

INTERACÇÃO DE FÁRMACOS COM LIPOSSOMAS: ÁREAS DE APLICAÇÃO

Carla M. Matos

Professora Auxiliar

Faculdade de Ciências da Saúde - UFP

cmatos@ufp.pt

Carla G. Moutinho

Professora Auxiliar

Faculdade de Ciências da Saúde - UFP

carlamo@ufp.pt

RESUMO

Os lipossomas têm a capacidade de simular muitas das propriedades das membranas celulares, constituindo ferramentas valiosas para o estudo das consequências da interação fármaco-lípido a nível das propriedades físico-químicas e estruturais, quer da membrana quer do fármaco e respectivos efeitos no mecanismo de acção deste. Por outro lado, devido à singular morfologia e capacidade de intervir em fenómenos de transporte na bicamada fosfolipídica, o uso de lipossomas como transportadores de fármacos tem sido largamente estudado.

PALAVRAS-CHAVE: Vesículas lipídicas; Lipossomas; Vectorização; Interação fármaco-membrana; Catálise.

ABSTRACT

Liposomes are able to simulate many of the properties of cell membranes, providing valuable tools for the study of drug-lipid interaction consequences. Such consequences can be changes on whether the membrane's or the drug's physical-chemical and structural properties, and its effects on the action mechanism of the latter. Furthermore, due to natural morphology and ability to intervene in the transport phenomena in phospholipic bilayer, the use of liposomes as carriers of drugs has been widely studied.

KEY -WORDS: Lipid vesicles; Liposomes; Drug targeting; Drug-membrane interaction; Catalysis.

1. INTRODUÇÃO

O comportamento farmacocinético e farmacodinâmico de um composto activo é um parâmetro de fundamental importância na determinação da sua eficácia terapêutica. De facto, tanto as acções desejáveis como as acções colaterais, na maioria das vezes indesejáveis, estão dependentes da concentração e persistência dos fármacos nos vários compartimentos do organismo. Durante o trajecto de uma substância com interesse farmacológico desde o seu local de absorção até aos locais onde a sua acção será exercida, é inevitável a passagem de variadas barreiras lipídicas formadas pelas membranas celulares, estruturalmente constituídas por uma bicamada de fosfolípidos, onde se encontram incrustadas proteínas, glicoproteínas e outros constituintes. O conhecimento exaustivo da interacção entre os fármacos e as membranas lipídicas é crucial para a compreensão dos parâmetros de distribuição dessas moléculas no organismo, bem como para o estabelecimento das relações entre as suas propriedades físico-químicas e os parâmetros farmacológicos apresentados, relações importantes no estudo e desenho de novas moléculas farmacologicamente activas. Adicionalmente, para determinados fármacos, a sua interacção com os lípidos constituintes das membranas pode representar uma importante etapa para o estabelecimento do seu modo de acção (Vasir et al., 2005).

2. LIPOSSOMAS EM ESTUDOS DO MODO DE ACÇÃO DE FÁRMACOS

As moléculas anfipáticas são ubiqüitárias nos sistemas biológicos, e a elevada razão superfície/volume nas células, membranas plasmáticas, organelos celulares e outras estruturas sub-celulares significa que uma proporção relativamente grande de moléculas se situam nas interfaces entre duas fases diferentes. Como já referido, as membranas plasmáticas desempenham um papel crucial na biodisponibilidade e farmacodinâmica dos fármacos.

O modelo clássico de Singer e Nicolson descreve a membrana celular, representada na Figura 1., como uma bicamada lipídica, onde se encontram proteínas e glicoproteínas incrustadas. As proteínas ou glicoproteínas membranares estão relacionadas com as funções específicas de uma dada membrana, e podem dividir-se em intrínsecas ou integradas (penetram na membrana) e extrínsecas ou periféricas (adsorvidas à superfície).

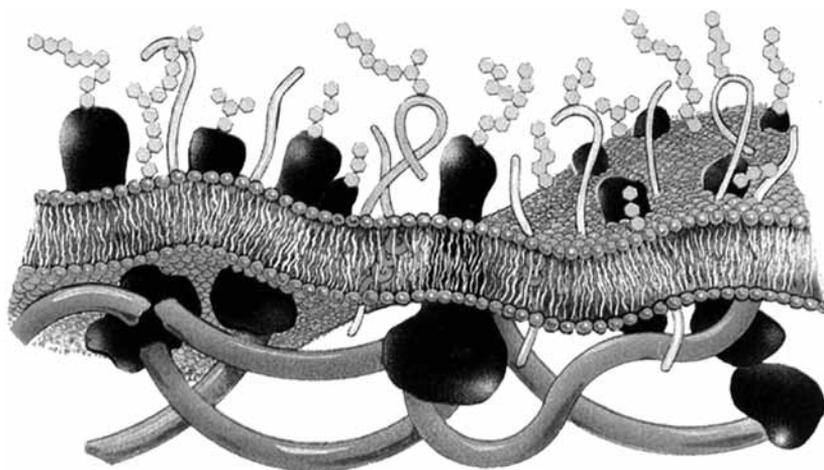


Figura 1. Representação esquemática da membrana celular (adaptado de Lasic, 1995).

O valor dos lipossomas como modelo de biomembranas apoia-se no facto de as vesículas poderem ser preparadas a partir de constituintes naturais, a fim de se obter uma estrutura idêntica à porção lipídica das membranas. Esta similaridade entre lipossomas e membranas naturais pode ainda ser apurada pela inclusão proteínas, formando um ambiente que mimetiza o natural, mas cuja composição pode ser controlada por forma a determinar o papel de cada componente em determinado fenómeno sujeito a estudo. A utilização destes agregados simples para simular sistemas muito mais complexos, permite o estudo de mecanismos fundamentais para os processos biológicos, como a absorção e o transporte de moléculas exógenas, reconhecimento celular, transferência de energia, funcionamento de enzimas e fenómenos relacionados com o modo de acção dos fármacos (Orive et al., 2004). O estudo do funcionamento de enzimas, por exemplo, pode ser efectuado no ambiente membranar sem eventuais interferências de outros factores (Mei et al., 2008).

A interacção de determinados fármacos com a membrana lipídica parece ser importante para o seu modo de acção, como é o caso de anestésicos locais (Mura et al., 2007), antibióticos (Briones et al., 2008), β -bloqueadores (Ikonen et al., 2007) ou fármacos moduladores de resistência celular a agentes citotóxicos (Carvalho Jr et al., 2007). Resultados obtidos em diversos estudos permitem apontar para a hipótese de que a interacção não específica de certos fármacos com a membrana faz parte do seu processo de acção, por permitir que os fármacos atinjam receptores proteicos específicos (Couvreur e Vauthier, 2006).

De uma forma geral, o mecanismo de ligação de fármacos aos receptores membranares é considerado análogo ao de ligandos endógenos, como hormonas, factores de crescimento e neurotransmissores. Em contraste, fármacos altamente lipofílicos parecem ligar-se ao receptor por uma via transmembranar. Parece importante considerar um mecanismo de interacção em dois passos. O primeiro envolveria a partição do fármaco na membrana e o segundo a sua orientação e difusão lateral por forma a ligar-se a um dado receptor. Se tivermos em conta que a ligação ao receptor é limitada pelo processo de difusão da molécula pelo meio tridimensional aquoso, parece mais vantajoso a difusão bidimensional através da membrana (De Cuyper et al., 2004).

3. LIPOSSOMAS COMO MEIO REACCIONAL E EM ANÁLISE QUÍMICA

A capacidade dos lipossomas de solubilizarem moléculas, de compartimentarem reagentes de solubilidade diferente em microambientes distintos e de poderem funcionar como catalizadores de inúmeras reacções químicas, faz destas estruturas uma interessante alternativa aos meios reaccionais habitualmente usados em técnicas analíticas. Possuem, ainda, a capacidade para estabilizar e proteger moléculas sensíveis à luz, bem como favorecer processos fotoquímicos e fotofísicos (Edwards e Baeumner, 2006).

Como catalizadores de reacções, os lipossomas podem actuar de dois modos fundamentais: podem aumentar a concentração dos reagentes por compartimentação e podem alterar a reactividade dos reagentes por estabilização de estados de transição ou alteração da conformação molecular. Podem funcionar como catalizadores positivos ou negativos, em reacções de hidrólise, ácido-base, oxidação-redução, fotoquímicas, entre outras. A capacidade das vesículas de, para além de aumentarem a solubilidade de um soluto, poderem catalizar negativamente reacções de hidrólise ou fotólise, protegendo efectivamente o soluto da acção do meio, pode tornar o meio vesicular apropriado para aumentar a selectividade e sensibilidade de um procedimento analítico (Johnson et al., 2005).

As vesículas podem aumentar a sensibilidade de técnicas analíticas por compartimentação ou extracção e concentração de reagentes. Podem fornecer o substrato para reacções analíticas e proporcionar um meio de reacção preferencial (Edwards e Baeumner, 2006). Devido à sua capacidade de solubilização de

compostos podem ser usados como a fase sólida em processos de extracção e o desenvolvimento de técnicas cromatográficas usando membranas imobilizadas como fase estacionária tem sido objecto de inúmeros trabalhos (Musteata e Pawliszyn, 2006; Mei et al., 2008). As vesículas podem também participar em determinações analíticas em sistemas de fluxo (Foo et al., 2003) e aumentar a sensibilidade de técnicas de imunomigração (Glorio-Paulet e Durst, 2000; Roberts e Durst, 2007). Podem ainda ser usadas no desenvolvimento de sensores electroquímicos (Bart et al., 2002) e de eléctrodos enzimáticos (Leca et al., 1994).

Do exposto se depreende a importância da avaliação do tipo e grau de interacção que determinado soluto estabelece com o sistema lipídico, da caracterização termodinâmica dessa interacção, e ainda das consequências dessa interacção que podem ser exploradas a nível prático no desenvolvimento de metodologias analíticas mais sensíveis e específicas.

Torna-se evidente que a utilização de um meio heterogéneo, como os lipossomas, em técnicas analíticas depreende o conhecimento aprofundado do tipo e extensão da interacção de um determinado soluto com as vesículas, bem como o discernimento das consequências dessa interacção a nível das propriedades físico-químicas quer do soluto quer da vesícula.

4. LIPOSSOMAS COMO TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

A utilização de um determinado fármaco é um compromisso entre a sua eficácia e os seus efeitos secundários indesejáveis. O índice terapêutico, definido como a razão entre a eficácia do fármaco e os seus efeitos colaterais, é função de diversos parâmetros, como a sua farmacocinética, farmacodinâmica, e biodistribuição (Lasic, 1998). Estes factores podem ser influenciados pela administração do fármaco em sistemas transportadores, que podem alterar a libertação e a manutenção das concentrações plasmáticas das moléculas que veiculam, aumentando a sua biodisponibilidade e diminuindo os efeitos tóxicos. Podem ainda funcionar como vectores para os fármacos, conduzindo-os a determinada célula-alvo, diminuindo assim a dose necessária para expressar determinada acção (Lasic, 1998).

Logo após a descoberta dos lipossomas, na década de 60, surgiu a ideia de que estas estruturas poderiam ser utilizadas como transportadores ou veículos de fármacos (Silva, 2004). De facto, os lipossomas parecem sistemas de transporte ideais, pois, como podem ser produzidos a partir de compostos naturais, são relativamente não tóxicos e biodegradáveis (Diebold et al., 2007). Outra vantagem apresentada por estes sistemas é a variedade de microambientes diferentes que apresentam, sendo capazes de incorporar solutos nos seus compartimentos aquoso e lipídico, o que permite acomodar substâncias com características de polaridade radicalmente diferentes no mesmo sistema (Bergstrand et al., 2003). Adicionalmente, os fármacos podem simplesmente ser incorporados na sua forma original, sem necessidade de estabelecerem ligações covalentes com o vector (Mozafari, 2005). Como formulação farmacêutica, as principais vantagens conferidas pela encapsulação de fármacos em lipossomas são o aumento da solubilização de fármacos lipossolúveis e a protecção conferida por estes sistemas à hidrólise do fármaco, sobre a acção de enzimas degradativas (Diebold et al., 2007), de condições adversas de pH ou de acção da luz (Silva, 2004), entre outras.

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas baseadas nestas estruturas tem sido foco de numerosos estudos, mas após um promissor início, cedo os problemas se começaram a evidenciar, e nos dias de hoje, muito poucas são as formulações que efectivamente atingiram o mercado. O principal problema da administração sistémica de lipossomas é o facto de, quando entram na corrente sanguínea, serem rapidamente capturados pelos macrófagos, que fazem parte do sistema retículo-endotelial (SRE) (Sharma e Sharma, 1997). O destino dos lipossomas "*in vivo*" pode ser evidenciado pelo recurso a marcadores

radioactivos (Edwards e Baeumner, 2006). O processo fagocítico geralmente é precedido por um revestimento dos lipossomas com determinados constituintes do plasma -opsoninas - processo denominado opsonização, que facilita o reconhecimento pelos macrófagos do material a ser fagocitado. Para além dos macrófagos, os lipossomas são absorvidos rapidamente e em grande extensão pelos outros órgãos do SRE, principalmente o fígado, o baço e os nódulos linfáticos, mas, mais tardiamente, também pelos pulmões e medula óssea, o que diminui o seu tempo de semi-vida plasmática a minutos (Sharma e Sharma, 1997). Este fenómeno de captura condiciona a utilização primordial dos lipossomas no tratamento de doenças relacionadas com os órgãos referidos: fígado ou baço.

O fígado é constituído predominantemente por células parenquimatosas, com uma pequena proporção de células de Kupffer, que formam parte do sistema reticulo-endotelial e são altamente fagocíticas (Hara et al., 2008). Os lipossomas de menor diâmetro dirigem-se preferencialmente para os hepatócitos visto serem suficientemente pequenos para passarem pelas fenestras dos sinusóides, que possuem um diâmetro médio de 0,1 μm . Os lipossomas maiores têm acesso restrito aos hepatócitos e são apreendidos preferencialmente pelas células de Kupffer (Lasic, 1998).

As características físicas e a composição dos lipossomas afectam a sua captura pelo SRE. Os lipossomas maiores são capturados mais rapidamente, bem como os que, devido à sua constituição, são mais rígidos. Para aumentar o tempo de semi-vida dos lipossomas na corrente sanguínea, diversas actuações têm sido descritas:

- saturação do SRE com lipossomas vazios antes da administração dos lipossomas contendo o fármaco;
- utilização de lipossomas mais pequenos e de fluidez intermédia;
- a incorporação de esfingomiéline e colesterol parece diminuir a captura pelo SRE (Carvalho Jr. et al., 2007), enquanto que a adição de esterilamina a aumenta (Vasir et al., 2005);
- saturação da superfície dos lipossomas com substâncias covalentemente ligadas como determinados glicolípidos (gangliosídeo GM₁), polissacarídeos ou polímeros hidrossolúveis (Suzuki et al., 2008). Estes lipossomas, conhecidos como lipossomas "Stealth[®]" ou lipossomas estericamente estabilizados possuem um tempo de semi-vida plasmática aumentado até cerca de 10 horas (Carvalho Jr. et al., 2007).

Uma das vantagens e desafios da utilização de lipossomas como transportadores de fármacos é a possibilidade de utilizar estes sistemas como vectores. A vectorização ou direccionamento de fármacos ("drug targeting") consiste em promover o transporte do fármaco para os locais de acção específicos, ao nível de um determinado órgão, tecido ou célula (Vasir, 2005).

As principais vias de administração dos lipossomas são a via intra-venosa, intra-peritoneal e sub-cutânea. A principal desvantagem destas vias é, como já foi referido, a captura dos lipossomas pelo fígado e baço (Lasic, 1998). A via oral é uma via de administração preferencial, mas a administração de lipossomas oralmente é dificultada pelas condições agressivas do tracto gastro-intestinal: baixo pH estomacal, presença de enzimas degradativas e acção detergente dos sais biliares no intestino. Adicionalmente, existe o problema de moléculas e agregados grandes não serem absorvidos pelas células do tracto digestivo (Silva et al., 2002). A absorção de lipossomas pode ser conseguida pontualmente por endocitose, mas em reduzida extensão. A utilização de MLV é também interessante pois podem ser utilizados para transportar o fármaco através do tracto gastro-intestinal, à medida que as múltiplas camadas vão sendo degradadas, libertando-o perto do seu local de absorção. Adicionalmente, a formação de micelas mistas de lípidos e sais biliares pode aumentar a sua absorção (Lasic, 1998). Existem vários estudos sobre a administração oral de fármacos em lipossomas, alguns apresentando resultados promissores, com aumento da actividade dos fármacos administrados nesta forma (Mei et al., 2008; Suzuki et al., 2008). Será, no entanto, necessário o desenvolvimento de vesículas mais robustas, como lipossomas polimerizados, capazes de suportarem as condições gastro-intestinais (Lasic, 1998).

Outra via comumente usada em formulações contendo lipossomas é a via tópica, especialmente em cosmética. A barreira protectora que é a pele torna a absorção do fármaco dificultada. Os problemas mais comuns apresentados por esta via é a penetração insuficiente do fármaco e/ou a sua absorção para a corrente sanguínea demasiado rápida. A administração em lipossomas parece favorecer a concentração do fármaco na derme e epiderme e diminuir a sua absorção sistémica (Ligade et al., 2007; Barba et al., 2008).

Existem ainda outras vias de administração menos usadas, como a via pulmonar, utilizada especialmente para a veiculação de fármacos que vão actuar localmente (Hoesel et al., 2008).

Embora os lipossomas sejam constituídos maioritariamente por moléculas biocompatíveis, a sua administração, especialmente quando é efectuada de forma crónica, pode trazer algumas reacções indesejáveis. Essas reacções podem ser de ordem física, pois os lipossomas podem bloquear os capilares, principalmente os pulmonares, podendo causar problemas como embolias, ou podem ser de ordem química ou metabólica, pois podem bloquear a função dos macrófagos e do restante SRE, podem alterar funções sanguíneas por interacção com as células do sangue ou causar reacções imunológicas. Os próprios lípidos podem, ainda, exibir funções farmacológicas ou originar metabolitos biologicamente relevantes, como, por exemplo, o ácido araquidónico (Lasic, 1998). Para além disso, os lípidos podem apresentar toxicidade inerente, especialmente a esfingomiéline e a esterilamina, e produzir peróxidos lipídicos tóxicos (Saetern et al., 2005).

Pelas razões anteriormente apontadas, as classes de fármacos mais promissoras para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo lipossomas, algumas das quais se encontram já disponíveis no mercado, são os fármacos usados para combater as infecções, quer por fungos, como a anfotericina B (Marine et al., 2008) ou por protozoários, como fármacos antimoniais (Frézard et al., 2005; Schettini et al., 2006), quer por vírus, como a vidarabina (Port et al., 2006) ou por bactérias, como penicilinas (Bakker-Woudenberg et al., 2005) e antraciclina (Couvreux e Vauthier, 2006). Os imunoadjuvantes, como vacinas (Vasir et al., 2005) e os anticancerígenos, como o taxol (Andresen et al., 2005; Dass e Choong, 2006) ou a doxorubicina (Sharma e Sharma, 1997), possuem igualmente uma série de formulações a serem desenvolvidas. Outra classe extremamente interessante, é a dos anti-inflamatórios, que desenvolveremos posteriormente, devido à marcada predisposição dos lipossomas para se localizarem em locais sujeitos a processos inflamatórios.

Seja qual for o fármaco sujeito a encapsulação ou a via de administração usada, um requisito fundamental para o desenvolvimento de uma formulação com lipossomas é uma elevada taxa de encapsulação do fármaco a ser veiculado, quer o fármaco se associe com a membrana lipídica, quer seja aprisionado no compartimento aquoso interno. Uma encapsulação elevada diminui o custo das formulações e os riscos de toxicidade associada aos lipossomas (Sharma e Sharma, 1997). Outro parâmetro importante é o grau de extravasamento ("leaking") apresentado pelo fármaco num determinado sistema lipossomal, que não deve ser elevado para que não haja perda do fármaco durante o trajecto até ao seu local de acção. A diminuição do extravasamento pode ser conseguida por aumento do grau de insaturação ou do comprimento das cadeias fosfolipídicas, ou ainda, por adição de colesterol ou por utilização de um lípido da mesma carga do ião a ser encapsulado (Lasic, 1998).

Facilmente se compreende, depois do exposto, que a determinação do grau de encapsulação de um fármaco com os lipossomas é um parâmetro extremamente importante. Quando o fármaco possui características de solubilidade tais que se dissolve na membrana lipídica, esse grau de encapsulação pode ser efectivamente expresso por um coeficiente de partição entre duas fases distintas, a fase aquosa e a fase lipídica.

5. INTERACÇÃO FÁRMACO/LIPOSSOMA

Em termos de localização, os solutos podem interagir com as membranas lipídicas dos lipossomas e vesículas fundamentalmente a quatro níveis, como se pode observar na Figura 2. (Lasic, 1998):

- 1) solutos hidrossolúveis podem localizar-se no interior aquoso dos lipossomas ou
- 2) estabelecer ligações de tipo electrostático ou iónico com a zona interfacial constituída pelos grupos polares ou com a camada de Gouy-Chapman;
- 3) solutos com carácter hidrofóbico podem localizar-se no núcleo hidrocarbonado das vesículas, onde podem estabelecer ligações hidrofóbicas ou de Van der Waals;
- 4) moléculas anfipáticas podem dispor-se por forma a exporem a parte hidrofóbica da molécula perto das cadeias fosfolipídicas e a parte hidrofílica perto dos grupos polares.

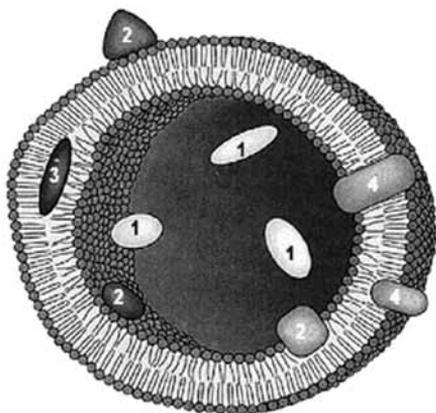


Figura 2. Localizações possíveis dos solutos nas vesículas (adaptado de Lasic, 1998). O significado dos números 1 a 5 é os referidos no texto.

As características de partição de um soluto na membrana, como o seu grau de interacção e a sua localização, dependem fundamentalmente da natureza das interacções (polares ou apolares) que possam ocorrer. Quando as interacções polares são relativamente fracas, a partição é primariamente governada por interacções com o núcleo hidrocarbonado da membrana, sendo o grau de partição determinado pelo equilíbrio de solubilidade nesta fase. Ao contrário, quando as interacções polares são relativamente fortes, a quantidade e a velocidade de incorporação do soluto na membrana pode aumentar ou diminuir, dependendo da extensão de atracção ou repulsão electrostática das moléculas carregadas à superfície da membrana.

6. CONCLUSÃO

A multidisciplinaridade associada à Nanotecnologia Farmacêutica resultou no desenvolvimento de lipossomas como sistemas de libertação de fármacos eficazes em diversas áreas terapêuticas.

Devido à sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, os lipossomas tornaram-se potentes veículos em vários tipos de terapias, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos tóxicos dos fármacos. Inúmeros trabalhos de desenvolvimento de formulações lipossómicas relatam a eficácia e a segurança dos tratamentos realizados, constatando uma grande vantagem em relação aos tratamentos convencionais. Actualmente, são comercializadas formulações contendo lipossomas para o tratamento

de doenças do foro oncológico e infeções sistémicas. O aprofundamento das pesquisas possibilitará, no futuro próximo, a consolidação de seu uso na terapia génica e em vacinas.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRESEN, T. L.; Jensen, S. S.; Jorgensen, K. (2005). Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *In: Progress in Lipid Research*, 44, pp. 68-97.
- BAKKER-Woudenberg, I. M.; Schiffelers, R. M.; Storm, G.; Becker M. J., Guo L. (2005). Long-circulating sterically stabilized liposomes in the treatment of infections. *In: Liposomes*, 391, pp. 228-260.
- BARBA, C.; Mendez, S.; Roddick-Lanzilotta, A.; Kelly, R.; Parra, J. L.; Coderch, L. (2008). Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. *In: Skin Research and Technology*, 14, pp. 243-248.
- BART, M.; van Os, P. J.; Kamp, B.; Bult A.; van Bennekom, W.P. (2002). Development of a confined wall-jet flow-through cell for simultaneous electrochemical and surface plasmon resonance applications. *In: Sensors and Actuators B-Chemical*, 84, pp. 129-13.
- BERGSTRAND, N.; Arfvidsson, M. C.; Kim, J. M.; Thompson, D. H.; Edwards, K. (2003). Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes. *In: Biophysical Chemistry*, 104, pp. 361-379.
- BRIONES, E.; Colino, C. I.; Lanao, J. M. (2008). Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *In: Journal of Controlled Release*, 125, pp. 210-227.
- CARVALHO Jr, A. D.; Mota, L. G.; Nunan, E. A.; Wainstein, A. A.; Wainstein, A. L.; Leal, A. S.; Cardoso, V. N.; Oliveira, M. C. (2007). Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor bearing mice. *In: Life Science*, 80, pp. 659-664.
- COUVREUR, P.; Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *In: Pharmaceutical Research*, 23, pp. 1417-1450.
- DASS, C. R.; Choong, P. M. (2006). Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy. *In: Peptides*, 27, pp. 3020-3028.
- DE CUYPER, M.; Lievens, S.; Flo, G.; Cokelaere, M.; Peleman, C.; Martins, F.; Santana, M. A. (2004). Receptor-mediated biological responses are prolonged using hydrophobized ligands. *In: Biosensors & Bioelectronics*, 20, pp. 1157-1164.
- DIEBOLD, Y.; Jarrín, M.; Sáez, V.; Carvalho, E. S.; Orea, M.; Calonge, M.; Seijo, B.; Alonso, M. J. (2007). Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *In: Biomaterials*, 28, pp. 1553-1564.
- EDWARDS, K. A.; Baeumner, A. J. (2006). Liposomes in analyses. *In: Talanta*, 68, pp. 1432-1441.
- FOO, J. J.; Liu, K.; Chan, V. (2003). Thermal effect on a viscously deformed liposome in a laser trap. *In: Annals of Biomedical Engineering*, 31, pp. 354-362.
- FRÉZARD, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G.; Demicheli, C. (2005). Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimónio. *In: Química Nova*, 28, pp. 511-518.
- GLORIO-Paulet, P.; Durst, R. A. (2000). Determination of potato glycoalkaloids using a liposome immunomigration, liquid-phase competition immunoassay. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 1678-1683.
- HARA, H.; Gridelli, B.; Lin, Y.; Marcos, A.; Cooper, D. (2008). Liver xenografts for the treatment of acute liver failure: Clinical and experimental experience and remaining immunologic barriers. *In: Liver Transplantation*, 14, pp. 425-434.
- HOESEL, L.; Flierl, M.; Niederbichler, A.; Rittirsch, D.; McClintock, S.; Reuben, J.; Pianko, M.; Stone, W.; Yang, H.; Smith, M.; Sarma, J.; Ward, P. (2008). Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. *In: Antioxidants & Redox Signaling*, 10, pp. 973-981.

- IKONEN, M.; Murtomaki, L.; Kontturi, K.** (2007). An electrochemical method for the determination of liposome-water partition coefficients of drugs. *In: Journal of Electroanalytical Chemistry*, 602, pp.189-194.
- JOHNSON, J.; Guo, W.; Zang, J.; Khan, S.; Bardin, S.; Ahmad, A.; Duggan, J., Ahmad, R.** (2005). Quantification of raf antisense oligonucleotide (rafAON) in biological matrices by LC-MS/MS to support pharmacokinetics of a liposome-entrapped rafAON formulation. *In: Biomedical Chromatography*, 19, pp. 272-278.
- LASIC, D. D.** (1995). *Liposomes - From Physics to Applications*. Amsterdam, Elsevier.
- LASIC, D. D.** (1998). Novel applications of liposomes. *In: Tibtech*, 16, pp. 307-320.
- LECA, B.; Morelis, R. M.; Coulet, P. R.** (1994). Influence of phospholipidic microenvironment on the performance of a polypyrrole enzyme electrode. *In: Talanta*, 41, 925-930.
- LIGADE, V.; Sreedhar, D.; Ajay, M.; Udupa, N.** (2007). Nanotechnology in cosmeceuticals: Benefits vs risks. *In: Current Science*, 93, pp. 597-597.
- MARINE, M.; Espada, R.; Torrado, J.; Pastor, F.; Guarro, J.** (2008). Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, pp. 880-883.
- MEI, J.; Xu, J.; Xiao, Y.; Zhang, Q.; Feng Y.** (2008). Immobilized phospholipid capillary electrophoresis for study of drug-membrane interactions and prediction of drug activity. *In: Talanta*, 75, pp. 104-110.
- MOZAFARI M. R.** (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *In: Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, pp. 711-719.
- MURA, P.; Maestrelli, F.; Gonzalez-Rodriguez, M.; Michelacci, I.; Ghelardini, C.; Rabasco, A.** (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *In: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 86-95.
- MUSTEATA, F. M.; Pawliszyn, J.** (2006). Determination of free concentration of paclitaxel in liposome formulations. *In: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9, pp. 231-237.
- ORIVE, G.; Gascón A. R.; Hernández, R. M.; Domínguez-Gil, A.; Pedraz, J. L.** (2004). Techniques: New approaches in the delivery of biopharmaceuticals. *In: Trends in Pharmaceutical Sciences*, 25, pp. 382-387.
- PORT, R. E.; Schuster, C.; Port, C. R.; Bachert P.** (2006). Simultaneous sustained release of fludarabine monophosphate and Gd-DTPA from an interstitial liposome depot in rats: potential for indirect monitoring of drug release by magnetic resonance imaging. *In: Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58, pp. 607-617.
- ROBERTS, M. A.; Durst, R. A.** (2007). Liposome-based immunomigration assays. *In: Affinity Biosensors*, 7, pp. 187-207.
- SAETERN, A. M.; Skar, M.; Braaten, A.; Brandl, M.** (2005). Camptothecin-catalyzed phospholipid hydrolysis in liposomes. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 288, p.73-80.
- SCHETTINI, D. A.; Ribeiro, R. R.; Demicheli, C.; Rocha, O. G.; Melo, M. N.; Michalick, M. S.; Frézard, F.** (2006). Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size, *In: International Journal of Pharmaceutics*, 315 140-147.
- SHARMA, A.; Sharma, U.S.** (1997). Liposome in drug delivery: progress and limitations. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 154, pp. 123-140.
- SILVA, C.; Ribeiro, A.; Ferreira, D.; Veiga, F.** (2002). Administração oral de peptídeos e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. *In: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38, pp. 125-140.
- SILVA, G. A.** (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *In: Surgical Neurology*, 61, pp. 216-220.
- SUZUKI, R.; Takizawa, T.; Kuwata, Y.; Mutoh, M.; Ishiguro, N.; Utoguchi, N.; Shinohara, A.; Eriguchi, M.; Yanagie, H.; Maruyama, K.** (2008). Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 346, pp. 143-150.
- VASIR, J. K.; Reddy, M. K.; Labhasetwar, V.** (2005). Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *In: Current Nanoscience*, 1, pp. 47-64.