiadezive;</li> <li>Drug delivery systems;</li> <li>Sisteme de cedare a medicamentelor;</li> <li>Patches;</li> <li>Plasturi;</li> <li>Guided tissue regeneration membranes.</li> <li>Membrane pentru regenerate tisulară dirijată.</li> </ul>
Spongious (matrices, fibres) Bureți spongioși (matrice, fibre)	Reorganization, lyophilisation <i>Reorganizare, liofilizare</i>	<ul> <li>Burn dressings;</li> <li>Pansamente pentru arsuri;</li> <li>Haemostatics;</li> <li>Hemostatice;</li> <li>Three-dimensional cell culture scaffold.</li> <li>Schelet tridimensional pentru culturi de celule.</li> </ul>
Sutures Suturi Tubes Tuburi Composites Compozite	Extrusion, free drying Extrudere, uscare liberă Free drying, lyophilisation Uscare liberă, liofilizare Free drying, lyophilisation Uscare liberă, liofilizare	<ul> <li>Surgery sutures.</li> <li>Suturi pentru operații chirurgicale.</li> <li>Nerve and sanguine vessel regeneration.</li> <li>Regenerarea nervilor și a vaselor sanguine.</li> <li>Drug delivery systems.</li> <li>Sisteme de cedare a medicamentelor.</li> </ul>
- Collagen-synthetic polymer - <i>Colagen-polimer sintetic</i>		<ul> <li>Vascular regeneration;</li> <li>Regenerare vasculară;</li> <li>Skin regeneration;</li> <li>Regenerarea pielii;</li> <li>Wound dressings.</li> <li>Pansamente pentru răni.</li> </ul>
<ul> <li>Collagen-natural polymer</li> <li>Colagen-polimer natural</li> <li>Collagen-ceramics</li> <li>Colagen-ceramică</li> </ul>		<ul> <li>Soft tissue regeneration.</li> <li>Regenerarea ţesutului moale.</li> <li>Bone filler materials;</li> <li>Materiale pentru reconstrucţie osoasă;</li> <li>Hard tissue regeneration.</li> <li>Regenerarea tesuturilor dure</li> </ul>

Porous scaffolds have been used extensively in tissue engineering to provide a three-dimensional structure for both *in vitro* studies of cell-scaffold interactions and tissue synthesis, as well as *in vivo* studies of induced tissue and organ regeneration [23].

Pore structure is an essential consideration in the development of scaffolds for tissue engineering. Pores must be interconnected to allow for cell growth, migration and nutrient flow. If pores are too small, cell migration is limited, resulting in the formation of a cellular capsule around the edges of the scaffold. Conversely, if pores are too large there is a decrease in surface area limiting cell adhesion [24].

The objective of this study was to develop a method to produce a more uniform collagen matrix. We used freeze-drying (lyophilization) process as method of obtaining collagen matrices. In order to vary porosity of matrices we modified freezing rates during freeze-drying process. The obtained collagen matrices were characterized by FT-IR spectroscopy, thermal analysis (TGA/DTG and DSC) and scanning electron microscopy.

## MATERIALS AND METHODS

Collagen gel was obtained from bovine skin using the protocol that has been previously described [25]. Collagen gel having 1.4 % collagen, pH 7.4 has crosslinked with 0.25% glutaraldehyde (Merck, Germany) (reported to dry substance). This concentration was chosen as a result of many tests of biocompatibility of such collagen matrices [26].

The collagen gels were freeze-dried using the Delta 2-24 LSC Christ (Germany) freeze-dryer varying the freezing temperature. The collagen gels were cast in polystyrene Petri dishes of 3 cm diameter at 20°C. They were frozen at 0, -10, -20, -30 and -40°C and kept at this temperature for 4 h, then were heated with 1°C/hour (40 h) at 0.12 mbar and then heated (4 h) to 30°C at 0.01 mbar.

The ATR-FTIR spectra were recorded on a VERTEX 70 BRUCKER spectrometer. All FTIR measurements were performed in an ATR-FTIR cell on Ge crystal, at room temperature. The spectra were recorded using 32 scans with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> in 600-4000 cm<sup>-1</sup>

Suporturile poroase (matricile) sunt folosite extensiv în ingineria tisulară pentru a oferi o structură tridimensională atât pentru studiile *in vitro* ale interacțiunilor celulă-schelet și a sintezei tisulare, cât și în studiile *in vivo* ale țesuturilor induse și ale regenerării de organe [23].

Structura porilor este un element esențial în dezvoltarea scheletelor pentru ingineria tisulară. Porii trebuie să fie interconectați pentru a permite creșterea și migrarea celulelor, precum și fluxul de nutrienți. Dacă porii sunt prea mici, migrarea celulelor este limitată, având ca rezultat formarea unei capsule celulare în jurul marginilor suportului. Invers, dacă porii sunt prea mari, are loc o scădere a suprafeței, limitând adeziunea celulară [24].

Obiectivul acestui studiu a fost dezvoltarea unei metode pentru obținerea unei matrici de colagen mai uniformă. S-a utilizat procesul de uscare prin liofilizare ca metodă de obținere a matricilor de colagen. Pentru a varia porozitatea matricilor, s-au modificat vitezele de înghețare din timpul procesului de liofilizare. Matricile de colagen obținute au fost caracterizate prin spectroscopie FT-IR, analiză termică (TGA/DTG și DSC) și microscopie electronică de baleiaj (SEM).

## MATERIALE ȘI METODE

Gelul de colagen a fost obținut din piele bovină utilizând protocolul descris mai înainte [25]. Gelul de colagen având 1,4 % colagen, pH de 7,4 a fost reticulat cu 0,25% glutaraldehidă (Merck, Germania) (în raport cu substanța uscată). Această concentrație a fost aleasă în urma mai multor teste de biocompatibilitate ale matricilor de colagen de acest fel [26].

Gelurile de colagen au fost uscate prin congelare utilizând liofilizatorul Delta 2-24 LSC Christ (Germania) variind temperatura de înghețare. Gelurile de colagen au fost turnate în cutii Petri din polistiren cu diametrul de 3 cm la 20°C, apoi au fost congelate la 0, -10, -20, -30 și -40°C, și păstrate la această temperatură timp de 4 h, apoi au fost încălzite cu 1°C/oră (40 h) la 0,12 mbar și apoi încălzite (4 h) la 30°C la 0,01 mbar.

Spectrele ATR-FTIR au fost înregistrate cu un spectrometru VERTEX 70 BRUCKER. Toate măsurătorile FTIR au fost efectuate într-o celulă ATR-FTIR pe un cristal de Ge, la temperatura camerei. Spectrele au fost region.

The DSC curves of collagen matrices were recorded on a Netzch equipment, under nitrogen atmosphere, within the temperature range 25-250°C, using a heating rate of 10°C/min. The TGA curves were recorded on a Q500 TA instrument at 10°C/min heating rate, from 25°C to 150°C, under nitrogen atmosphere.

The scanning electron microscopic (SEM) images were recorded using a Hitachi S-2600N scanning electron microscope with EDX spindle and a resolution of up to 4 nm (at 25 kV, in high vacuum when secondary electron detector was used) and a 15-300x magnification (accelerating voltage from 0.5 kV to 30 kV).

# **RESULTS AND DISCUSSIONS**

Collagen matrices – macro-, micro- or nanoporous structures are obtained by freeze-drying of collagen solutions/gels [24, 25]. These can be chemically crosslinked to stabilize the structure. Cross-linking can be made either in gel phase or in dry state, after freezedrying. The matrix porous structure depends significantly on collagen concentration. Other factors which contribute to the porous structure are: freezing rate, size of gel fibrils and the presence or absence of other polymers [26]. The obtained matrices have pore sizes ranging between 50 and 1500  $\mu$ m and apparent density of 0.05-0.30 g/cm<sup>3</sup> [16].

Freeze-drying is an advantageous conditioning technique which consists of drying frozen samples by ice sublimation into vacuum. The freeze-drying process of collagen gels/solutions takes place in two steps: fast freezing followed by drying. First the free water is removed, and then the water bound to the collagen polar groups [16]. Pores take the place of ice crystals and collagen renaturates forming fibrils and fibres. The biomaterials obtained are spongious; they are called matrices and have properties similar to the extracellular matrix [1].

Also, we use this technique of drying because low temperatures protect the active material during processing, freeze-drying is a process approved by regulatory authorities, freeze-drying can be performed under sterile conditions, the dried product can be rapidly rehydrated [27]. înregistrate utilizând 32 de scanări cu rezoluția de 4 cm<sup>-1</sup> în regiunea 600-4000 cm<sup>-1</sup>.

Curbele DSC ale matricilor de colagen au fost înregistrate cu un aparat Netzch, în atmosferă de azot, în intervalul de temperatură 25-250°C, utilizând o viteză de încălzire de 10°C/min. Curbele TGA au fost înregistrate cu un aparat Q500 TA la viteza de încălzire de 10°C/min, de la 25°C la 150°C, în atmosferă de azot.

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) au fost înregistrate utilizând un microscop electronic de baleiaj Hitachi S-2600N cu analizor EDX și o rezoluție de până la 4 nm (la 25 kV, în vid când s-a utilizat detectorul electronic secundar) și cu mărire de 15-300 x (tensiune de accelerare de la 0,5 kV la 30 kV).

# **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

Matricile de colagen – macrostructuri, microstructuri sau structuri nanoporoase sunt obținute prin liofilizarea soluțiilor/gelurilor de colagen [24, 25]. Acestea pot fi reticulate chimic pentru a stabiliza structura. Reticularea poate fi efectuată fie în faza de gel, fie în stare uscată, după liofilizare. Structura poroasă a matricei depinde foarte mult de concentrația de colagen. Alți factori care contribuie la structura poroasă sunt: viteza de congelare, dimensiunea fibrilelor în gel și prezența sau absența altor polimeri [26]. Matricile obținute au pori de dimensiuni cuprinse între 50 și 1500 µm și densitatea aparentă de 0,05-0,30 g/cm<sup>3</sup> [16].

Liofilizarea este o tehnică de condiționare avantajoasă care constă în uscarea probelor congelate prin sublimarea gheții în vid. Procesul de liofilizare a soluțiilor/gelurilor de colagen are loc în două etape: congelarea rapidă urmată de uscare. Mai întâi se îndepărtează apa liberă, apoi cea legată de grupele polare ale colagenului [16]. Porii se formează în locul cristalelor de gheață și colagenul se renaturează formând fibrile și fibre. Biomaterialele obținute sunt spongioase, se numesc matrici și au proprietăți similare matricei extracelulare [1].

De asemenea, această tehnică de uscare se utilizează deoarece temperaturile joase protejează materialul activ în timpul prelucrării; liofilizarea este un proces aprobat de autoritățile de reglementare; The freeze-drying consists of a sequence of three distinct processes:

1. cooling below the freezing temperature T<sub>r</sub>;

 sublimation of ice at subfreezing temperature, usually performed under reduced pressure;

3. the removal of residual, unfrozen water from the solidified solution.

The whole process can thus be divided into five distinct stages:

1. the solution, suitably formulated, is frozen on refrigerated shelves;

2. the chamber pressure is reduced to the desired value and the ice is sublimed by the supply of heat to the product, and water vapours are removed from the chamber and condensed as ice; (primary drying);

3. the remaining unfrozen water trapped in the product is removed by further warming at a controlled rate; (secondary drying);

4. the containers are sealed and removed from the drier;

5. the condenser is heated to melt and remove the collected ice.

Figure 1 shows the freeze-drying graph chart according to the pre-established program.

liofilizarea poate fi efectuată în condiții sterile, produsul uscat putând fi rehidratat rapid [27].

Liofilizarea constă într-o secvență de trei procese distincte:

1. răcirea sub temperatura de înghețare T<sub>f</sub>;

2. sublimarea gheții sub temperatura de înghețare, de obicei efectuată la presiune redusă;

3. îndepărtarea apei reziduale, necongelate din soluția solidificată.

Întregul proces poate fi împărțit în cinci etape distincte:

1. soluția, corect formulată, este congelată pe rafturi frigorifice;

 presiunea camerei este redusă la valoarea dorită şi gheaţa este sublimată prin furnizarea de căldură produsului, iar vaporii de apă sunt eliminaţi din cameră şi condensaţi sub formă de gheaţă; (uscare primară);

3. apa necongelată rămasă în produs este îndepărtată încălzind în continuare la viteză controlată (uscare secundară);

4. vasele sunt sigilate și îndepărtate din liofilizator;

5. condensatorul este încălzit până la topire şi gheața colectată este îndepărtată.

Figura 1 indică graficul procesului de liofilizare conform programului prestabilit.



Figure 1. Graph chart of freeze-drying process Figura 1. Graficul procesului de liofilizare

As we can see in Figure 1, the process is controlled by three parameters: temperature, pressure and time.

In order to know if the collagen kept the structure during the freeze-drying process the FT-IR spectroscopy and thermal analyses were performed for only one sample because all samples have the same composition.

Triple helical structure characteristic for the collagen molecule is a rigid one because of the strong hydrogen bonds existing between the hydroxyl groups of hydroxyproline and amine groups of glycine which lead to the formation of a fibrous crystalline zone embedded into an amorphous matrix [28].

Given the collagen biphasic structure, two successive endothermic processes are highlighted when temperature increases: the first (I) consists of collagen dehydration, which takes place within the temperature range 25-125°C and refers to the amorphous zone, and the second one (II) in crystalline (rigid) melting zone, taking place between about 210 and 250°C, which is followed by the dried collagen thermal degradation or oxidation [29, 30], depending on the environment – inert or air – in which the heating takes place.

Collagen hydrothermal stability is given by the shrinkage temperature, also named denaturation temperature, which measures the temperature of transition of collagen molecule conformation from triple helix to statistic coil [16].

Figure 2 shows the DSC curve for collagen matrix in nitrogen flow. The shrinkage temperature is 77.2°C, indicating good hydrothermal stability of the sample. După cum se poate vedea în Figura 1, procesul este controlat de 3 parametri: temperatura, presiunea și timpul.

Pentru a ști dacă colagenul și-a păstrat structura în timpul procesului de liofilizare, au fost efectuate spectroscopia FT-IR și analizele termice pentru o singură probă, deoarece toate probele au aceeași compoziție.

Structura triplu elicoidală caracteristică moleculei de colagen este una rigidă datorită legăturilor puternice de hidrogen existente între grupările hidroxil ale hidroxiprolinei și ale grupărilor amino ale glicinei care duc la formarea unei zone cristaline fibroase încorporată într-o matrice amorfă [28].

Având structura bifazică a colagenului, două procese endotermice succesive sunt evidențiate când crește temperatura: primul (I) constă în deshidratarea colagenului, care are loc în intervalul de temperatură 25-125°C și se referă la zona amorfă, și al doilea (II) în zona cristalină (rigidă) de topire, având loc între 210 și 250°C, urmată de degradarea termică a colagenului uscat sau oxidare [29, 30], în funcție de mediul – inert sau aer – în care are loc încălzirea.

Stabilitatea hidrotermică a colagenului este dată de temperatura de contracție, numită și temperatură de denaturare, care măsoară temperatura de tranziție a conformației moleculei de colagen de la triplu helix la ghem statistic [16].

Figura 2 arată curba DSC pentru matricea de colagen în flux de azot. Temperatura de contracție este 77,2°C, indicând o bună stabilitate hidrotermică a probei.



Figure 2. DSC curve for the collagen matrix Figura 2. Curba DSC pentru matricea de colagen

Melting temperature is a measure of the strength of bonds between the collagen triple helices. DSC curve in nitrogen atmosphere for the matrix, represented in Figure 2, shows that under gradual heating two types of processes take place: initial dehydration followed by the actual melting process. The melting temperature is 219°C.

TGA and DTG analyses (Figure 3) are ascribed to the evaporation of water corresponding to 5% of weight loss below 37°C. Temperatura de topire este o măsură a puterii legăturilor dintre triplu helixurile colagenului. Curba DSC în atmosferă de azot pentru matrice, reprezentată în Figura 2, arată că la încălzire treptată, au loc două tipuri de procese: deshidratare inițială urmată de procesul de topire propriu-zis. Temperatura de topire este 219°C.

Analizele TGA și DTG (Figura 3) sunt atribuite evaporării apei corespunzând unei pierderi de greutate de 5% sub 37°C.



Figure 3. TGA/DTG curves for the collagen matrix Figura 3. Curbele TGA/DTG pentru matricea de colagen

When increasing the temperature the weight residues started to decline sharply at around 300°C due to thermal degradation. The predominant peak on the DTG curves for the collagen matrix is 313.8°C. The weight loss at 700°C is 79.14%.

The characteristic peaks of collagen are: 3318 cm<sup>-1</sup> (amide A), 2926 cm<sup>-1</sup> (amide B), 1669 cm<sup>-1</sup> (amide I), 1553 cm<sup>-1</sup> (amide II) and 1240 cm<sup>-1</sup> (amide III) as shown in Figure 4 for the collagen matrix, values in agreement with the literature data [31, 32].

Odată cu creșterea temperaturii, reziduurile de greutate au început să scadă brusc la aproximativ 300°C datorită degradării termice. Vârful predominant la curbele DTG pentru matricea de colagen este 313,8°C. Pierderea de greutate la 700°C este de 79,14%.

Benzile FT-IR caracteristice colagenului sunt: 3318 cm<sup>-1</sup> (amida A), 2926 cm<sup>-1</sup> (amida B), 1669 cm<sup>-1</sup> (amida I), 1553 cm<sup>-1</sup> (amida II) și 1240 cm<sup>-1</sup> (amida III), după cum sunt indicate în Figura 4 pentru matricea de colagen; valorile sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate [31, 32].



Figure 4. FT-IR spectra for the collagen matrix Figura 4. Spectrele FT-IR pentru matricea de colagen

The characteristic collagen bands indicate that triple helix structure was preserved in all the samples. Both DSC and TGA/DTG analyses suggested that the collagen matrix is one with decreased degradation rate.

The collagen matrix morphological structure is important, influencing the hydrophilicity, degradation properties and interaction with cells. Matrix morphology was determined by pore shape and size through scanning electron microscopy.

Figure 5 a, b, c, d, e shows the SEM images obtained for collagen matrices obtained by different temperature of freezing during the freeze-drying process.

Benzile caracteristice ale colagenului indică faptul că structura triplu helicoidală s-a păstrat la toate probele. Analizele DSC și TGA/DTG sugerează că matricea de colagen are o viteză de degradare scăzută.

Structura morfologică a matricei de colagen este importantă, influenţând hidrofilia, proprietăţile de degradare şi interacţiunea cu celulele. Morfologia matricei a fost determinată de forma şi dimensiunea porilor prin microscopia electronică de baleiaj.

Figura 5 a, b, c, d, e arată imaginile SEM realizate pentru matricele de colagen obținute prin diferite temperaturi de înghețare în timpul procesului de liofilizare.



a)











e)

Figure 5. SEM image of collagen matrices obtained at: a) 0°C, b) -10°C; c) -20°C; d) -30°C; e) -40°C freezing temperature, 50x magnification Figura 5. Imagini SEM ale matricelor de colagen obţinute la temperaturi de îngheţare de: a) 0°C, b) -10°C; c) -20°C; d) -30°C; e) -40°C, mărire 50x

The matrix morphology was investigated by pore size measuring using scanning electron microscopy. Images from Figure 5 show differences between pore sizes of collagen matrices obtained at: 0, -10, -20, -30 and -40°C freezing temperature.

Comparing the SEM images from Figure 5 it can be noticed that lower freezing temperature produces more homogeneous samples than high freezing temperature. High differences of pore sizes and shape Morfologia matricei a fost investigată prin măsurarea dimensiunilor porilor utilizând microscopia electronică de baleiaj. Imaginile din Figura 5 arată diferențe între dimensiunile porilor din matricele de colagen obținute la temperaturi de înghețare de 0, -10, -20, -30 și -40°C.

Comparând imaginile SEM din Figura 5, se poate observa că temperaturile de înghețare mai mici produc probe mai omogene decât temperaturile de înghețare appear between matrix frozen at 0 and -40°C. The most homogeneous structure of matrix with the smallest pore sizes is the one frozen at -40°C. The smallest pore sizes were recorded for matrices obtained at the lowest temperature of freezing.

# CONCLUSIONS

Collagen matrices with different pore sizes can be produced by lyophilization with the use of a constant freezing temperature. The matrices preserved their triple helical structure during lyophilization process. This is demonstrated by hydrothermal stability and by the characteristic collagen bands. The most homogeneous structure of matrix with the smallest pore sizes is the one frozen at -40°C. These results indicate that significantly more uniform porous scaffolds can be manufactured for use in drug (essential oils) delivery systems using a constant freezing rate freezing technique.

#### Acknowledgements

This research was financially supported by Bilateral Cooperation Romania – Turkey project no. 377/2010 from ANCS.

ridicate. Diferențe majore între dimensiunile și formele porilor apar între matricea congelată la 0 și la -40°C. Cea mai omogenă structură a matricei cu cele mai mici dimensiuni ale porilor este cea congelată la -40°C. Cele mai mici dimensiuni ale porilor au fost înregistrate pentru matricea obținută la cea mai mică temperatură de înghețare.

# CONCLUZII

Matricile de colagen cu pori de dimensiuni diferite pot fi realizate prin liofilizare utilizând o temperatură de înghețare constantă. Matricile și-au păstrat structura triplu helicoidală în timpul procesului de liofilizare. Acest fapt este demonstrat de stabilitatea hidrotermică și de benzile caracteristice ale colagenului. Cea mai omogenă structură a matricei cu cele mai mici dimensiuni ale porilor este cea congelată la -40°C. Aceste rezultate arată că pot fi realizate matrici poroase mult mai uniforme pentru sistemele de cedare a medicamentelor (uleiuri esențiale) utilizând o tehnică de congelare cu viteză de înghețare constantă.

#### Mulţumiri

Această cercetare a fost susținută financiar de Cooperarea Bilaterală România – Turcia, proiect nr. 377/2010 din ANCS.

# REFERENCES

- 1. Trandafir, V., Popescu, G., Albu, M.G., Iovu, H., Georgescu, M., Collagen-based Bioproducts, Ars Docendi, Bucharest, **2007**.
- Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M., Murphy, G.F., "Synthesis and Characterization of a Model Extracellular Matrix that Induces Partial Regeneration of Adult Mammalian Skin", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, **1989**, 86,933-7.
- 3. Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., "Cellular Materials as Porous Scaffolds for Tissue Engineering", *Prog. Mat. Sci.*, **2001**, 46, 273-82.
- 4. Schoof, H., Apel, J., Heschel, I., Rau, G., "Control of Pore Structure and Size in Freeze-dried Collagen Sponges", J. Biomed. Mater. Res., 2001, 58, 352-7.
- 5. Yannas, I.V., Tissue and Organ Regeneration in Adults, Springer, New York, 2001.
- 6. Yannas, I.V., "Biologically Active Analogs of the Extracellular Matrix Artifcial Skin and Nerves", Angewandte Chemie-Int. Ed., **1990**, 29, 20-35.

- Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., Juliano, R.L., "Integrin Signaling and Cell Growth Control", Curr. Opin. Cell Biol., 1998, 10, 220-31.
- van Tienen, T.G., Heijkants, R.G.J.C., Buma, P., de Groot, J.H., Pennings, A.J., Veth, R.P.H., "Tissue Ingrowth and Degradation of Two Biodegradable Porous Polymers with Different Porosities and Pore Sizes", *Biomaterials*, 2002, 23, 1731-8.
- 9. Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T., "Collagens Structure, Function, and Biosynthesis", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2003**, 55, 1531-46.
- 10. Ramachandran, G.N., "Structure of Collagen at the Molecular Level", in Treatise on Collagen, ed. Ramachandran, G.N., Academic Press, London, **1967**.
- 11. Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., "Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potential for Therapy", Ann. Rev. Biochem., **1995**, 64, 403-34.
- 12. Burjanadze, T.V., "Thermodynamic Substantiation of Water-bridged Collagen Structure", *Biopolymers*, **1992**, 32, 941-9.
- 13. Bella, J., Brodsky, B., Berman, H.N., "Hydration Structure of a Collagen Peptide", Structure, 1995, 3, 893-906.
- 14. Iordăchescu, D., Câmpean A., Stan, C., "Extracellular Matrix Modeling. Applications in Tissue Engineering", Pro-Transilvania, Bucharest, **2004**.
- 15. Miyata, T., Patent No. US 4260228, 1981.
- 16. Park, J.B. Biomaterials: Principles and Application, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- 17. Leca, M., Trandafir, V., Albu, M., "Preparation and Characterization of some Collagen Gels and Matrices", "Ovidius" Annals of Medicine Sci. Pharmacy, 2003, 1, 84-92.
- 18. Wallace, D.G., Rosenblatt, J., "Collagen Gel Systems for Sustained Delivery and Tissue Engineering", Adv. Drug Delivery Rev., 2003, 55, 1631-49.
- 19. Li, S.T., Golub, E., Katz, E.P., "An Electrostatic Side Chain Complimentarity in Collagen Fibrils", J. Mol. Biol., **1975**, 98, 835-9.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., "Mechanical and Thermal Properties of Gelatin Films at Different Degrees of Glutaraldehyde Crosslinking, *Biomaterials*, 2001, 22, 763-8.
- 21. Gustavsson, H., The Chemistry of Tanning Processes, New York, Academic Press, 1956.
- 22. Miyata, T., Taira, T., "Collagen Engineering for Biomaterial Use", Clin. Mater., 1992, 9, 139-48.
- 23. O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., Gibson, L., "Influence of Freezing Rate on Pore Structure in Freeze-dried Collagen-GAG Scaffolds", *Biomaterials*, **2004**, 25, 1077-86.
- 24. Murphy, C.M., Haugh, M.G., O'Brien, F.J., "The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, **2010**, 31, 461-6.
- 25. Albu, M.G., "Collagen Gels and Matrices with Different Hydration Degrees and Cvasisolid Structure for Biomedical Applications", Doctoral Thesis, University of Bucharest, **2009**.
- Titorencu, I., Albu, M.G., Giurginca, M., Jinga, V., Antoniac, I., Trandafir, V., Cotrut, C., Miculescu, F., Simionescu, M., "In vitro Biocompatibility of Human Endothelial Cells with Collagen-Doxycycline Matrices", *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2010, 522, 82-96.
- 27. Franks, F., Auffret, T., Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals, RCS Publishing, 2008.
- Popescu, C., Budrugeac, P., Wortmann, F.-J., Miu, L., Demco, D.E., Baias, M., "Assessment of Collagen-based Materials which are Supports of Cultural and Historical Objects", *Polym. Degrad., Stabil.*, 2008, 93, 976-82.
- 29. Budrugeac, P., Trandafir, V., Albu, M.G., "The Effect of the Hydration Degree on the Hydrotermal and Thermooxidative Stability of some Collagenous Matrices", J. Therm. Anal. Calorim., 2003, 72, 581-5.
- 30. Miu, L., Chelaru, C., Vîlsan, M., Plavan, V., "Leather Evaluation by Optical Microscopy Methods", *Leather and Footwear Journal*, **2009**, 9(2), 75-86.
- 31. Albu, M.G., Ghica, M.V., Giurginca, M., Trandafir, V., Popa, L., Cotruţ, C., "Spectral Characteristics and Antioxidant Properties of Tannic Acid Immobilized in Drug Delivery Systems", *Rev. Chim.* (Bucharest), **2009**, 60, 666-72.
- 32. Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C.J., Wess, T.J., "The Photochemical Stability of Collagenchitosan Blends", J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2004, 162, 545-54.