

ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LIPOSSOMAS

MARIA VIRGÍNIA SCARPA* ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA* IOLANDA MIDEA CUCCOVIA**

* Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista - Unesp - Araraquara - SP.

** Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo - São Paulo - SP.

1 - ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

Compostos anfífilos apresentam em sua estrutura uma região polar (iônica ou não) e uma região apolar, geralmente representada por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas com mais de oito grupos metilênicos (esquema I). Em concentração acima da concentração micelar crítica (CMC) essas moléculas associam-se em presença de excesso de água, formando diferentes tipos de agregados supramoleculares, tais como micelas, monocamadas, multicamadas, microemulsões e vesículas (Tanford, 1980; Fendler, 1982; Israelachvili, 1991) (esquema II). A CMC de anfífilos que formam bicamadas é, em geral, menor que 10^{-8} M (Ringsdorf et al., 1988; Fendler, 1982).

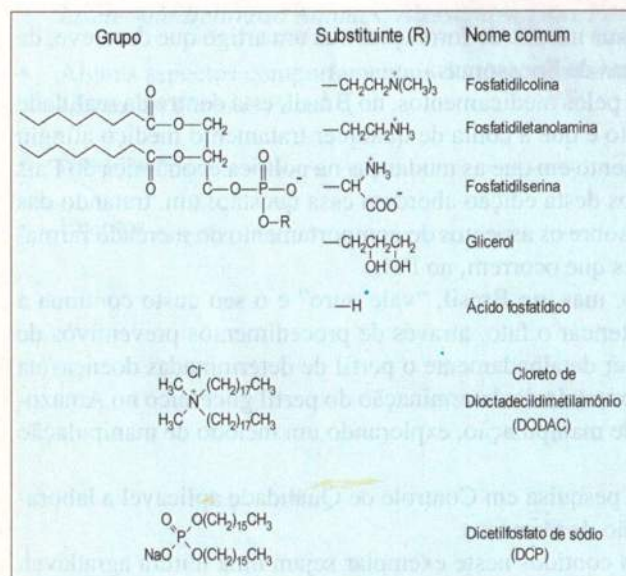
A organização de anfífilos em água depende da contribuição relativa das regiões hidrofóbica e hidrofílica da molécula (Israelachvili, 1991; Tanford, 1980; Ringsdorf et al., 1988).

Anfífilos contendo duas cadeias hidrocarbônicas longas tendem a formar bicamadas. Entre os compostos capazes

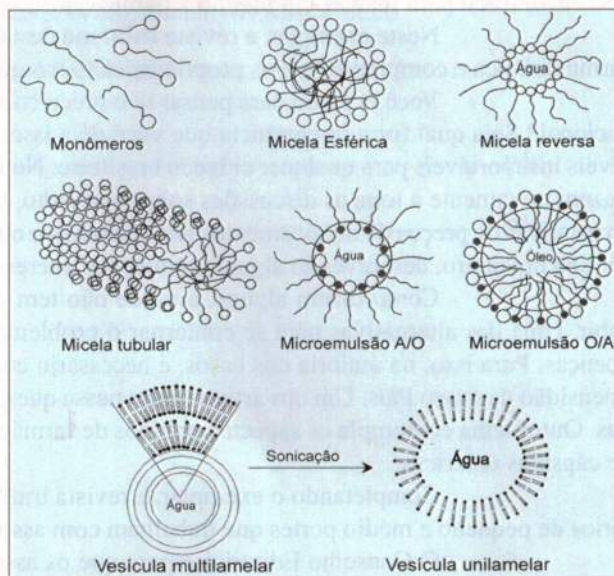
de formar bicamadas estão os fosfolipídios. A propriedade de formar bicamadas não é exclusiva de fosfolipídios, mas uma característica geral de anfífilos com estruturas apropriadas (esquema I e II). Estes compostos podem ser positivamente carregados, como o cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC), negativos, como o dicetilfosfato de sódio (DCP), zwitteriônicos como a dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) ou sem carga como octilglicosídeo (Allen, T.M., 1984).

Vesículas podem ser definidas como agregados geralmente esféricos, com diâmetros variando de 25 nm até microns, cuja estrutura consiste de uma bicamada que delimita um compartimento aquoso interno central. Agregados contendo mais de uma bicamada são conhecidos como vesículas multilamelares ou lipossomas (Fendler, 1982).

O termo lipossoma foi utilizado pela primeira vez por Alec Bangham, na década de 1960, para descrever estruturas concêntricas de bicamadas multilamelares que se formavam após adição de água a filmes secos de fosfolipídios (Bangham, 1964).



Esquema I - Estrutura química de compostos anfífilos.



Esquema II - Algumas estruturas formadas por anfífilos.

Lipossomas podem ser classificados de acordo com o número de bicamadas (unilamelares ou multilamelares), o tamanho (grandes ou pequenos) ou o método de preparação.

Vesículas e lipossomas variam de tamanho e homogeneidade conforme o método de preparação (Lasic, 1988). Podem ser preparados por simples dispersão aquosa de um filme de anfífilo com agitação mecânica; sonicação; injeção; em meio aquoso de anfífilos dissolvidos em solvente orgânico; evaporação em fase reversa; extrusão; etc (Lasic, 1988).

Sonicação é empregada para obtenção de vesículas unilamelares pequenas (small unilamellar vesicles) (SUV's). SUV's também podem ser obtidas por extrusão, que consiste na

passagem da dispersão, através de uma membrana de poro pequeno, sob alta pressão (como revisado em Cuccovia et al., 1997a).

Vesículas unilamelares grandes (large unilamellar vesicles) (LUV's) com diâmetro hidrodinâmico (D_h) maior que 100 nm podem ser preparadas por métodos como evaporação em fase reversa, injeção de solvente ou extrusão (Cuccovia e Chaimovich, 1996).

A considerável variação de energia livre, quando a molécula do anfífilo passa da água para um ambiente hidrofóbico (15,3 kcal/mol para DPPC e 13,0 kcal/mol para DMPC), explica a preferência dos anfífilos em organizarem-se na forma de bicamada, de modo a não permitir o contato da água com a

região hidrofóbica do anfifílico (Weiner et al., 1988). Essa estrutura é alcançada pelos anfifílicos em condições que dependem de interações entre as moléculas, de interações com a água e da relação entre a área de superfície da região polar, e a área de superfície da região hidrofóbica após a hidratação (Chapman, 1975; Hayward e Smith, 1990).

Vesículas de fosfolípidios são metaestáveis e reverterem para estruturas multilamelares com o tempo (Lasic, 1988). A adição de sais e aditivos orgânicos pode causar aumento do diâmetro hidrodinâmico (Dh) médio das vesículas (Cuccovia e Chaimovich, 1996).

Os fragmentos formados transientemente, durante a sonicação, agregam-se espontaneamente. Como fragmentos, suas extremidades, que são hidrofóbicas, estão expostas ao meio aquoso polar. Tal exposição contribui com um termo desfavorável na energia livre de transferência dos fragmentos de membrana de um meio apolar para a água, ou seja, o fragmento é instável quando seus extremos estão expostos a um meio aquoso (Cornell et al., 1980).

O termo entrópico desfavorável é anulado, quando as extremidades hidrofóbicas dos fragmentos se associam, diminuindo assim a superfície hidrofóbica exposta à água. Esses fragmentos ligados podem eventualmente fechar-se, formando uma esfera, e assumindo uma curvatura mínima que favorece o processo de formação da vesícula (Cornell et al., 1980). Os fosfolípidios situados na face externa da superfície curva, especialmente em vesículas pequenas, têm suas cadeias hidrofóbicas mais comprimidas do que numa bicamada plana. A ordenação dos lípidios contribui com um termo de entropia desfavorável para a formação de vesículas. A interação desfavorável dos extremos hidrofóbicos dos fragmentos com água que leva a formação da vesícula deve ser contrabalançada pelo termo entrópico desfavorável devido a problemas de empacotamento induzidos pela superfície curva, ou seja, a superfície com um pequeno raio de curvatura. Quando esses termos energéticos são equilibrados, obtêm-se vesículas de um tamanho mínimo (Cornell et al., 1980).

Vesículas de fosfatidilcolina (PC) obtidas por dispersão ultra-sônica foram estudadas e caracterizadas (Huang, 1969; Huang e Mason, 1978). Estas vesículas são relativamente estáveis, frente à força iônica, podendo ser preparadas em 0,3 M de KCl. As vesículas obtidas por sonicação de fosfatidilcolina (PC) de ovo são pequenas, com forma predominantemente esférica, diâmetro externo de 250 Å, compartimento aquoso interno com diâmetro de 150 Å, espessura da bicamada de 50 Å (Huang, 1969; Huang e Mason, 1978) e cerca de 3.000 monômeros (Cornell et al. 1980; Hauser et al., 1973).

Entre as vesículas de dialquilamônio, as produzidas a partir de DODAC têm sido as mais investigadas e melhor caracterizadas (Carmona-Ribeiro e Chaimovich, 1983; Carmona-Ribeiro et al., 1984; Cuccovia et al., 1990a; 1990b). Entretanto, ainda existem dúvidas se de fato obtêm-se vesículas ou fragmentos quando se usa o método de sonicação com este anfifílico (Cuccovia e Chaimovich, 1996). A formação de estruturas abertas que, lenta e espontaneamente, formam vesículas grandes fechadas tem sido sugerida para vesículas de DODAC (Carmona-Ribeiro, 1992; Cuccovia e Chaimovich, 1996) e DCP

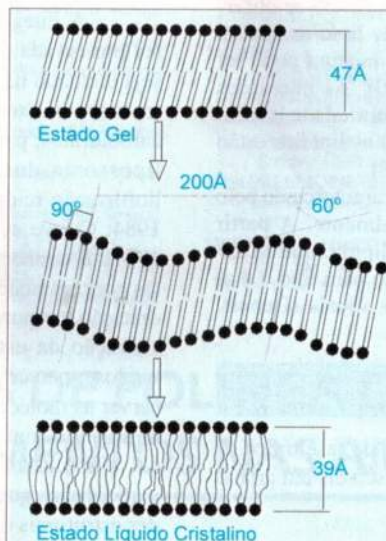
(Anderson et al., 1995; Hammarström et al., 1995). Até hoje não está claro se esses agregados são muito permeáveis ou se as estruturas são abertas (Cuccovia e Chaimovich, 1996).

2 - TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE

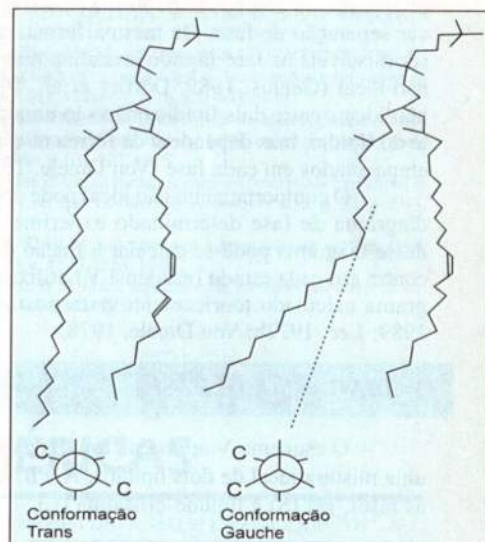
Uma importante característica das bicamadas de lípidios é a existência de uma temperatura de transição de fase, propriedade geralmente reversível, específica para cada lípidio e estrutura, onde a organização dos fosfolípidios na membrana muda bruscamente. Para todas estruturas formadas por fosfolípidios existe uma temperatura na qual as cadeias hidrocarbônicas sofrem transformação (reversível) passando de um estado mais ordenado, gel ($L\alpha$) para um estado mais fluido e desordenado, líquido-cristalino ($L\beta$) (Sturtevant, 1984; Lee, 1977a; 1977b) (esquema III). A temperatura na qual ocorre esta transição é denominada de temperatura de transição de fase (T_m). Na região de transição de fase coexistem anfifílicos no estado gel e no estado líquido-cristalino ($L\alpha + L\beta$).

Abaixo da T_m , as ligações simples C-C das cadeias alifáticas dos lípidios estão em conformação "trans" dando origem a um estado de maior rigidez. Acima da T_m , a bicamada lipídica passa para um estado mais fluido que o estado gel, denominado estado líquido-cristalino, o qual é decorrente do aumento da probabilidade de rotações "gauche" ao redor das ligações simples C-C da cadeia alifática e da formação de dobraduras (Lee, 1977a) (esquema IV).

A T_m depende tanto da natureza dos grupos hidrofílicos como também do comprimento e grau de insaturação da cadeia carbônica do anfifílico (Lee, 1977a). Pode ser modulada pela adição de esteróides, como o colesterol ou misturas de anfifílicos (Chapman, 1975; Tyrrell, 1976; Lee, 1977b).



Esquema III - Estados das bicamadas de fosfolípidios (New, 1990).



Esquema IV - Rotação das cadeias alifáticas dos lípidios abaixo da T_m ("trans") e acima da T_m ("gauche").

Acima da T_m , as cadeias carbônicas estão mais desordenadas, ocorrendo maior liberdade de movimento e, conseqüentemente uma modificação da fluidez ou microviscosidade da bicamada. Esta transição de fase tem sido observada através de diversos métodos como espectroscopia Raman, difração de raio-X, ressonância magnética nuclear, calorimetria diferencial de varredura, determinação da viscosidade, espalhamento de luz e medidas de índices de refração (Lee 1977a; 1977b; Kunitake e Okahata, 1980; New, 1990).

Em lipossomas compostos por misturas de fosfolípidios

também se observa mudança de fase com a temperatura. A T_m de misturas de fosfolípidos depende da fração molar de cada lípido na mistura assim como do tamanho da cadeia hidrofóbica, da presença de duplas ligações na cadeia, da estrutura e da carga da porção polar da molécula (Lee, 1977a; 1977b, Chapman, 1975; Nagle, 1980; Mc Elhaney, 1986; Blume, 1991).

Lipossomas preparados pela mistura de dois fosfolípidos exibem uma única transição quando a diferença na cadeia hidrocarbônica dos componentes não é maior que dois grupos CH_2 (Verkleij e Ververgaert, 1975).

Quando a diferença no comprimento das cadeias carbônicas é maior que os dois grupos CH_2 , ou quando uma espécie é completamente saturada e a outra contém cadeias hidrocarbônicas insaturadas, duas transições podem ser observadas durante o aquecimento por Calorimetria de Varredura Diferencial (Differential Scanning Calorimetry) (DSC). Isto sugere que durante o aquecimento do sistema ocorre uma migração no plano lateral do lípido. Na bicamada podem ocorrer regiões cristalinas correspondendo aos dois componentes. Esse processo é chamado de cristalização monotética ou separação de fase (Nagle, 1980; Gennis, 1989; Ladbrooke e Chapman, 1969; Phillips et al., 1970; Blume, 1991).

Os lípidos organizam-se espontaneamente em domínios separados com diferentes propriedades e essa segregação ("clustering") ou separação lateral de fase em bicamadas tem sido demonstrada diretamente em diversos estudos de mistura de lípidos (Gennis, 1989; Wu e McConnell, 1975; Shimshick e McConnell, 1973; Marsh e Watts, 1981).

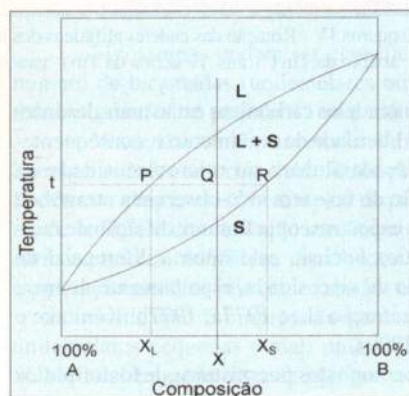
Separção de fase em misturas de fosfolípidos carregados e fosfolípidos neutros pode ser induzida por cátions divalentes, como o Ca^{+2} (Gennis, 1989; Jacobson e Papahadjopoulos, 1975; Chapman et al., 1977).

Fosfolípidos nem sempre se misturam idealmente (Gennis, 1989; Lee, 1978; Lee, 1983). Na fase gel dois lípidos podem não se empacotar de forma miscível podendo-se observar separação de fase. Da mesma forma, dois lípidos podem ser miscíveis na fase líquido cristalina mas a mistura pode ser não-ideal (Gennis, 1989, Dörfler et al., 1990). As interações não-ideais entre dois lípidos não são uma propriedade inerente do lípido, mas dependem da forma na qual os lípidos estão empacotados em cada fase (Von Dreele, 1978).

O comportamento não ideal pode ser caracterizado pelo diagrama de fase determinado experimentalmente. A partir desse diagrama pode-se calcular a fração de lípido que se encontra em cada estado (esquema V) utilizando para isso o diagrama calculado teoricamente para misturas ideais (Gennis, 1989; Lee, 1977b; Von Dreele, 1978).

3 - DIAGRAMA DE FASE

O esquema V apresenta um diagrama de fase típico de uma mistura ideal de dois lípidos, A e B, miscíveis em ambas as fases, gel (S) e líquido-cristalina (L).



Esquema V - Diagrama de fase para um sistema binário com completa miscibilidade das fases gel (S) e líquido-cristalina (L).

Numa determinada temperatura (t) a proporção de lípido nas fase gel e líquido-cristalina pode ser obtida do diagrama de fase. A mistura de composição X, na temperatura t , é composta de misturas de duas fases. Na transição de fase, na temperatura t essa mistura de composição X possui uma porcentagem de X_L de lípidos na fase líquido-cristalina e X_S na fase gel.

A proporção relativa de gel e líquido-cristalina presente numa temperatura t é dada por:

$$\frac{n_{\text{liquido}}}{n_{\text{liquido}} + n_{\text{solido}}} = \frac{R - Q}{R - P} \quad (1)$$

na qual n_{liquido} e n_{solido} são, respectivamente, o número total de moléculas nas fases líquida-cristalina e gel para uma mistura de composição X (esquema V).

A permeabilidade da bicamada de lipossomas formados por fosfolípidos ou misturas de fosfolípidos em água, em presença íons ou carboidratos, tem um aumento significativo a partir da temperatura de transição de fase (Crowe et al., 1985; 1986), podendo provocar a perda da água compartimentalizada dos lipossomas. A perda do conteúdo aquoso interno a partir da T_m é um problema crucial para algumas aplicações dos lipossomas, como o transporte de fármacos hidrofílicos.

4 - CONGELAMENTO

Processos que envolvem congelamento de lipossomas, tais como, a caracterização por microscopia eletrônica de criofratura e liofilização, podem provocar danos à bicamada lipídica, com extravazamento da fase aquosa interna.

A integridade física da estrutura dos lipossomas pode ser preservada durante o congelamento, desde que o processo seja efetuado na presença de crioprotetores adequados. Inúmeros trabalhos tem sido realizados para testar a efetividade de carboidratos, para impedir a fusão e a ruptura da bicamada do lipossoma durante o congelamento-descongelamento e liofilização-reidratação (Madden et al., 1985; Crowe e Crowe, 1984; Crowe et al., 1985; Crowe et al., 1986; Vemuri et al., 1991). É conhecido que a trealose, carboidrato presente em altas concentrações em organismos capazes de sobreviver à desidratação, proporciona excelente proteção aos lipossomas. A preservação da estrutura de membrana no estado anidro, por trealose, parece estar relacionada com sua habilidade em conservar as moléculas de água que normalmente fazem pontes de hidrogênio com a cabeça polar do lípido estrutural (Madden et al., 1985). Crowe e Crowe (1984) examinaram uma série de carboidratos quanto a sua efetividade em manter as propriedades estruturais e funcionais das membranas em baixa atividade de água. A trealose mostrou-se a mais efetiva quando comparada com sorbitol e inositol, que parecem ser fusogênicos. Madden et al. (1985) demonstraram que a sacarose, em altas concentrações, tem efetividade equivalente a da trealose.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T.M. *Removal of Detergent and Solvent Traces from Liposomes*. In (Gregoriadis, G., ed) *Liposome Technology*. Boca Raton: CRC Press, v.1, p.109-129, 1984.
- ANDERSSON, M., HAMMARSTRÖM, L., EDWARDS, K. Effects of bilayer phase transition on vesicles structure and its influence on the kinetics of viologen reduction. *J. Phys. Chem.* v. 99, p. 14531-14538, 1995.
- BANGHAM, A.D., HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* v. 8, p. 660-668, 1964.

- BLUME, A. Biological calorimetry: membranes. *Thermochim. Acta* v. 193, p. 299-349, 1991.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. *Chem. Soc. Rev.* p. 209-214, 1992.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* v. 733, p. 172-179, 1983.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., YOSHIDA, L.S., SESSO, A., CHAIMOVICH, H. Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. *J. Colloid Interf. Sci.* v. 100, p. 433-443, 1984.
- CHAPMAN, D. Phase transition and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.* v. 8, p. 185-235, 1975.
- CHAPMAN, D., PEEL, W.E., KINGSTON, B., LILLEY, T.H. Lipid phase transitions in model membranes: the effect of ions on phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* v. 464, p. 260-275, 1977.
- CORNELL, B.A., MIDDLEHURST, J., SEPAROVIC, F. The molecular packing and stability within highly curved phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* v. 598, p. 405-410, 1980.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M. Preservation of membranes in an hydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* v. 223, p. 701-703, 1984.
- CROWE, L.M., CROWE, J.H., RUDOLPH, A., WOMERSLEY, C., APPEL, L. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 242, p. 240-247, 1985.
- CROWE, L.M., WOMERSLEY, C., CROWE, J.H., REID, D., APPEL, L., and RUDOLPH, A. Preservation of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta* v. 861, p. 131-140, 1986.
- CUCCOVIA, I.M., CHAIMOVICH, H. in Liposomes in Catalysis in (Barenholz, Y. and Lasic, D.D., eds) *Handbook of Non Medical Applications of Liposomes*. Boca raton: CRC Press, v. 3, p. 239-256, 1996.
- CUCCOVIA, I.M., CHAIMOVICH, H., LISSI, E., ABUIN, E. Selectivity coefficients for iodide/bromide and iodide/chloride counterion exchanges at the surfaces of dioctadecyldimethylammonium vesicles. *Langmuir* v. 10, p. 1601-1604, 1990a.
- CUCCOVIA, I.M., FEITOSA, E., CHAIMOVICH, H., SEPULVEDA, L., REED, W.F., REED, W.F. Size, electrophoretic mobility and ion dissociation of vesicles prepared with synthetic amphiphiles. *J. Phys. Chem.* v. 94, p. 3722-3725, 1990b.
- CUCCOVIA, I.M., SESSO, A., ABUIN, E.B., OKINO, P.F., TAVARES, P.G., CAMPOS, J.F.S., FLORENZANO, F.H., CHAIMOVICH, H. Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection. *J. Mol. Liq.* v. 72, p. 323-336, 1997a.
- DÖRFLER, H-D., MIETHE, P., MÖPS, A. Phase diagrams of pseudo-binary phospholipid systems. III. Influence of the head group methylation on the miscibility behaviour of N-methylated phosphatidylethanolamine mixtures in aqueous dispersions. *Chem. Phys. Lipids* v. 54, p. 171-179, 1990.
- FENDLER, J.H. *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley Interscience: New York, 1982.
- GENNIS, R.B. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag: New York, 1989.
- HAMMASTRÖM, L., VELIKIAN, I., KARLSSON, G., EDWARDS, K. Cryo-TEM evidence: sonication of dihexadecylphosphate does not produce closed bilayers with smooth curvature. *Langmuir* v. 11, p. 408-410, 1995.
- HAUSER, H., OLDANI, D., PHILLIPS, M.C. Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles. *Biochemistry* v. 2, p. 4507-4517, 1973.
- HAYWARD, J.A., SMITH, W.P. Potential of liposomes in cosmetic science. *Cosmet. Toiletries* v. 105, 47-54, 1990.
- HUANG, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles: formation and physical characteristics. *Biochemistry* v. 8, p. 344-351, 1969.
- HUANG, C., MASON, J.T. Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 75, p. 308-310, 1978.
- ISRAELACHVILI, J. N., Intermolecular and surface forces, 2ed., Academic Press: San Diego, 1991.
- JACOBSON, K., PAPAHDJOPOULOS, D. Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH and concentration of bivalent cations. *Biochemistry* v. 14, p. 152-161, 1975.
- KUNITAKE, T., OKAHATA, Y. Formation of bilayer assemblies in dilute aqueous solution from ammonium amphiphiles with the diphenylazomethine segment. *J. Am. Chem. Soc.* v. 102, p. 549-553, 1980.
- LADBROOKE, B.D., CHAPMAN, D. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes: a review and summary of some recent studies. *Chem. Phys. Lipids* v. 3, 304-307, 1969.
- LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* v. 256, 1-11, 1988.
- LEE, A.G. Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta* v. 472, p. 237-281, 1977a.
- LEE, A.G. Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. *Biochim. Biophys. Acta* v. 472, p. 285-344, 1977b.
- LEE, A.G. Calculation of phase diagrams for non-ideal mixtures of lipids, and a possible non-random distribution of lipids in lipid mixtures in the liquid crystalline phase. *Biochim. Biophys. Acta* v. 507, p. 433-444, 1978.
- LEE, A.G. In: ALOI, R.C. *Lipid Phase Transitions and mixtures. Membrane Fluidity in Biology* v. 2, p.43-88, Academic Press: New York, 1983.
- MADDEN, T.D., BALLY, M.B., HOPE, M.J., CULLIS, P.R., SCHIEREN, H.P., JANOFF, A.S. Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: retention of vesicle contents. *Biochem. Biophys. Acta* v. 817, p. 67-74, 1985.
- MARSH, D., WATTS, A. ESR spin label studies of liposomes. In: KNIGHT, C.G., *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications*. Elsevier North-Holland: Cambridge, v. 7, p.139-188, 1981.
- McELHANEY, R.N. Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems. *Biochem. Biophys. Acta* v. 864, 361-421, 1986.
- NAGLE, J.F. Theory of the main lipid bilayer phase transition. *Ann. Rev. Phys. Chem.* v. 31, p. 157-195, 1980.
- NEW, R.R.C. *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford University Press: Oxford, 1990.
- PHILLIPS, M.C., LADBROOKE, B.D., CHAPMAN, D. Molecular interactions in mixed leathin system. *Biochim. Biophys. Acta* v. 196, 35-44, 1970.
- RINGSORF, H., SCHLARB, B., VENZMER, J., molecular architecture and function of polymeric oriented systems: models for the study of organization, surface recognition, and dynamics of biomembranes. *Angew. Chem. Int. Engl.* v. 27, 113-158, 1988.
- SHIMSHICK, E.J., MCCONNELL, H.M. Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry*, v. 12, p. 2351-2360, 1973.
- STURTEVANT, J.M. The effects of water-soluble solutes on the phase transition of phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, 1398-1400, 1984.
- TANFORD, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd Ed., John Wiley & Sons: New York, 1980.
- TYRRELL, D.A., HEATH, T.D., COLLEY, C.M., RYMAN, B.E. New aspects of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* v. 457, 259-302, 1976.
- VEMURI, S., YU, C-D., DeGROOT, J.S., WANGSATORNTHAKUN, V., VENKATARAM, S. Effect of sugars on freeze-thaw and lyophilization of liposomes. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* v. 17, p. 327-348, 1991.
- VERKLEIJ, A.J., VERVERGAERT, P.H.J. The architecture of biological and artificial membranes as visualized by freeze etching. In: *Biomembranes and Freeze Etching*. USP: São Paulo, p.101-122, 1975.
- VON DREELE, P.H. Estimation of lateral species separation from phase transitions in nonideal two dimensional lipid mixtures. *Biochemistry* v. 17, p. 3939-3943, 1978.
- WEINER, N., MARTIN, F., RIAZ, M. Liposomes as a drug delivery system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 15, p. 1523-1554, 1989.
- WU, S. H-W., MCCONNELL, H.M. Phase separations in phospholipid membranes. *Biochemistry* v. 14, p. 847-854, 1975.