Preparation and characterization of cefixime-loaded liposomes

Dr. Lama Alhoushi*
Abd Alwahab Albyoush**

(Received 15 / 9 / 2023. Accepted 14 / 2 / 2024)

□ ABSTRACT □

This research aimed to prepare liposomes containing cefixime. The phospholipids forming liposomes envelopes were extracted locally from egg yolk. Cefixime was chosen as an active drug because of its anti-cancer properties, by inhibiting the biosynthesis of nucleic acids and proteins in cancer cells and by its binding to cellular DNA.
Liposomes were prepared by Bingham method (hydration of thin film) and they were homogeneous and almost spheric. The prepared liposomes were investigated for structure, particle size and encapsulation efficiency (EE). Different factores were studied (eg: cefixime and cholesterol quantites).
The dimensions ranged between 1and 50 microns and the $EE_{(s)}$ were between 94 and 98%. An increase in the particles size and EE was observed by increasing cholesterol and cefixime quantities ($p < 0.05$). However when the amount of cefixime was reduced, the EE was reduced ($p < 0.05$).

Key words: liposomes, cefixime, Entrapment efficiency, Bingham, particle size.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

***Assistant Professor - Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology - Faculty of Pharmacy - Tishreen University - Latakia – Syria. lamaalhaushey@yahoo.fr**
****Postgraduate student – Industrial pharmacy - Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology - Faculty of Pharmacy - Tishreen University - Latakia – Syria. Abd.alwahab.abd95@gmail.com**

تحضير وتحديد خصائص ليبوزومات حاويةً السيفيكسيم

د. لمى الهوشي*

عبد الوهاب البيوش**

(تاريخ الإيداع 15 / 9 / 2023. قبل للنشر في 14 / 2 / 2024)

□ ملخّص □

يهدف البحث إلى تحضير ليبوزمات حاوية على السيفيكسيم، حيث تم استخلاص الفوسفولبيدات المكونة لليبوزومات محليا في مخابر كلية الصيدلة بجامعة تشرين وتم اختيار السيفيكسيم كمادة فعالة بسبب خواصه المضادة للسرطان حبث أنه يثبط الاصطناع الحيوي للحموض النووية في الخلايا السرطانية ويثبط اصطناع البروتينات الضرورية للخلية، أيضاً مثبط لعامل النخر الورمي ألفا بالإضافة لارتباطه بالـ DNA الخلوي.

تم تحضير الليبوزومات بطريقة بينغهام (اماهة الفيلم الرقيق) وقد كانت متجانسة وأقرب إلى الشكل الكروي. تم تقييم الليبوزمات المحضرة من ناحية الشكل، أبعاد الجسيمات، وفعالية الحفظ. وقد تم دراسة العديد من المتغيرات منها (كمية السيفيكسيم والكوليستيرول).

تراوحت ابعاد الجسيمات المحضرة بين 1 و50 ميكرون أما فعالية الحفظ فقد تراوحت بين 94 و98% وقد لوحظ زيادة في ابعاد الجسيمات وفعالية الحفظ بزيادة كمية الكوليستيرول والسيفيكسيم ($p <0.05$)، بينما عند انقاص كمية السيفيكسيم لوحظ انخفاض فقط في فعالة الحفظ ($p <0.05$).

الكلمات المفتاحية: ليبوزومات، سيفيكسيم، فعالية الحفظ، بينغهام، أبعاد الجسيمات.

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* **أستاذ مساعد- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.lamaalhaushey@yahoo.fr**

** **طالب ماجستير- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.Abd.alwahab.abd95@gmail.com**

مقدمة

ظهرت في أوائل القرن الماضي مجموعة من الأشكال الصيدلانية كالمضغوطات والكبسولات والحقن وغيرها والتي ساهمت بشكل كبير في القضاء على الكثير من الأمراض أو على الأقل من تخفيف حدتها، ولكن بعض الأمراض كالأورام الخبيثة (السرطانات) والأخماج الفطرية وغيرها كان من الصعب علاجها بتلك الأشكال التقليدية، لأن هذه الأدوية لا تميز بين الخلايا السليمة أو المريضة وهذا ما سبب الكثير من الآثار الجانبية غير المرغوبة {1,2}.

لذلك جَهِد العلماء على ابتكار شكل صيدلاني قادر على حمل الدواء إلى الموقع المراد وحمايته من العوامل الخارجية، حتى تمكن العالم البريطاني أليك بينغهام عام 1961 م من انتاج شكل صيدلاني جديد ناتج عن التجمع الذاتي للفوسفوليبيدات ومكوناً من غشاء مشابهٍ لغشاء الخلايا الحية {1.2}.

سمي هذا الشكل الصيدلاني بالليبوزومات Liposomes وهذه الكلمة مشتقة من الكلمة الإغريقية حيث أن lipo تعني الشحمي و some تعني جسيم ولذلك سميت باللغة العربية بالجسيمات الشحمية {1.2}.

الليبوزومات هي أحد أنظمة إيتاء الدواء فهي تتشكل من التجمع الذاتي للفوسفوليبيدات في محلول مائي منتجة بنية ذات مركز مائي أو محب للماء ومحاط بطبقة ثنائية لبيدية مغلقة، وتصنف اعتماداً على بنيتها وطريقة تحضيرها وتركيبها واستخدامها، علماً أن التصنيف الشائع لها هو حسب البنية {2.3}.

تصنف الليبوزومات إلى ليبوزومات وحيدة الغشاء **L**iposome **V**iscles **L**amellar **U**ny (ULV) وهذه بدورها تقسم إلى صغيرة **S**mall **U**ny **L**amellar **V**iscles (SUV) وكبيرة **L**arg uny **L**amellar **V**iscles (LUV) وليبوزومات متعددة الأغشية **M**ulti **L**amellar **V**iscles **L**iposome (MLV) وليبوزومات متعددة الأجواف **M**ulti **V**iscular **V**iscles **L**iposome (MVV)، وهذه الجسيمات المجهرية تتراوح أبعادها من عدة نانومترات إلى عشرات الميكرومترات قد تصل حتى 50 ميكرومتر {2.3}.

تتميز الليبوزومات بأنها قادرة على حمل المواد الدوائية سواءً المائية أو المحبة للماء وذلك في المركز، أيضاً تحمل المواد اللبيدية أو المذبذبة ضمن غشائها اللبيدي. استخدمت الليبوزومات بكثرة في حمل المواد الدوائية المستخدمة لعلاج الأمراض السرطانية بمختلف أنواعها والأخماج الفطرية الجهازية ومن ميزاتها أيضا أنها تستخدم لإطالة التحرر وكذلك لحمل الأدوية ذات العمر النصفي القصير وبالتالي تقليل جرعة الأدوية المعطاة وهذا يقلل من آثارها الجانبية {3}.

تتأثر خصائص الليبوزمات (أبعاد وبنية وفعالية حفظ) بمجموعة من عوامل التحضير والصياغة (كمية الفوسفوليبيدات، الكوليستيرول، كمية المادة الفعالة، طريقة التحضير).

مع انتشار الأمراض السرطانية وغزوها مختلف الأعضاء البشرية انتشرت أيضاً وتنوعت الأدوية المستخدمة في علاجها ومن هذه الأدوية السيفيكسيم المصنف كصاد حيوي واسع الطيف من عائلة السيفالوسبورينات الجيل الثالث.

يملك السيفيكسيم كذلك قدرة كمضاد سرطاني خفيف إلى متوسط، حيث أنه قادر على الارتباط بالـ DNA الخلوي، ويثبط الاصطناع الحيوي للحموض النووية في الخلايا السرطانية ومثبط لاصطناع البروتينات الضرورية للخلية السرطانية وهو أيضا مثبط لـ PDE4 وهذا ما يزيد الـ cAMP في الخلية، أيضاً يثبط عامل النخر الورمي ألفا، ولكن من مشاكله أنه ذو مشعر علاجي ضيق وعمر نصفي قصير وهذا ما طرح فكرة إدخاله ضمن الليبوزومات لتفادي هذه المشاكل، حيث بذلك تنقص عدد الجرعات وبالتالي تحسين مطاوعة المريض {4.5}.

أهمية البحث وأهدافه

تكمن **أهمية** البحث بحل المشاكل المتعلقة بالأشكال الصيدلانية التقليدية، والاستمرار بتعريف السوق المحلية بالأشكال الصيدلانية الحديثة، تطوير طريقة لتحضير الجسيمات الشحمية في مخابر كلية الصيدلة، وبالتالي **يهدف** البحث إلى تحضير ليبوزومات السيفيكسيم باعتباره مادة مضادة سرطانية في مخابر كلية الصيدلة، ودراسة العوامل المؤثرة (كمية الكوليستيرول والسيفيكسيم) على خصائص الجسيمات المحضرة من حيث الأبعاد وفعالية الحفظ.

طرائق البحث ومواده

- المواد والأجهزة

- المواد

سيفيكسيم (Medico Pharmaceuticals)، كوليستيرول (E,mercl/Germany)، كحول إيتيلي 100% (Qualikems/India) ، أسيتون (Qualikems/India)، ماء مقطر حديثا (Diahan/Korea).

- الأجهزة والأدوات المستخدمة

تم استخدام مجموعة من الأدوات المخبرية والأجهزة المتوفرة في مخابر كلية الصيدلة–جامعة تشرين والموضحة ضمن الجدول رقم (1) كما تم الاستعانة ببرنامج imag–j (USA 2019) لتحديد أبعاد الليبوزومات.

الجدول رقم (1): الأجهزة المستخدمة في البحث

الجهاز المستخدم	الطراز
ميزان حساس ذو حساسية 0.001 غ	RADWAG AS 220/C/2, Poland
جهاز المبخر الدوار	BUCHI ROTAVAPOR R200 /Germany/
مقياس الطيف الضوئي	(Spectrophotometer) Jasco V–530 UV/VIS Spectrophotometer /Japan
محرك مغناطيسي	BOECO MSH–300/ Germany
فرن تجفيف	Carbolite/England
مثفلة	Erweka TBH/Germany
مجهر ضوئي	CH2 OBIMF200/Japan

طرائق البحث

–استخلاص الفوسفوليبيدات

تم استخلاص الفوسفوليبيدات من صفار البيض وفق الطريقة التي اتبعها الباحث Bernardoa وزوملاؤه عام 2019. باختصار تم إضافة 160 مل من الاسيتون إلى 37 غ صفار البيض ثم التثفيل بسرعة 4000 rpm لمدة 15 دقيقة رمي الجزء الطافي وأخذت الرسابة. بعدها أضيفت إلى الرسابة 150 مل من الايتانول المركز الحاوي على EDTA من أجل منع الفوسفوليبيدات من التأكسد أثناء الاستخلاص ثم تم التثفيل بسرعة 4000 rpm لمدة 15 دقيقة.

أخذ الجزء الطافي الحاوي على الفوسفولبيدات ورميت الرسابة. حُضن الطور الطافي في الظلام بدرجة حرارة 4 مْ لمدة 24 ساعة، بعد تشكل الراسب والترشيح أخذت الرشاحة وخضعت للتبخير بالمبخر الدوار بالدرجة 49 مْ وضغط 90 ملم زئبقي فتم الحصول على فوسفولبيدات بمردود 3.1% {13}.

-تحضير الليبوزومات

تم تحضير الليبوزومات بالطريقة التي استخدمها الباحث Sebaaly وزملاؤه عام 2015 {5}. باختصار حل 1غ من الفوسفولبيدات التي تم استخلاصها من صفار البيض مع 150 (أو 300) ملغ كوليستيرول في 50 مل إيتانول تحت التحريك باستخدام محرك ميكانيكي بسرعة 600 rpm وبدرجة حرارة 30 مْ، بعدها وباستخدام المبخر الدوار تم تبخير الإيتانول بدرجة حرارة 49 مْ وسرعة تحريك 20 rpm وضغط 90 ملم زئبقي لمدة 15 دقيقة. بعد تشكل فيلم رقيق على سطح الحوجلة الداخلي تمت الإماهة بواسطة وقاء فوسفاتي pH=7.37 مع التحريك ببطء لمدة 5 دقائق {5}.

لتضمين السيفيكسيم ضمن الليبوزومات المتشكلة حل1 (أو 0.5) غ سيفيكسيم في 20 مل مزيج أسيتون وميتانول بنسبة 1:1 ح/ح وأضيف للمعلق الليبوزومي كاملاً ومن ثم حضنت في الدرجة 40 مْ لمدة ساعتين، ثفل الناتج بسرعة 4000 rpm لمدة 45 دقيقة.

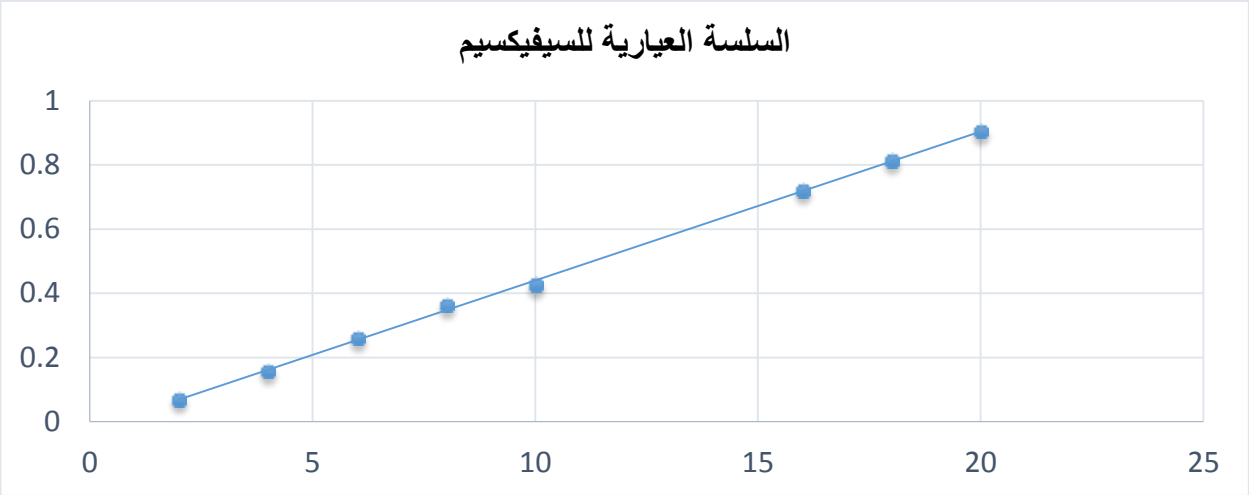
يوضح الجدول (1) الصيغ المحضرة وفق عوامل متغيرة متعددة.

الجدول رقم (2): صيغ الليبوزومات المحضرة وفق متغيرات عدة

رمز الصيغة / المكون المستخدم	F1	F2	F3
فوسفولبيدات (غ)	1	1	1
كوليستيرول (ملغ)	150	300	300
سيفيكسيم (غ)	1 غ	1	0.5

-تحضير السلسلة العيارية للسيفيكسيم هيدروكلورايد في الماء المقطر

تم تحضير محلول أم من السيفيكسيم وذلك بحل 100 ملغ منه ضمن 50 مل إيتانول في بالون سعة 100 مل وأُكمل بالماء المقطر حتى خط العيار. مُدّدَ المحلول عدة مرات باستخدام مزيج كحول:ماء (1:1) للحصول على تراكيز السلسة العيارية وقيست امتصاصية السيفيكسيم باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجة الامتصاص الأعظمي 287 نم. تم الحصول على مخطط السلسلة العيارية الموضح بالشكل (1) وكانت المعادلة التالية $y = 0.0464x - 0.0237$، ($R^2 = 0.9993$) والتي استخدمت لحساب فعالية حفظ السيفيكسيم ضمن الليبوزومات.



شكل (1) السلسلة العيارية للسيفيكسيم ضمن الماء والايتانول

دراسة خصائص الليبوزومات

ابعاد الجسيمات Particle size

أجري هذا الاختبار بفحص الجسيمات المحضرة مجهرياً حيث تم التقاط عدة صور بواسطة المجهر الضوئي وحللت أبعاد 400 جسيمة باستخدام برنامج image-j المعتمد من الولايات المتحدة الأمريكية {23}.

حساب فعالية الحفظ Entrapment efficiency (EE%)

تعبر فعالية الحفظ عن كمية المادة المحتفظة ضمن الليبوزومات، وتعطى بالعلاقة التالية:

فعالية الحفظ%= ((كمية السيفيكسيم الكلية –كمية السيفيكسيم غير المحتفظة) / الكمية الكلية) *100 {9}

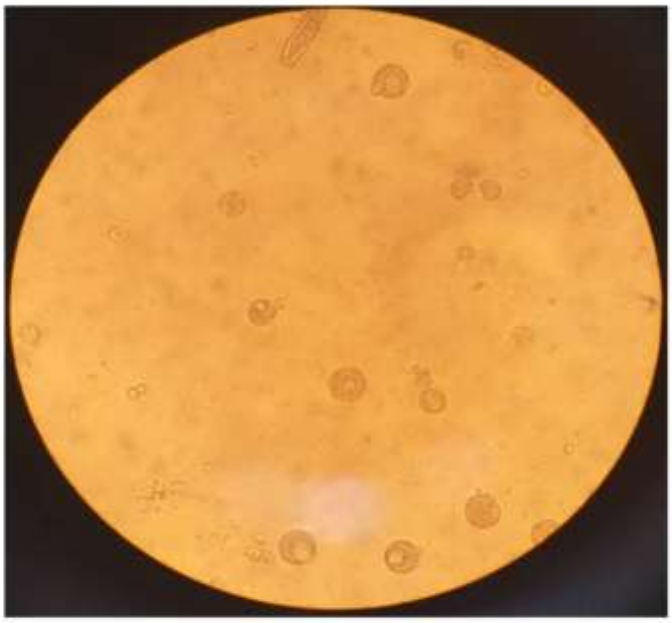
وتتم عن طريق اخذ كمية من معلق الليبوزومات المحضر وفق الفقرة (2–2–2) وبعد التثفيل بسرعة 4000 rpm لمدة 45 دقيقة يؤخذ الطور الطافي وتُقاس امتصاصية السيفيكسيم عند طول الموجة 287 نم باستخدام مقياس الطيف الضوئي (n=3). تحسب فعالية الحفظ حسب العلاقة السابقة وذلك بعد التعويض في معادلة السلسلة العيارية y = 0.0464x – 0.0237، (R^2 =0.9993).

2–3–3 الدراسة الإحصائية

تمت الدراسة الإحصائية للمقارنة بين الصيغ المحضرة حيث تم اجراس اختبار t–student لمعرفة أهمية المتغيرات المدروسة باستخدام برنامج نظام التحليل الأمريكي (STATISTICS, VERSION 4,0)، للمقارنة بين متوسطين حسابيين، وذلك بهدف دراسة تأثير كمية (سيفيكسيم:كوليستيرول) على نتائج فعالية الحفظ وأبعاد الجسيمات،مع العلم أنه تم اعتبار العامل المدروس ذا دلالة إحصائية هامة عندما تكون قيمة P أصغر من 0.05.

النتائج والمناقشة

بعد سلسلة من التجارب البدئية والمحضرة وفق الطريقة المبينة في الفقرة (2–1) وبعد تغيير مجموعة من العوامل (كمية سيفيكسيم وكوليستيرول) تم التوصل إلى الحصول على ليبوزومات متجانسة، كروية، منتظمة في أغلبها كما يبين الشكل (2).



الشكل (2): شكل الليبوزومات المحضرة وفق الصيغة F2

جدول (3): ابعاد وفعالية الحفظ ضمن الليبوزومات وذلك حسب العوامل المتغيرة المدروسة

رقم الصيغة / العامل المدروس	F1	F2	F3
توزع ابعاد الجسيمات (µm)	13.65-1.39	31.52−1.54	14.45−1.84
البعد الوسطي (M±SD)	0.71±4.81	1.72±9.98	0.89±4.87
فعالية الحفظ%(M±SD)	0.15±97.37	0.02±98.34	0.13±94.45

-أبعاد الجسيمات

أظهرت الصيغ اختلافاً في أبعاد الجسيمات بتغير النسبة (دواء: كوليستيرول) حيث لوحظ زيادة الأبعاد بزيادة كمية الكوليستيرول من 150 إلى 300 ملغ وذلك في الصيغتين F1 وF2 ($P<0.05$). يمكن تفسير ذلك بسبب الحجم الجزيئي الذي يشغله الكوليسترول ضمن الليبوزم وتوافقت نتيجة هذا البحث مع نتائج الدراسة التي أجراها الباحث Zhai وزملاؤه عام 2009 حيث قاموا بتحضير ليبوزمات حاوية الدوسيتاكسيل وقاموا بزيادة كمية الكوليستيرول حتى 70% فلاحظوا زيادة في الأبعاد إلى حد معين وبعدها نقصت أبعاد الجسيمات {10}.

كما توافقت مع نتائج الدراسة التي أجراها الباحث Rachel وزوملاؤه عام 2013 حيث قاموا بتحضير ليبوزومات حاوية الـ DNA ولاحظوا زيادة في أبعاد الجسيمات بزيادة كمية الكوليسترول وتم تفسير ذلك بسبب الحجم الجزيئي الذي

يشغله الكوليستيرول ضمن الغشاء الليبوزومي وزيادة متانة الغشاء الليبوزومي والذي يمنع تسرب المواد المكونة لليبوزوم ويحافظ على بنيته {19}.

أيضاً توافقت مع نتائج الباحث Robert وزملاؤه عام 2015 حيث قاموا بتحضير ليبوزومات حاوية التاكسان ودراسة تأثير زيادة الكوليستيرول حتى 30% لوحظ زيادة في أبعاد الجسيمات، أيضا تم تفسير ذلك بالحجم الجزيئي الذي يشغله للكوليستيرول ضمن الليبوزوم {20}.

- (فعالية الحفظ EE)

أظهرت الصيغ اختلافاً بسيطاً من ناحية فعالية حفظ المادة الفعالة بتغير النسبة (دواء: كوليستيرول) ($P<0.05$) ويفسر ذلك بأن الدواء المحلول ينتقل إلى داخل الليبوزومات حسب مدروج التركيز من التركيز المرتفع إلى التركيز المنخفض فكلما كان تركيز المادة الدوائية أعلى كان انتقالها أكبر لداخل الليبوزومات وهذا يزيد من فعالية الحفظ والعكس صحيح وقد كانت هذه النتيجة مماثلة لدراسة اجراها الباحث Reddy وزملاؤه على ليبوزومات السيفيكسيم حيث زادت فعالية الحفظ بزيادة كمية السيفيكسيم كما أن زيادة كمية الكوليستيرول حتى 50% (من كمية المادة الفعالة) يؤدي لزيادة فعالية الحفظ ذلك لأن الكوليستيرول يزيد متانة وصلابة الليبوزومات ويمنع تسرب المادة الدوائية عبرها {11}.

الاستنتاجات والتوصيات

في هذه الدراسة تم تحضير الليبوزومات بطريقة بينغهام ودراسة خصائصها (شكل وأبعاد وفعالية حفظ) تبين أن معظم الليبوزومات المحضرة كانت كروية، منتظمة ومتجانسة. تراوحت أبعاد الجسيمات بين 1 و50 ميكرون وزادت الأبعاد بزيادة كمية الكوليستيرول والسيفيكسيم بسبب التوضع الجزيئي لهما ضمن الليبوزوم. وجد كذلك أن فعالية الحفظ تزداد بزيادة كمية السفيكسيم والكوليستيرول حيث أن الكوليستيرول يعطي متانة للغشاء ويمنع تسرب المادة الدوائية عبرها وقد تراوحت فعالية الحفظ بين 94 و98 %.

References:

1. Bhatia, A., R. Kumar, and O.P. Katare, Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. J Pharm Pharm Sci, 2004. 7(2): p. 252-9.
2. Crosasso, P., et al., Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. J Control Release, 2000. 63(1-2): p. 19-30.
3. Habib, L., et al., Preparation and characterization of liposomes incorporating cucurbitacin E, a natural cytotoxic triterpene. Int J Pharm, 2013. 448(1): p. 313-9.
4. Sebaaly, C., et al., Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food Chem, 2015. 178: p. 52-62.
5. Vemuri, S. and C.T. Rhodes, Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. Pharm Acta Helv, 1995. 70(2): p. 95-111.
6. Niu, G., B. Cogburn, and J. Hughes, Preparation and characterization of doxorubicin liposomes. Methods Mol Biol, 2010. 624: p. 211-9.
7. BY V. P. SKIPSKI, R.F.P.A.M.B., Quantitative Analysis of Phospholipids by Thin-Layer Chromatography. 1963. 5(1-5): p. 347-378.
8. H. HAlTA, J.S.S., and S. NAKAI, Separation of Phospholipids from Egg Yolk and Recovery of Water-Soluble Proteins. JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 1998. 1-4: p. 425-429.

9. Olga Popovska1*, J.S., Zoran Kavrakovski2, Vesna Rafajlovska1, An Overview: Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, 2013. 8(1-2): p. 182-189.
10. Zhai, G., et al., Preparation, characterization and pharmacokinetics of folate receptor-targeted liposomes for docetaxel delivery. J Nanosci Nanotechnol, 2009. 9(3): p. 2155-61.
11. Reddy, K.H.R.M.M., IN-VITRO FORMULATION AND EVALUATION OF CEFIXIME LIPOSOME FORMULATION. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 2012. 10(2).
12. Chauhan Tikshdeep*, A.S., Parashar Bharat and Chandel Abhishek, Liposome Drug Delivery: A Review. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL SCIENCES, 2012. 11(2): p. 754-764.
13. João Bernardoa, R.A.V., Patrícia Valentão, Extraction of phospholipid-rich fractions from egg yolk and development of liposomes entrapping a dietary polyphenol with neuroactive potential. Food and Chemical Toxicology, 2019. 11(2-3): p. 1-11.
14. Rachel M. Levine, T.R.P., Preparation and Characterization of Liposome-Encapsulated Plasmid DNA for Gene Delivery. American Chemical Society, 2013. 8(1-3): p. 9208-9215.
15. B. RAMESH, S.S.A., A.V. PRABHUDESAI, and C.V. VlSWANATHAN,, Selective Extraction of Phospholipids from Egg Yolk. JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2004. 3(1): p. 585-587.
16. Laouini1, A. 2012. 'Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art', Journal of Colloid Science and Biotechnology, 22.
17. Moyá, Maria Luisa. 2019. 'Preparation and Characterization of New Liposomes. Bactericidal Activity of Cefepime Encapsulated into Cationic Liposomes', MDPI, 13.
18. Olga Popovska1*, Jana Simonovska1, Zoran Kavrakovski2, Vesna Rafajlovska1. 2013. 'International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research', *www.eijppr.com*, 9: 8.
19. Rachel M. Levine, † Timothy R. Pearce. 2013. 'Preparation and Characterization of Liposome-Encapsulated Plasmid DNA for Gene Delivery', 9: 8.
20. M., Robert. 2015. 'Preparation and Characterization of Taxane-Containing Liposomes', 22: 21.
21. G, and ojjala Venugopalarao1. 2015. 'Preparation and characterization of cefditoren pivoxil-loaded liposomes for controlled in vitro and in vivo drug release', *International Journal of Nanomedicine*, 1: 9.
22. João Bernardoa, Romeu A. Videiraa, Patrícia Valentão. 2019. 'Extraction of phospholipid-rich fractions from egg yolk and development of liposomes entrapping a dietary polyphenol with neuroactive potential', *Food and Chemical Toxicology*, 1: 11
23. Rueden1, Curtis T. 2017. 'ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data', *BMCBioinformatics*, 1: 26.