

RHEOLOGICAL BEHAVIOUR OF SOME COLLAGEN EXTRACTS

COMPORTAREA REOLOGICĂ A UNOR EXTRACTE COLAGENICE

Madalina Georgiana ALBU¹, Mihaela Violeta GHICA^{2*}, Keyong TANG³, Jie LIU³, Gheorghe COARA¹

¹ INCIDTP – Division Leather and Footwear Research Institute, Collagen Department, 93 Ion Minulescu Str., 031215, Bucharest, Romania, e-mail: albu_mada@yahoo.com

² "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Physical and Colloidal Chemistry Department, 6 Traian Vuia Str., 020956, Bucharest, Romania, email: mihaelaghica@yahoo.com

³ Zhengzhou University, College of Materials Science & Engineering, 450052, Zhengzhou, China, email: keyongtang@yahoo.com.cn

RHEOLOGICAL BEHAVIOUR OF SOME COLLAGEN EXTRACTS

ABSTRACT. Collagen extracts such as hydrogel, gelatin and hydrolysate were obtained from bovine hide. They were characterized by physical-chemical properties such as dry substance, total nitrogen, ash, fat, proteic substance (calculated from nitrogen content) and pH. Then, the analysed collagen extracts were adjusted at 1% collagen, pH 7.4 in order to be used as main components in drug delivery systems. The rheological properties of collagen hydrogel, gelatin and hydrolysate were determined and the following rheological models were established: Ostwald-de Waele for hydrolysate and gelatin and Herschel-Bulkley for hydrogel.

KEY WORDS: collagen, hydrogel, gelatin, hydrolysate, rheology.

COMPORTAREA REOLOGICĂ A UNOR EXTRACTE COLAGENICE

REZUMAT. Extracte colagenice sub formă de hidrogel, gelatină și hidrolizat au fost obținute din piele de bovină. Acestea au fost caracterizate prin proprietăți fizico-chimice ca substanță uscată, azot total, cenușă, grăsimi, substanță proteică și pH. Apoi, extractele colagenice analizate au fost aduse la 1% colagen și 7.4 pH pentru a fi utilizate ca component principal în sistemele de eliberare a medicamentelor. Au fost determinate proprietățile reologice ale hidrogelului, gelatinei și hidrolizatului și au fost stabilite următoarele modele reologice: Ostwald-de Waele pentru hidrolizat și gelatină și Herschel-Bulkley pentru hidrogel.

CUVINTE CHEIE: colagen, hidrogel, gelatină, hidrolizat, reologie.

LE COMPORTEMENT RHÉOLOGIQUE DES EXTRAITS DE COLLAGÈNE

RÉSUMÉ. Des extraits de collagène sous forme d'hydrogel, gélatine et hydrolysat ont été obtenus à partir de peau de bovin. Ceux-ci ont été caractérisés par des propriétés physico-chimiques telles que les matières solides, l'azote total, les cendres, les lipides, les substances protéiques et le pH. Les extraits de collagène analysés ont été ajustés à 1% collagène et 7,4 pH afin d'être utilisés en tant que composants principaux dans des systèmes de délivrance de médicaments. On a déterminé les propriétés rhéologiques de l'hydrogel, de la gélatine et de l'hydrolysat et les suivants modèles rhéologiques ont été établis: Ostwald-de Waele pour l'hydrolysat et la gélatine et Herschel-Bulkley pour l'hydrogel.

MOTS CLÉS: collagène, hydrogel, gélatine, hydrolysat, rhéologie.

INTRODUCTION

The main source for obtaining type I fibrillar collagen is animal skin and collagen extraction is performed by different technologies, the oldest one being the boiling of tissue in water, which denatures collagen and results in the well known gelatin [1]. According to the classification by Trandafir et al. [1] technologies for collagen extraction are divided into technologies for extraction of denatured and undenatured collagen.

The collagen in form of fiber suspensions – collagen paste, fibrillar gel and colloidal solutions are

INTRODUCERE

Sursa principală din care se obține colagenul fibrilar tip I este pielea animală, iar extragerea colagenului se face prin diferite tehnologii, cea mai veche fiind fierberea țesuturilor în apă, care conduce la binecunoscuta gelatină [1]. Conform clasificării făcute de Trandafir și colab. [1], tehnologiile de extragere a colagenului se împart în tehnologii de extracție a colagenului în stare denaturată și nedenaturată.

Colagenul sub formă de suspensii de fibre – pastă de colagen, gel fibrilar și soluții coloidale sunt extracte

* Correspondence to: Mihaela Violeta GHICA, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Physical and Colloidal Chemistry Department, 6 Traian Vuia Str., 020956, Bucharest, Romania, email: mihaelaghica@yahoo.com

extracts obtained by technologies for extraction of undenatured collagen.

Collagen gels and solutions are polydisperse colloidal systems with triple helix conformation which are obtained at 20÷25°C. The temperatures up to 40÷50°C lead to denaturation of helicoidal conformation in the statistical coil (helix → coil transition) by destroying the hydrogen bonds that maintain helical conformation, obtaining gelatin solutions. Collagen solubilization at temperatures of 50÷70°C leads to irreversible destruction of helical conformation and the obtained extracts are called hydrolysates.

Collagen processing involves liquid aqueous preparations which could be patterned in different forms such as injectables for tissue augmentation, drug delivery systems or scaffolds for tissue regeneration [2, 3].

For designing biomaterials, rheological measurement of solutions or dispersions to find out their rheological properties would help the manufacturer to control or manipulate the physical properties in order to produce good and stable products [4].

The aim of this work was to investigate the influence of type of collagen extract and temperature on the rheological properties of collagen gels, gelatin and hydrolysates which will be used as main components of drug delivery systems.

MATERIALS AND METHODS

Type I collagen gel was obtained from bovine hide with an initial concentration of 2.52% collagen using the technology previously described [5]. Gelatin was obtained from collagen gel heated at 60°C for 4 hours and the hydrolysate was obtained by boiling the same type of gel at 100°C for 8 hours. The initial pH values of the obtained extracts were acidic ones (as Table 1 shows) and they were adjusted at 7.4 with NaOH 1M and their concentrations were brought at 1%. The collagen extracts adjusted at physiologic pH underwent rheological measurements.

To determine the collagen extracts flow ability a rotational viscometer Multi Visc–Rheometer Fungilab with TR 9 standard spindle for gels and TR 8 one for

obținute prin tehnologiile de extracție în stare nedenaturată.

Gelurile și soluțiile de colagen sunt sisteme coloidale polidisperse cu conformație de helix triplu care se obțin la temperaturi de 20÷25°C. Temperaturile de până la 40-50°C conduc la denaturarea conformației helicoidale în ghem statistic (tranzitie helix → ghem) prin distrugerea legăturilor de hidrogen care mențin conformația helicoidală, obținându-se soluții de gelatină. Solubilizarea la temperaturi de 50-70°C conduce la denaturarea ireversibilă a conformației helicoidale, extractele obținute fiind denumite hidrolizate.

Procesarea colagenului implică prepararea de soluții lichide care pot fi modelate în diferite forme cum ar fi injectabile pentru augmentare tisulară, sisteme de eliberare a medicamentelor sau suporturi pentru ingineria tisulară [2, 3].

Pentru proiectarea biomaterialelor, măsurătorile reologice ale soluțiilor sau dispersiilor pentru cunoașterea proprietăților reologice ale acestora pot ajuta producătorul să controleze și să monitorizeze proprietățile fizice pentru realizarea unor produse de bună calitate și stabilă [4].

Scopul acestui studiu a fost investigarea influenței tipului de extract colagenic și a temperaturii asupra proprietăților reologice ale gelului, gelatinei și hidrolizatului de colagen care vor fi utilizați drept component principal în sistemele de eliberare a medicamentelor.

MATERIALE ȘI METODE

Gelul de colagen tip I a fost obținut din piele bovină cu o concentrație inițială de 2.52% colagen folosind tehnologia descrisă anterior [5]. Gelatina s-a obținut din gelul de colagen încălzit la o temperatură de 60°C timp de 4 ore, iar hidrolizatul s-a obținut prin fierberea același gel la temperatura de 100°C timp de 8 ore. Extractele obținute au avut inițial un pH acid (Tabelul 1) și au fost aduse la o concentrație de 1%, iar pH-ul a fost ajustat la 7,4 cu NaOH 1M. Extractele colagenice ajustate la pH-ul fiziologic au fost supuse măsurătorilor reologice.

Pentru determinarea capacitatei de curgere a extractelor colagenice a fost utilizat un viscozimetru rotativ Multi Visc–Rheometer Fungilab cu sondă

gelatin and hydrolysate were used. The rheological experiments were performed at 23°C and 37°C (storage and body temperature), using a ThermoHaake P5 Ultrathermostat. The operational conditions were described in our previous studies [6, 7].

In order to establish the flowing type, the rheological data were fitted with the following rheological models: Bingham (1), Casson (2), Ostwald-de Waele (3) and Herschel-Bulkley (4) which have the mathematical equations presented below.

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

$$\tau^{0.5} = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5} \cdot \dot{\gamma}^{0.5} \quad (2)$$

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (3)$$

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

The significance of parameters from equations 1-4 is the following: τ - shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ - shear rate (s^{-1}), η - plastic viscosity (Pa·s), τ_0 - yield stress (Pa), K - consistency index (Pa·sⁿ), n - flow index.

RESULTS AND DISCUSSION

The obtained collagen extracts – hydrogel, gelatin and hydrolysate were characterized by physical-chemical analysis through dry substance, total nitrogen, ash, fat, proteic substance (calculated from nitrogen content) and pH, and the results of analysis are presented in the Table 1.

standard TR 9 pentru geluri și o sondă standard TR 8 pentru gelatină și hidrolizat. Experimentele reologice au fost efectuate la 23°C și 37°C (temperatura de păstrare și temperatura corpului), utilizând un ultratermostat ThermoHaake P5. Condițiile operaționale au fost descrise în studiile noastre anterioare [6, 7].

Pentru a stabili tipul de curgere, datele au fost prelucrate cu următoarele modele reologice: Bingham (1), Casson (2), Ostwald-de Waele (3) și Herschel-Bulkley (4) ale căror ecuații sunt prezentate în continuare.

Semnificațiile mărimilor din ecuațiile 1-4 sunt următoarele: τ – tensiune de forfecare (Pa), $\dot{\gamma}$ – viteza de forfecare (s^{-1}), η – vâscozitate plastică (Pa·s), τ_0 – tensiune limită (minimă) de curgere (Pa), K – indice de consistență (Pa·sⁿ), n – indice de curgere (mărime adimensională).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Extractele colagenice obținute, gelul, gelatina și hidrolizatul au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic prin substanță uscată, azot total, conținut de cenușă și grăsimi, substanță proteică (calculată din conținutul de azot) și pH, iar rezultatele analizelor sunt prezentate în Tabelul 1.

Table 1: Physical-chemical characteristics of collagen extracts
 Tabelul 1: Caracteristicile fizico-chimice ale extractelor colagenice

Characteristics <i>Caracteristici</i>	Hydrogel <i>Gel</i>	Gelatin <i>Gelatină</i>	Hydrolysate <i>Hidrolizat</i>
	Values <i>Valori</i>		
Dry substance (105°C), % <i>Substanță uscată (105°C), %</i>	2.52	2.58	2.92
Ash (600-800°C), % <i>Cenușă (600-800°C), %</i>	0.02 / 0.79	Free <i>Lipsă</i>	Free <i>Lipsă</i>
Fat substance, % <i>Substanță grasă, %</i>	0.01 / 0.39	0.01 / 0.39	0.01 / 0.34
Total nitrogen (Kjeldahl), % <i>Azot total (Kjeldahl), %</i>	0.49 / 17.58	0.50 / 17.26	0.48 / 16.44
Proteic substance (N x 5,62), % <i>Substanță proteică (N x 5,62), %</i>	2.75 / 98.80	2.81 / 97.00	2.70 / 92.47
pH <i>pH</i>	2,3	2.42	2.48

* Values expressed in the absence of humidity

* Valori recalculate în absența umidității

Because in order to obtain collagen biomaterials extracts with 1.0-1.2% collagen concentration are used, the rheological characteristics were performed on extracts with 1% collagen [5].

The rheological properties are dependent on collagen nature (especially of type), the mode of extraction, mode of re-arrangement, pH, ionic concentration of solution, flow rate [1].

Solution and gel of collagen belong to the pseudoplastic non-newtonian fluid class. They are characterized by a structural viscosity which depends on flow condition, dependence given by the existence of an asymmetric structure of structural extracted fragments, formed by molecules, respectively rigid, asymmetric fibrils, with amphoteric character. Because of this the shearing effects are very high in the collagen solution [8].

In concentrated collagen solutions prevail the phenomenon of intermolecular association by electrostatic force, Van der Waals and hydrogen bonding which leads to formation of spatial structure which is showed in the flowing process by yield stress [9].

The rheological profiles corresponding to the ascending flow curves are presented in the Figures 1-3

Deoarece biomaterialele colagenice au la bază în general concentrații de 1-1.2% colagen, caracteristicile reologice s-au realizat pe extracte colagenice cu concentrații de 1% [5].

Proprietățile reologice sunt dependente de natura colagenului (mai precis de tip), modul de extracție, modul de reaggregare, pH-ul și concentrația ionică a soluției, viteza de curgere etc. [1].

Soluțiile și gelurile de colagen fac parte din clasa fluidelor nenewtoniene pseudoplastice. Acestea se caracterizează printr-o viscozitate structurală ce depinde de condițiile de curgere, dependentă explicată prin existența unei structuri asimetrice a fragmentelor structurale extrase, formate din molecule, respectiv fibrile rigide, asimetrice, cu caracter amfoter. Din această cauză, în soluțiile de colagen efectele forfecării sunt foarte mari [8].

În soluții concentrate de colagen predomină fenomenul de asociere intermoleculară prin forțe electrostatice, Van der Waals și legături de hidrogen, care conduc la formarea unei structuri spațiale care se manifestă în procesul de curgere prin tensiunea limită de curgere [9].

Profilele reologice corespunzătoare ramurii ascendente sunt reprezentate spre exemplificare în

for obtained extracts analyzed at temperatures 23°C and 37°C.

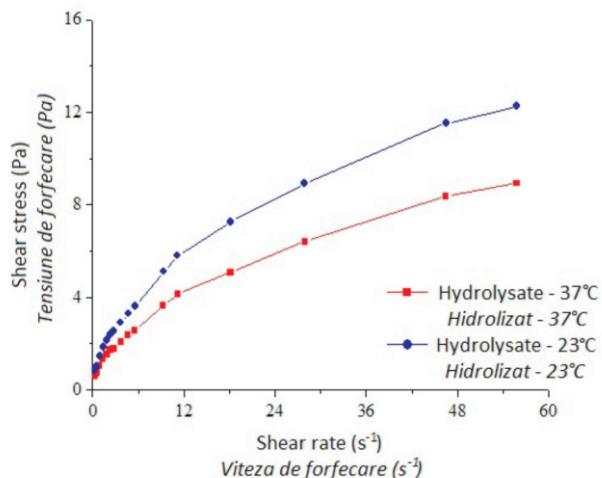


Figure 1. Cumulative rheological profiles for hydrolysate at 23 and 37°C

Figura 1. Profilele reologice cumulate pentru hidrolizat la 23 și 37°C

Figurile 1-3 pentru extractele obținute analizate la temperaturile de 23°C și 37°C.

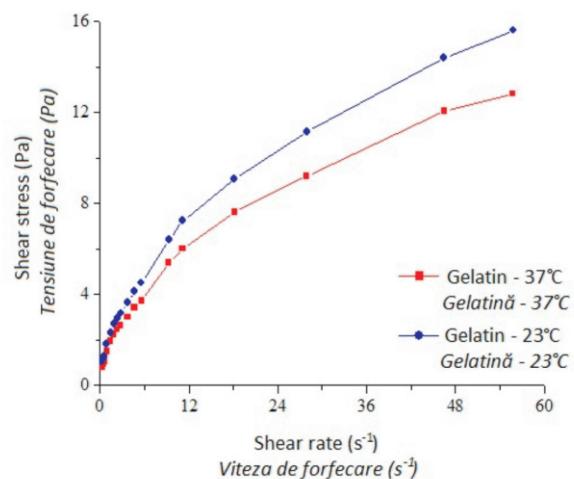


Figure 2. Cumulative rheological profiles for gelatin at 23 and 37°C

Figura 2. Profilele reologice cumulate pentru gelatină la 23 și 37°C

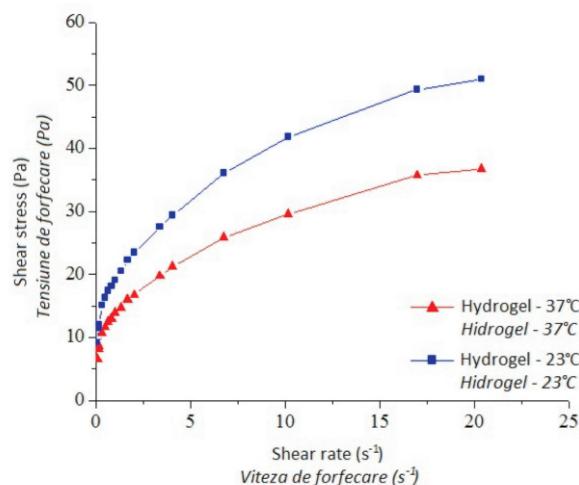


Figure 3. Cumulative rheological profiles for hydrogel at 23 and 37°C

Figura 3. Profilele reologice cumulate pentru hidrogel la 23 și 37°C

Examining the rheograms shown in Figures 1, 2 and 3, it is determined that all the designed extracts show a non-Newtonian behavior both at 23°C and 37°C.

To quantify the non-Newtonian behavior different rheological models were verified, which provided a way of representing a large amount of experimental data in terms of a simple mathematical expression. These

Din examinarea reogramelor prezentate în Figurile 1, 2 și 3 se constată că toate sistemele proiectate prezintă o comportare nenewtoniană atât la 23°C, cât și la 37°C.

Pentru cuantificarea comportării nenewtoniene au fost verificate diferite modele reologice, care furnizează o modalitate de reprezentare a unei mari cantități de date experimentale în termenii unei simple

equations, called "constitutive equations", are useful for providing flow behavior of complex systems for a certain range of shear rates. The most appropriate rheological model depends on the deformation response of the system, but also on how well the experimental data verifies the theoretical model [10].

Applying these models to rheological data, different values for the coefficients of determination R^2 were obtained. Thus, for hydrolysate and gelatin, the highest values of R^2 were recorded for Ostwald-de Waele model, while for the collagen hydrogel, the best values were obtained for Herschel-Bulkley model.

The Tables 2 and 3 contain values of rheological parameters which are characteristic of Ostwald-de Waele and Herschel-Bulkley flow patterns for systems tested at 23°C and 37°C.

Table 2: Values of rheological parameters which are characteristic of Ostwald-de Waele and Herschel-Bulkley flow patterns for systems tested at 23°C

Tabelul 2: Valorile parametrilor reologici caracteristici modelelor de curgere Ostwald-de Waele și Herschel-Bulkley pentru sistemele analizate la 23°C

Formulation Formulare	Yield stress (Pa) Tensiune limită de curgere (Pa)	Consistency index (Pa.s ⁿ) Indice de consistență (Pa.s ⁿ)	Flow index (n) Indice de curgere (n)
Hydrolysate <i>Hidrolizat</i>	0	1.562	0.518
Gelatin <i>Gelatină</i>	0	1.939	0.522
Hydrogel <i>Hidrogel</i>	3.464	15.632	0.375

Table 3: Values of rheological parameters which are characteristic of Ostwald-de Waele and Herschel-Bulkley flow patterns for systems tested at 37°C

Tabelul 3: Valorile parametrilor reologici caracteristici modelelor de curgere Ostwald-de Waele și Herschel-Bulkley pentru sistemele analizate la 37°C

Formulation Formulare	Yield stress (Pa) Tensiune limită de curgere (Pa)	Consistency index (Pa.s ⁿ) Indice de consistență (Pa.s ⁿ)	Flow index (n) Indice de curgere (n)
Hydrolysate <i>Hidrolizat</i>	0	1.095	0.526
Gelatin <i>Gelatină</i>	0	1.620	0.521
Hydrogel <i>Hidrogel</i>	2.612	11.045	0.380

expresii matematice. Aceste ecuații numite „ecuații constitutive” sunt utile pentru prevederea comportării la curgere a sistemelor complexe, pentru un anumit interval de viteze de forfecare. Cel mai adekvat model reologic depinde de răspunsul sistemului la deformare, dar și de cât de bine verifică datele experimentale modelul teoretic [10].

În urma aplicării acestor modele pentru datele reologice s-au obținut valori diferite pentru coeficienții de determinare R^2 . Astfel, pentru hidrolizat și gelatină s-au înregistrat cele mai mari valori ale lui R^2 pentru modelul Ostwald-de Waele, în timp ce pentru hidrogelul martor de colagen s-au obținut cele mai bune valori pentru modelul Herschel-Bulkley.

În Tabelele 2 și 3 sunt înscrise valorile parametrilor reologici caracteristici modelelor de curgere Ostwald-de Waele și Herschel-Bulkley pentru sistemele testate la temperaturile de 23°C și 37°C.

Flow index, n , values being lower than 1 in all tested systems at both temperatures, a pseudoplastic behavior and shear thinning was highlighted.

Some determined rheological parameters, such as yield stress, characteristic to Herschel-Bulkley model is of interest in terms of biopharmaceutical. Thus, pseudoplastic behavior with high yield stress is a desired requirement for topical systems both in terms of conditioning and spreading on the skin and forming a continuous film on application site. At high shear rates, such as the expulsion from the conditioning container, the material will flow quickly facilitating clinical use, while at low shear rate, such as exposed gel, the material will have a great consistency recovering the original rheological properties which it had before the administration [11, 12].

Analysing the values registered for consistency index there is a maximum value for hydrogel and a minimum for hydrolysate respectively, at both temperatures.

Also, it is noted that the increasing temperature results in the consistency index values decreasing for all tested systems, respectively minimum flow index for hydrogel.

Thus, increasing the temperature from 23°C to 37°C, there is a decrease in consistency index of about 1.42 times for hydrolysate, 1.20 times for gelatin and 1.41 times for collagen hydrogel respectively. Also there is a decrease of yield stress of 1.32 times for hydrogel.

For each rheological tested formulation at both temperatures we can appreciate that the application of a shear stress, network structure of gel changes due to changes induced by the phase particles particle deformation and gradually disintegrates, releasing the solvent which was caught in molecular spaces.

CONCLUSIONS

Collagen extracts in form of hydrogel, gelatin and hydrolysate were obtained from bovine hide. All the designed systems show a non-Newtonian behavior both at 23°C and 37°C. For consistency index there is a maximum value for hydrogel and a minimum for

Valorile indicelui de curgere, n , fiind subunitare pentru toate sistemele testate la ambele temperaturi, se evidențiază astfel o comportare pseudoplastică și de subțiere prin forfecare.

Unii parametri reologici determinați, cum ar fi tensiunea limită de curgere, caracteristică modelului Herschel-Bulkley, prezintă interes din punct de vedere biofarmaceutic. Astfel, comportarea pseudoplastică cu tensiune limită de curgere reprezintă o cerință dorită pentru sistemele topice atât sub aspectul condiționării, cât și sub cel al etalării pe piele și al formării unui film continuu la locul de aplicare. La viteze mari de forfecare, cum este cea la expulzarea din recipientul de condiționare, materialul va curge repede facilitând administrarea clinică, în timp ce la viteze mici de forfecare, cum este cazul gelului etalat, materialul va adopta o consistență mare recuperând proprietățile reologice originale pe care le poseda înainte de administrare [11, 12].

Din analiza valorilor înregistrate pentru indicele de consistență se constată o valoare maximă în cazul hidrogelului și respectiv minimă în cazul hidrolizatului, la ambele temperaturi de lucru.

De asemenea, se remarcă faptul că la creșterea temperaturii are loc scăderea valorii indicelui de consistență pentru toate sistemele testate, respectiv a tensiunii limită de curgere pentru hidrogelul de colagen.

Astfel, la creșterea temperaturii de la 23°C la 37°C se observă o descreștere a indicelui de consistență de aproximativ 1,42 ori pentru sistemul de tip hidrolizat, de 1,20 ori pentru gelatină, respectiv de 1,41 ori pentru hidrogelul de colagen. De asemenea, se constată o scădere a tensiunii limită de curgere de 1,32 ori pentru sistemul de tip hidrogel.

Pentru fiecare formulare testată din punct de vedere reologic la ambele temperaturi se poate aprecia că la aplicarea unei tensiuni de forfecare structura rețelei de gel se modifică datorită modificării induse de deformarea conturului particulelor fazei disperse și se dezintegrează în mod progresiv, eliberându-se solventul care până atunci a fost prins în spațiile moleculare.

CONCLUZII

Extracte de colagen sub formă de hidrogel, gelatină și hidrolizat de colagen au fost obținute din piele de origine bovină. Toate sistemele proiectate prezintă o comportare nenewtoniană atât la 23°C, cât și la 37°C. Pentru indicele de consistență se constată o

hydrolysate respectively, at both temperatures. Hydrolysate and gelatin follow the Ostwald-de Waele model, while collagen hydrogel follows the Herschel-Bulkley model. Rheological characteristics of the semisolid network described for each tested collagen extract are dependent on the nature of each component and the temperature at which they were tested.

Acknowledgements

This work was financially supported by ANCS-UEFISCDI, Capacities Programme PN-2, Module III, Bilateral Cooperation People Republic of China and Romania, project number 502/18.03.2011.

valoare maximă în cazul hidrogelului și respectiv minimă în cazul hidrolizatului, la ambele temperaturi de lucru. Hidrolizatul și gelatina au urmat modelul Ostwald-de Waele, iar hidrogelul, modelul Herschel-Bulkley. Caracteristicile reologice ale rețelei semisolide descrise pentru fiecare extract de colagen testat sunt dependente de natura fiecărui component și temperatura la care au fost testate.

Mulțumiri

Această lucrare a fost finanțată de ANCS-UEFISCDI, Programul Capacități PN-2, Modulul III, prin proiectul de colaborare bilaterală Republica China și România, proiect nr. 502/18.03.2011.

REFERENCES

1. Trandafir, V., Popescu, G., Albu, M.G., Iovu, H., Georgescu, M., Collagen-based Bioproducts (in Romanian), Ars Docendi, Bucharest, **2007**.
2. Fathima, N.N., Dhathathreyan, A., Ramasami, T., Krägel, J., Miller, R., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2011**, 48, 1, 67–73.
3. Albu, M.G., Titorencu, I., Chelaru, C., *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2011**, 11, 11-20.
4. Lai, G., Li, Y., Li, G., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2008**, 42, 3, 285–291.
5. Albu, M.G., Collagen gels and matrices for biomedical applications, Saarbrucken, Lambert Academic Publishing, **2011**.
6. Ghica, M.V., Albu, M.G., Leca, M., Popa, L., Moisescu, St., *Pharmazie*, **2011**, 66, 853-861.
7. Ghica, M.V., Physical-chemical and Pharmaceutical Elements of Semisolid Systems with Topical Action. Applications for Hydrogels with indomethacin (in Romanian), Printech, Bucharest, **2010**.
8. Albu M.G., Ghica, M.V., Popa, L., Leca, M., Trandafir, V., *Rev. Roum. Chim.*, **2009**, 54, 5, 373-379.
9. Leca, M., Trandafir, V., Albu, M.G., „Ovidius” Univ. Annals Med. Sci., **2003**, 1, 84-92.
10. Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., Galichet, L.Y., Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd edition, London, **2003**.
11. Ghica, M.V., Albu, M.G., Popa, L., Proceedings of the 3rd International Conference on Advanced Materials and Systems, ICAMS **2010**, 193-198.
12. Ortan, A., Dinu-Pîrvu, C., Ghica, M.V., Popescu, L.M., Ioniță, L., *Rom. Biotech. Lett.*, **2011**, 16, 1 (Suppl.), 47-54.