

ENCAPSULAÇÃO DE DOIS FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS (5-FLUOROURACILO E METOTREXATO) EM LIPOSSOMAS UNILAMELARES

Ana Isabel F. S. Conceição

Aluna da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
11700@ufp.edu.pt

Carla M. Matos

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
cmatos@ufp.edu.pt

Carla G. Moutinho

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
IBB – U Minho
carlamo@ufp.edu.pt

RESUMO

Este trabalho descreve os resultados preliminares da eficiência de encapsulação de dois fármacos anticancerígenos em lipossomas com o intuito de desenvolver uma formulação de cedência modificada. Apresentam-se os resultados da determinação da eficiência de encapsulação de dois anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares (LUV) de fosfatidilcolina da gema do ovo (EPC). Estes fármacos foram escolhidos pois, muito embora sejam utilizados há já várias décadas apresentam, no entanto, dificuldades na sua utilização (absorção variável, biodisponibilidade incompleta) e efeitos secundários graves, podendo ser um benefício a sua inclusão em lipossomas. Estes foram preparados pelo método clássico da hidratação do filme lipídico e extrudidos por filtros de policarbonato de 100 nm de diâmetro de poro. A eficiência de encapsulação foi determinada após separação do fármaco não encapsulado por centrifugação, usando tubos de separação Amicon.

PALAVRAS-CHAVE:

Lipossomas; 5-fluorouracilo; metotrexato; eficiência de encapsulação.

ABSTRACT

This work describes preliminary results for the encapsulation efficiency of two anticancer drugs in liposomes in order to develop a controlled delivery formulation. Results for the encapsulation efficiency of 5-fluorouracil and methotrexate, in egg phosphatidylcholine (EPC) large unilamellar vesicles (LUV) are presented. The drugs were chosen because, although available for many years, present difficulties in administration (variable absorption, incomplete bioavailability), besides severe *in vivo* toxicity, and its inclusion in liposomes may be benefic. The liposomes were prepared by the classical Bangham's method of lipid film hydration, followed by extrusion through polycarbonate membranes. The encapsulation efficiency was determined after separation of the non entrapped drug by means of a ultrafiltration procedure, using Amicon ultra centrifugal filter devices.

KEYWORDS:

Liposomes; 5-fluorouracil; methotrexate; encapsulation efficiency.

1. INTRODUÇÃO

Lipossomas são estruturas esféricas fechadas, constituídas por uma bicamada de fosfolípidos que envolvem um compartimento aquoso interno. Um composto que seja farmacologicamente activo pode interagir com esta estrutura localizando-se, no caso de ser muito hidrossolúvel, no interior hidrofílico, ou no interior da bicamada caso seja um composto mais lipofílico ou ainda podendo localizar-se numa situação intermédia. Estas estruturas têm sido extensamente estudadas como carregadores de fármacos (Sharma e Sharma, 1997).

Fármacos anticancerígenos podem se associados com transportadores coloidais, tais como os lipossomas, os quais podem explorar as características de permeação aumentada dos vasos sanguíneos que irrigam os tumores como forma de obter uma distribuição preferencial para esses tecidos (Andresen *et al.*, 2005). Existem algumas formulações anticancerígenas à base de lipossomas correntemente aprovadas para uso em seres humanos, que revelam uma farmacocinética melhorada, bem como uma vectorização para tecidos tumorais (Mou-tinho *et al.*, 2007).

A versatilidade estrutural dos lipossomas, a sua capacidade para incorporar uma grande variedade de fármacos, bem como ligandos específicos para determinados tumores, faz destas estruturas sistemas promissores como transportadores de fármacos antitumorais (Andresen *et al.*, 2005).

1.1. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Os métodos de preparação destas estruturas são variados, dependendo o protocolo escolhido do destino específico a dar às vesículas. No entanto, de uma forma geral, todos os métodos envolvem a secagem dos lípidos a partir de soluções em solventes orgânicos e a sua posterior dispersão numa solução aquosa (New, 1990; Lasic, 1993). Segundo New (1990), os métodos de preparação de lipossomas podem ser classificados de acordo com o modo de dispersão dos lípidos na fase aquosa, salientando-se os que utilizam a dispersão mecânica, a dispersão de duas fases e a solubilização por recurso a detergentes.

Nos métodos de preparação por dispersão mecânica, os lípidos são secos usando para tal um solvente orgânico num suporte sólido (normalmente as paredes do recipiente de preparação), após o que são dispersos em fase aquosa por agitação (em vórtice, manual, ou outra). Após a hidratação ocorre a formação de lipossomas multilamelares (MLV). O conjunto de métodos de preparação incluídos nesta categoria é especialmente adequado para a encapsulação de fármacos lipossolúveis.

No conjunto de métodos de preparação em que se recorre à dispersão do solvente, os lípidos são primeiramente dissolvidos num solvente orgânico sendo, posteriormente, adicionada uma solução aquosa do composto a encapsular. Os lípidos dispõem-se, então, em monocamada na interface entre as duas fases. Dentro deste grupo de métodos de preparação é ainda possível distinguir três categorias de métodos: aqueles que envolvem a utilização de um solvente orgânico miscível com a fase aquosa; aqueles em que a fase aquosa, em largo excesso relativamente à orgânica, é imiscível com esta última; e finalmente, aqueles em que a fase orgânica é imiscível e se encontra em largo excesso em relação à fase aquosa.

Na terceira classe de métodos de preparação de lipossomas, os fosfolípidos são solubilizados num meio aquoso por recurso à utilização de moléculas de um detergente, dando origem à formação de micelas mistas. A este procedimento segue-se a remoção do detergente (por exemplo, por diálise) o que leva a um progressivo enriquecimento das micelas em fosfolípidos originando, conseqüentemente, a formação espontânea de lipossomas unilamelares (New, 1990).

No presente trabalho foram utilizados lipossomas unilamelares grandes (LUV-"large unilamellar vesicles"), preparados a partir de lipossomas multilamelares, os quais, por sua vez, foram obtidos por dispersão física de fosfatidilcolina da gema do ovo. Neste método, após secagem da solução lipídica a partir de um solvente orgânico, procede-se à hidratação daqueles com uma solução tampão adequada, mediante agitação mecânica e a uma temperatura superior à temperatura de transição da fosfatidilcolina. Seguidamente, e com o objectivo de obter uma população de lipossomas unilamelares grandes, homogénea em termos de diâmetro médio, procede-se a uma extrusão. Este processo consiste na passagem de uma suspensão de lipossomas, de forma repetida e sequencial, através de membranas de policarbonato com diferentes diâmetros de poro (escolhidos em função do tamanho final pretendido), em condições de elevada pressão e a uma temperatura superior à temperatura de transição da fosfatidilcolina da gema de ovo.

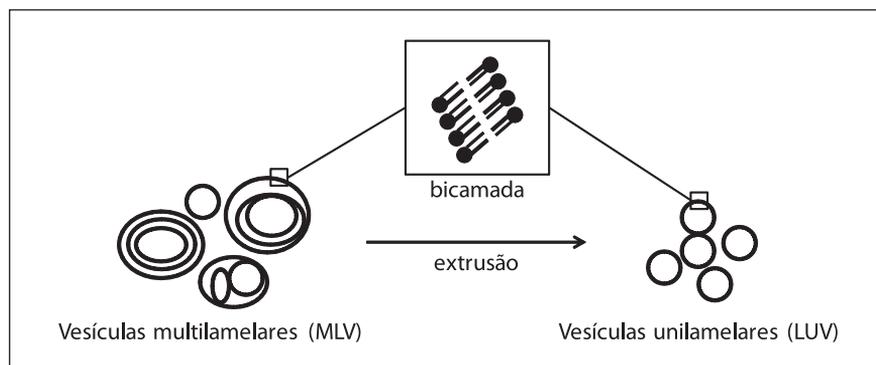


Figura 1. Representação esquemática dos MLV (vesículas multilamelares) e LUV (vesículas unilamelares). Estes podem obter-se dos primeiros por extrusão.

1.2. ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS EM LIPOSSOMAS

O nível e o grau de encapsulação (associação) de fármacos em lipossomas depende do seu carácter hidrofílico, hidrofóbico ou anfílico. De uma maneira geral, as substâncias cuja retenção no interior de lipossomas se torna mais favorável, são aquelas que apresentam valores de coeficiente de partilha *n*-octanol:água ou muito baixos ou muito elevados (De-frise-Quertain *et al.*, 1984). Assim se justifica, por exemplo, que a encapsulação da citosina arabinósido ($\log P_{\text{oct}} = -0,79$) em lipossomas possa apresentar um tempo de semi-vida de libertação (num meio com 25% de plasma humano e a 37°C) da ordem de dias, parâmetro esse que é também função da composição lipídica (Allen *et al.*, 1992). As substâncias anfílicas são, à partida, pouco retidas pelos lipossomas, no entanto, e para o caso de substâncias que sejam ácidos ou bases fracas, este problema pode ser ultrapassado pela manipulação

do pH ou da composição química do compartimento interno aquoso dos lipossomas. Neste contexto, podem, então, distinguir-se dois tipos de técnicas de encapsulação de fármacos em lipossomas: a encapsulação passiva e a encapsulação activa.

A encapsulação passiva é um processo físico simples em que, no caso de uma substância hidrofílica, esta é solubilizada num meio aquoso adequado com o que posteriormente se hidrata um filme lipídico seco. A encapsulação ocorre na sequência do processo de hidratação e durante a formação espontânea dos lipossomas. No caso de uma substância hidrofóbica, esta é dissolvida no solvente orgânico em que se efectua a mistura dos componentes lipídicos. Segue-se uma fase de secagem desta mistura, e posterior hidratação em solução aquosa, na sequência da qual ocorre a formação espontânea de lipossomas e a incorporação da referida substância no seio da região hidrofóbica da bicamada fosfolipídica. Neste trabalho efectuou-se a encapsulação passiva.

No caso da encapsulação activa, a associação da substância ocorre após a formação dos lipossomas. Substâncias que sejam bases fracas, com carácter anfifílico ou neutras (como por exemplo, a doxorubicina ou a vincristina) são susceptíveis de atravessar a bicamada fosfolipídica de lipossomas, pré-formados, na sequência da existência de um gradiente crescente no sentido interior dos lipossomas: gradiente de pH (Qiu *et al.*, 2008), de níquel (Cui *et al.*, 2009) ou de sulfato de manganésio (Cheung *et al.*, 1998). No interior dos lipossomas, a substância encapsulada adquire carga eléctrica o que impede a sua difusão através da bicamada.

Independentemente do método de encapsulação, e numa perspectiva de utilização dos lipossomas como vectores de fármacos, segue-se finalmente uma fase de remoção do material não encapsulado, por exemplo, por ultracentrifugação, diálise ou cromatografia de exclusão molecular.

1.2.1. PURIFICAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Na maior parte dos casos verifica-se que a encapsulação de fármacos em lipossomas não é completa, tornando-se essencial a remoção do material não encapsulado, uma vez que, ao fármaco livre pode estar associado um elevado potencial tóxico, (como acontece com muitos antibióticos, como é o caso dos aminoglicosídeos), ou o mesmo pode interferir com a estabilidade do lipossoma (Fonseca *et al.*, 1997).

Verifica-se igualmente de um forma frequente que, na sequência da preparação de um dado tipo de lipossomas, coexistem no mesmo meio várias populações de lipossomas, para além do material não encapsulado. É o que acontece, por exemplo, quando se preparam por extrusão, lipossomas unilamelares a partir de lipossomas multilamelares grandes. Caso se pretenda a utilização apenas de uma população, é necessário efectuar a sua purificação.

Portanto, uma vez preparados os lipossomas, segue-se necessariamente a sua purificação que corresponde à separação do material não encapsulado e/ou à separação de uma dada população de lipossomas de uma outra existente no mesmo meio.

Como exemplo de técnicas de purificação de lipossomas podem referir-se a cromatografia de exclusão molecular e a ultracentrifugação, cuja utilização depende de factores como o volume de amostra a tratar (Edwards e Baeumner, 2006).

O princípio de separação por cromatografia de exclusão molecular baseia-se nos diferentes tamanhos moleculares dos constituintes a separar, sendo os de menores dimensões retardados relativamente aos de maiores dimensões no seu deslocamento ao longo de uma coluna de gel, o qual se for escolhido de forma adequada permite uma separação eficiente (Ruysschaert *et al.*, 2005).

Na ultracentrifugação a amostra é sujeita a forças centrífugas que determinam, em função da sua intensidade, a sedimentação dos constituintes de maior densidade, permanecendo os restantes no líquido sobrenadante. Assim a ultracentrifugação, além de separar os componentes de uma mistura, tem também a vantagem de concentrar a amostra.

1.2.2. CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Após a purificação dos lipossomas, segue-se a sua caracterização. De entre vários parâmetros de caracterização destaca-se a quantificação do fosfolípido, a determinação do tamanho e da eficiência de encapsulação.

A eficiência de encapsulação (EE) é traduzida pelo quociente entre a razão molar do composto a encapsular e do lípido na preparação final e a razão molar desse composto e do lípido na fase inicial de hidratação expresso em percentagem:

$$EE(\%) = [\text{composto encapsulado}] / [\text{composto total}] \times 100$$

O trabalho aqui descrito envolveu a determinação da EE de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares (LUV) de fosfatidilcolina da gema do ovo (EPC).

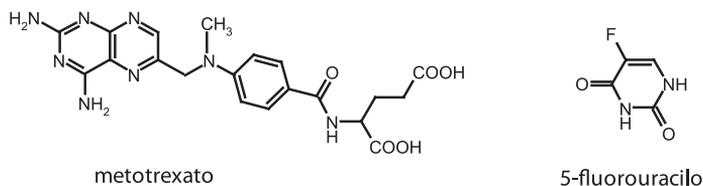


Figura 2. Estruturas do metotrexato e do 5-fluorouracilo.

A absorvância do filtrado (A_{filtr}) e a absorvância de uma solução contendo fármaco na mesma concentração mas sem lípido (A_{total}) foram determinadas. Igualmente determinada foi a absorvância do sobrenadante dos "brancos" (soluções contendo apenas lipossomas). Esta absorvância traduz a passagem de resíduos de fosfolípidos através da membrana dos tubos, e o seu valor foi subtraído ao A_{filtr} .

A EE foi calculada pela seguinte fórmula:

$$EE(\%) = [(A_{\text{total}} - A_{\text{filtr}}) / A_{\text{filtr}}] \times 100$$

2. METODOLOGIA

A EE do 5-fluorouracilo e do metotrexato em lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina da gema do ovo (EPC) foi determinada por separação de fases usando tubos de centrífuga Amicon Ultra-4, cuja membrana de celulose regenerada permite separar o fármaco em solução do que fica encapsulado no lipossoma.

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

A EPC foi adquirida à Sigma na forma de solução na concentração de 100 mg/mL em clorofórmio/metanol (9:1). Todos os outros reagentes utilizados eram de pureza *pro analysi* e foram requeridos à Merck. Todas as soluções foram preparadas com água bidesionizada (condutividade inferior a 0,1 μScm^{-1}).

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os lipossomas foram preparados pelo método clássico da hidratação do filme lipídico. Este método envolveu a secagem de uma solução de fosfolípido, em corrente de azoto, nas paredes de um balão de fundo redondo. O filme lipídico assim formado, em quantidade suficiente para se obter uma concentração final em fosfolípido de aproximadamente 1 mg/mL, foi hidratado, no caso das soluções designadas por “brancos”, com tampão Hepes (ácido *N*-(2-hidroxiethyl) piperazina-*N'*-2-etanossulfônico) (10 mM; pH 7,4; NaCl 0,1 M) ou com uma solução do fármaco em estudo no mesmo tampão. Efectuou-se assim uma encapsulação passiva. Após cerca de 30 minutos de hidratação, a agitação mecânica da mistura em vórtice originou o aparecimento de lipossomas multilamelares (MLV). Após um período de estabilização de 30 minutos a 25° C, os MLV foram extrudidos 10 vezes em corrente de azoto, com um extrusor Lipex™ Thermobarrel Extruder (Northern Lipids, Inc., Vancouver), à temperatura ambiente, usando-se filtros de policarbonato com 100 nm de diâmetro de poro (Northern Lipids), formando-se assim lipossomas unilamelares (LUV). Os lipossomas foram preparados e utilizados no próprio dia ou no período máximo de 2 dias após a sua preparação. A concentração de fármaco foi mantida entre 30 e 70 μM .

A quantificação de fosfolípido foi realizada segundo o método descrito por McClare (McClare, 1971), que se baseia na análise colorimétrica de um complexo de fosfomolibdato que, depois de reduzido, apresenta uma coloração azul de intensidade proporcional à quantidade de fosfato inorgânico existente na amostra e resultante da hidrólise ácida e subsequente mineralização dos fosfolípidos.

O diâmetro das vesículas foi determinado por espectroscopia de correlação fotónica (“Photonic Correlation Spectroscopy”-PCS), usando um Malvern ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern).

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada por separação de fases usando tubos de centrífuga Amicon Ultra-4 (30.000 Nominal Molecular Weight Limit). Para tal, 1 mL da suspensão de lipossomas foi colocado no reservatório dos tubos e estes sujeitos a uma rotação de 5 000 rpm numa centrífuga Heraeus Biofuge primo R. As absorvâncias do filtrado (A_{filtr}) e da solução de fármaco (A_{total}) foram determinadas por espectrofotometria ao comprimento

de absorção máxima do fármaco (264 nm para o 5-fluorouracilo e 301 nm para o metotrexato), tendo sido as amostras tratadas em triplicado. As soluções contendo apenas fármaco na mesma concentração foram filtradas com o mesmo sistema para verificar a passagem do fármaco em solução através da membrana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diâmetro médio encontrado para os LUV foi 125 ± 6 nm, com um índice de polidispersão de 0,27, e o potencial zeta foi de $-7,2 \pm 1,6$ mV. A concentração de EPC, determinada pelo método do fosfomolibdato, variou entre 0,7 e 0,9 mg/ml.

As absorvâncias dos sobrenadantes de suspensões contendo apenas lípido variaram entre 0,006 a 264 nm e 0,000 a 498 nm, o que indica uma adequada separação dos lipossomas. A_{filtr} foram subtraídos destes valores residuais de absorvância.

As EE encontradas foram $13,2 \pm 0,8$ % para o 5-fluorouracilo e $22,5 \pm 2,6$ % para o metotrexato (média e desvio padrão de pelo menos 2 ensaios individuais).

O efeito da concentração de fármaco na EE foi ainda testado para o metotrexato. Três diferentes concentrações deste fármaco foram testadas: 32 μM , 48 μM e 66 μM . Os resultados, representados na figura 3, têm uma variação contida dentro do erro experimental, o que leva à conclusão de que a percentagem de fármaco encapsulado é directamente proporcional à quantidade adicionada, no intervalo de concentrações estudadas.

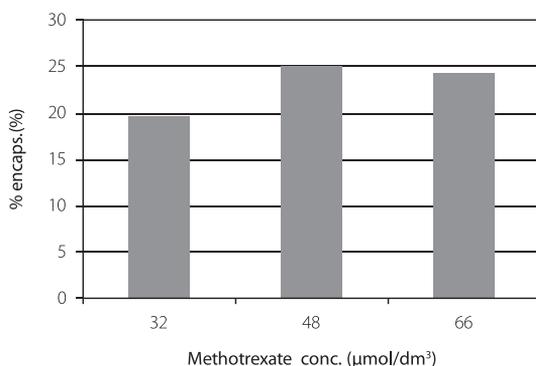


Figura 3. Eficiências de encapsulação do metotrexato a diferentes concentrações do fármaco. A concentração de lípido foi mantida constante a aproximadamente 1 mg/ml.

Neste estudo, os resultados de EE obtidos para o 5-fluorouracilo (13,2%) mostram que essa eficiência é da mesma ordem de magnitude que os valores encontrados por Nii e Ishii, tendo usado estes autores um método de microencapsulação (Nii e Ishii, 2005). No entanto, são ligeiramente mais elevados do que os descritos em outros trabalhos, onde os valores se situam entre 10 e 12% (Fresta et al., 1993; El Maghraby et al., 2001). Esta variação deve-se-á, provavelmente, a diferenças no estado de protonação da molécula. Uma vez que o 5-fluorouracilo é um ácido fraco, (pKa de 8,15 para um pH 7,4), ao valor de pH utilizado para este trabalho o composto deverá encontrar-se maioritariamente na sua forma protonada,

estrutura electricamente neutra e consequentemente mais lipofílica, o que pode explicar a maior EE encontrada.

Para o metotrexato, a literatura descreve um valor de EE de 31% (PC, pH=7,4) (Trotta et al., 2004) apresentando os resultados obtidos neste trabalho mostram valores mais baixos. No entanto, a EE está dependente das condições experimentais, tais como composição e pureza dos lípidos utilizados, concentração da solução de fármaco, tamanho e lamelaridade dos lipossomas. Como exemplo podemos referir que a indometacina apresenta uma encapsulação mais eficiente em LUV, quando em comparação com MLV (Matos, 2001).

4. CONCLUSÃO

Este trabalho descreve os resultados preliminares da encapsulação de dois fármacos anticancerígenos em lipossomas, com o intuito de desenvolver uma formulação de cedência modificada. A eficiência de encapsulação do 5-fluorouracilo (molécula mais hidrofílica) em lipossomas unilamelares grandes constituídos por fosfatidilcolina foi de 13,2% e para o metotrexato (molécula mais lipofílica) foi de 22,5%.

Este trabalho descreve os resultados preliminares da encapsulação de dois fármacos anticancerígenos em lipossomas, com o intuito de desenvolver uma formulação de cedência modificada. A modificação de parâmetros experimentais, tais como o pH ou o método de preparação das vesículas serão posteriormente testados, de forma a otimizar a EE destes compostos.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, T. M., MEHRA, T., HANSEN, C., CHIN, Y. C. (1992). Stealth liposomes – an improved sustained-release system for 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *In: Cancer Research*, 52 (9) pp. 2431-2439
- 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.
- CHEUNG, B.C.L., SUN, T.H.T., LEENHOUTS, J.M., CULLIS, P.R. (1998). Loading of doxorubicin into liposomes by forming Mn²⁺-drug complexes. *In: Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1414, 1-2, pp. 205-216.
- CUI, J., LI, C., WANG, L., WANG, C., YANG, H., LI, Y., ZHANG, L., ZHANG, L., GUO, W., LIANG, M. (2009). Ni²⁺-mediated mitoxantrone encapsulation: Improved efficacy of fast release formulation. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 368, pp. 24-30.
- DEFRISE-QUERTAIN, F., CHATELAIN, P., DELMELLE, M., RUYSSCHAERT, J.-M. (1984). Model studies for drug entrapment and liposome stability. *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. (Ed.), vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-18.
- EDWARDS, K. A., BAEUMNER, A. J. (2006). Analysis of liposomes. *In: Talanta*, 68, 1432-1441.
- EL MAGHRABY, G.M.M., WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. (2001). Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. *In: Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 8, pp.1069-77.
- FONSECA, J., VAN WINDEN, E.C.A., CROMMELIN, D.J.A. (1997). Doxorubicin induces aggregation of small negatively charged liposomes. *In: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43, pp. 9- 17.

- FRESTA, M., VILLARI, A., PUGLISI, G., CAVALLARO, G. (1993). 5-Fluorouracil – various kinds of loaded liposomes – encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 99, pp. 145–156.
- LASIC, D. D. (1993). *Liposomes- from Physics to Applications*. Elsevier, Amsterdam.
- MCCLARE, C.W.F. (1971). Accurate and convenient organic phosphorus assay. *In: Analytical Biochemistry*, 39, pp. 527-530.
- MATOS, C. (2001). Interação de fármacos com liposomas. Efeito nas propriedades físico-químicas. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- MOUTINHO, C., MATOS C., BALCÃO, V. (2007). Development of innovative nanotechnology-based drug delivery systems for cancer therapy. *In: Revista da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa*, 4, 94-104.
- NEW, R. R. C. (1990). *Liposomes-a practical approach*. Rickwood D., Hames B. D. (Eds.) IRL Press, Oxford.
- NII, T., ISHII, F. (2005). Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 298, pp. 198-205.
- QIU, L., JING, N., JIN, Y. (2008). Preparation and *in vitro* evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 361, pp. 56–63.
- RUYSCHAERT, T., MARQUE, A., DUTEYRAT, J. L., LESIEUR, S., WINTERHALTER, M., FOURNIER, D. (2005). Liposome retention in size exclusion chromatography. *In: BMC Biotechnology*, 5:11.
- SHARMA, A., SHARMA, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 154, pp. 123-140.
- TROTTA, M., PEIRA, E., CARLOTTI, M.E., GALLARATE, M. (2004). Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 270, pp. 119-125.