

ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE ANFOTERICINA B EM MEMBRANAS DE LÁTEX

Camila Eugenia DOS REIS¹; Natan Roberto de BARROS²; Rondinelli Donizetti
HERCULANO³; Silvia Maria Batista de SOUZA¹

camilinha_eugenia@hotmail.com

natan501@hotmail.com

rond.donizetti@gmail.com

souzasmb@femanet.com.br

¹Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA.

²Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma matriz sólida utilizando látex natural (Natural Rubber Latex - NRL) extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* para futuras aplicações em liberação tópica sustentada de Anfotericina B (Anf. B). O látex natural é de fácil manipulação, apresenta baixo custo e possui alta resistência mecânica, além de ser um material biocompatível ele também estimula a angiogênese. A matriz polimérica desenvolvida neste trabalho foi capaz de liberar 45 % de todo o fármaco incorporado em um período de 48 horas (2 dias). Esta, ainda foi capaz de liberar mais 10 % de Anf. B no período que se estende entre 48 – 120 horas. As análises por espectroscopia de infravermelho mostraram interações entre o fármaco e a matriz por ligações de hidrogênio. Adicionalmente, foi observada a estabilidade da Anf. B em solução contendo substâncias naturalmente liberadas pelo látex natural, esta observação é de grande interesse, uma vez que a Anf. B é instável em soluções aquosas em temperaturas acima de 8° C. Os resultados obtidos neste trabalho concluem que o látex natural extraído da seringueira *H. brasiliensis* pode ser utilizado como matriz sólida em futuras investigações quanto a liberação tópica de Anf. B no tratamento de feridas cutâneas causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*.

PALAVRAS-CHAVE: látex natural; anfotericina B; liberação sustentada; matriz polimérica, leishmania.

ABSTRACT: The objective of this study was to develop a solid matrix using natural latex (Natural Rubber Latex - NRL) extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis* for future applications in sustained topical delivery of Amphotericin B (anf B.). Natural latex is easy to handle, is inexpensive and has high mechanical strength, besides being a biocompatible material it also stimulates angiogenesis. The polymeric matrix developed in this work was able to release 45% of all incorporated drug over a period of 48 hours (2 days). This was still able to release 10% more Anf. B during the period extending between 48-120 hours. Analysis by infrared spectroscopy showed interactions between the drug and the matrix by hydrogen bonding. Additionally, the stability was observed ANF. B solution containing substances

released by natural latex course, this observation is of great interest, since Amph. B is unstable in aqueous solutions above 8 ° C temperature The results of this study conclude that the natural latex extracted from the rubber tree *H. brasiliensis* can be used as solid matrix in future investigations as topical release Anf. B in the treatment of cutaneous wounds caused by flagellate protozoa of the genus *Leishmania*, the trypanosomes family.

KEYWORDS : natural latex ; amphotericin B; sustained release ; polymer matrix , leishmania .

0. Introdução

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, amplamente distribuída em todo o mundo. Segundo a organização mundial de saúde 90% dos casos de de leishmania visceral (a forma mais severa da doença) são registradas em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e no Brasil. No Brasil encontra-se disseminada disseminada nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste (RATH, et al, 2003).

Diversos fármacos derivados de quinolinas tem sido empregado na terapia para destruição de protozoários especialmente a malária. Os derivados quinolinicos também tem-se mostrado eficazes nos tratamentos das diversas formas de leishmanias. A Anf. B (antibiótico poliênico) é uma droga de escolha no tratamento de leishmanias, porém possui alta toxicidade, e muito instavel para se trabalhar (FILIPPIN, SOUZA, 2006).

A Anf. B é um fármaco de amplo espectro antifúngico que vem sendo alvo de inúmeros estudos, pois, a administração através das formulações convencionais apresentam desvantagens farmacológicas como: efeitos adversos, baixa disponibilidade oral havendo necessidade de administração via endovenosa, toxicidade celular, principalmente associada à nefrotoxicidade (DAS e SURESH, 2011).

A Anf. B consiste no antibiótico de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, mas sua elevada toxicidade associada principalmente a pacientes imunossuprimidos, limita sua utilização (MENEZES, et al., 2009). As inúmeras peculiaridades químicas da molécula de Anf. B estão relacionadas ao seu eficiente mecanismo de ação antifúngica e também a sua toxicidade sobre a membrana plasmática de células de mamíferos (VANDERMEULEN, et al., 2006; WASAN, et al., 2009; OLIVEIRA, 2008).

Apesar de sua eficácia, essas formulações apresentam problemas de toxicidade após semanas de tratamento, principalmente em casos de sistemas imunológicos debilitados (FILLIPPIN e SOUZA, 2006). Provavelmente a falta de homogeneidade molecular de Anf. B nos sistemas convencionais permitem a presença de oligômeros moleculares, apresentando portanto, maior toxicidade devido a interação com o colesterol (FRANZINI,

2006; JAIN e KUMAR, 2010). E ainda, a forte interação da Anf. B com os lipídios presentes nas formulações interferem na liberação do fármaco, o que resulta em diminuição da eficácia terapêutica (SZOKA e TANG, 1993; BOLARD; JOLY; YENI, 1993).

O látex de borracha natural é extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, uma árvore originária da bacia hidrográfica do Rio Amazonas. As partículas de borracha presentes no látex representam 30 - 45% do volume total e 90% do peso seco do látex. Elas consistem principalmente de partículas de poli(cis-1,4-isopreno) envolvidas e estabilizadas por uma fina camada de fosfolipídios e proteínas (Nawamawat, *et al*, 2011). Recentemente pesquisas vêm utilizando o látex natural em aplicações biomédicas. Neste tipo de aplicação, o método de fabricação do látex utilizado é o NRLb (Natural Rubber Latex Biomedical), que evita a utilização de produtos químicos como os carbamatos e o enxofre (Pinho, *et al*, 2014). O NRLb foi proposto porque o NRL (utilizado anteriormente) apresentava reações alérgicas e citotóxicas (ALLARCON, J. B; MALITO, M; LINDE, H. e BRITO, M. E. M, 2003).

Mrué, *et al*, (1996) utilizou a membrana de látex natural pela primeira vez como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. Neste estudo o látex funcionaria apenas como uma prótese. No entanto, os resultados mostraram que o látex teve propriedade indutora de regeneração tecidual, sendo totalmente eliminado nas fezes dos animais dez dias após o implante. E no lugar da prótese formou-se um “neo-esôfago”.

Em estudo “*in vivo*” da membrana cório-alantóide de embriões de galinha, a membrana de látex natural foi usada por Alves, (2003) para analisar o estímulo de atividade angiogênica causada por vários clones deste material. O autor observou a indução de angiogênese no tecido onde a membrana de látex ficou em contato durante o experimento. Herculano *et al*, (2009) demonstrou a utilização do látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* como matriz para um Sistema de Liberação Controlada, mostrando resultados promissores para futuras aplicações biomédicas para este material.

O objetivo desse trabalho é estudar a cinética de liberação da anfotericina B incorporadas em membranas de látex e observar possíveis mudanças em suas estabilidades que também interfere na sua toxicidade.

1. Materiais e Métodos

1.1 Obtenção do Látex natural

O NRL utilizado neste projeto de pesquisa foi adquirido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA, Guarantã - SP. Este látex é obtido da mistura de dois clones: RRIM 600 e PB 235 (Lote: 01703/13). Depois da extração, o látex foi mantido em fase líquida através da adição de hidróxido de amônio corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao pH igual a 10,20. Após adição do hidróxido de amônio, o material foi centrifugado a 8000g para retirar o excesso de proteínas contidas no látex natural.

Os resultados das análises realizadas no Lote nº 01703/13 estão listadas na Tabela 1:

Requisitos	Valores
Sólidos totais	61
Borracha Seca (DRC)	60
Diferença entre sólidos totais e borracha seca	1,00
NH ₃	0,71
pH	10,20
Viscosidade	30 seg
Estabilidade mecânica	515
VFA	0,0136
Cor	Normal
Odor	Normal

Tabela 1 – Parâmetros analisados no látex natural pela BDF – Comércio de Produtos Agrícolas LTDA.

1.2 Confeção das membranas

1.2.1 Materiais

- Látex Natural
- Liofilizador
- Nitrogenio líquido
- Ponteiros de 1ml
- Anfotericina B
- Agua deionizada

- Pipetador Automático
- Placas de vidro (22,33 mm Ø)

1.2.2 Procedimento

A confecção das membranas contendo Anfotericina B foi realizada com base no método desenvolvido por Miranda (2014), com pequenas modificações.

Misturas de 1 mL de látex natural e 2 mL da solução de Anfotericina B (5 mg.mL^{-1}) foram misturadas, homogeneizadas, e vertidas em placas de vidro (22,33 mm Ø). As placas contendo a mistura foram submetidas a uma lâmina de nitrogênio líquido durante 2 minutos. Após, foram colocadas no liofilizador em temperatura de -97°C e pressão de $56\mu\text{Hg}$ por 24 horas para a obtenção das membranas como apresentado na figuras 1, 2, 3 e 4.



Figura 1: Mistura da solução de Anf. B e o látex natural.

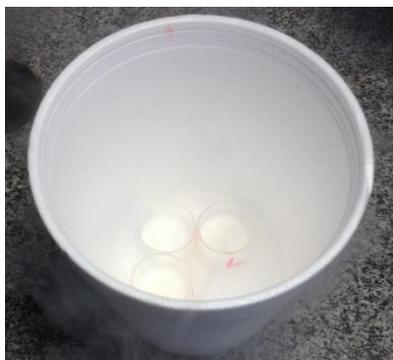


Figura 2: Placas contendo a mistura de látex e Anf. B em lâmina de nitrogênio.



Figura 3: Membranas sendo liofilizadas.



Figura 4: Membranas após liofilização.

1.3 Ensaio de liberação

1.3.1 Materiais

- Espectrofotometro de varredura
- Agua deionizada
- Béqueres
- Pipetador automatico
- Cubeta de quartzo
- Ponteira de 1ml
- Membranas de latex
- Membranas de latex com Anfotericina

1.3.2 Procedimento

Os ensaios de liberação foram realizados utilizando 100 mL de água deionizada em béqueres de vidro (Figura 5), mantidos em temperatura ambiente (25°C) e protegidos da luz. Em tempos pré determinados foram realizadas análises em espectrofotômetro (varredura: 200 – 500 nm) para a identificação da quantidade de fármaco liberada em solução.

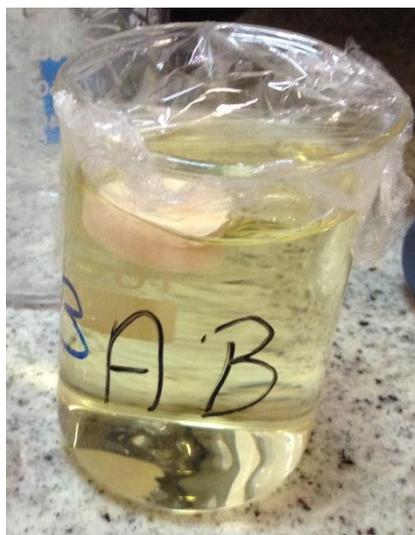


Figura 5: Ensaio de liberação.

1.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica foi utilizada por permitir a identificação de grupos funcionais (aminas, amidas, anéis aromáticos, álcoois, fenóis, entre outros), além de proporcionar o estudo de possíveis interações entre o látex natural e o fármaco utilizado. O equipamento opera mediante a técnica de transformada de Fourier. Os espectros serão registrados na região compreendida entre 4000 e 370 cm^{-1} , pelo método ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR - VERTEX 70 / BRUKER; fonte: Laser de HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS).

A espectroscopia de Reflexão Interna ou Refletância Total Atenuada (ATR) é uma técnica utilizada para se obter espectros no infravermelho de amostras como: pastas, adesivos e pós que não podem ser analisados pelos métodos convencionais, como pastilhas ou filmes.

2. Resultado e disculssões

2.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram utilizados para identificar grupos funcionais característicos do látex natural e da Anfotericina B.

A Figura 6 mostra o espectro de FTIR para as membranas de látex natural, onde podemos identificar absorções características para o poli(*cis*-1,4-isopreno): 2960 e 1375 cm^{-1} deformação CH_3 ; 2916 , 2852 e 1446 cm^{-1} deformação CH_2 ; 1661 cm^{-1} deformação $\text{C}=\text{C}$;

e 836 cm^{-1} CH fora do plano, sendo esta absorção a mais importante para a identificação do látex natural, pois caracteriza a função $R_2C=CHR$ (*cis*-1,4).

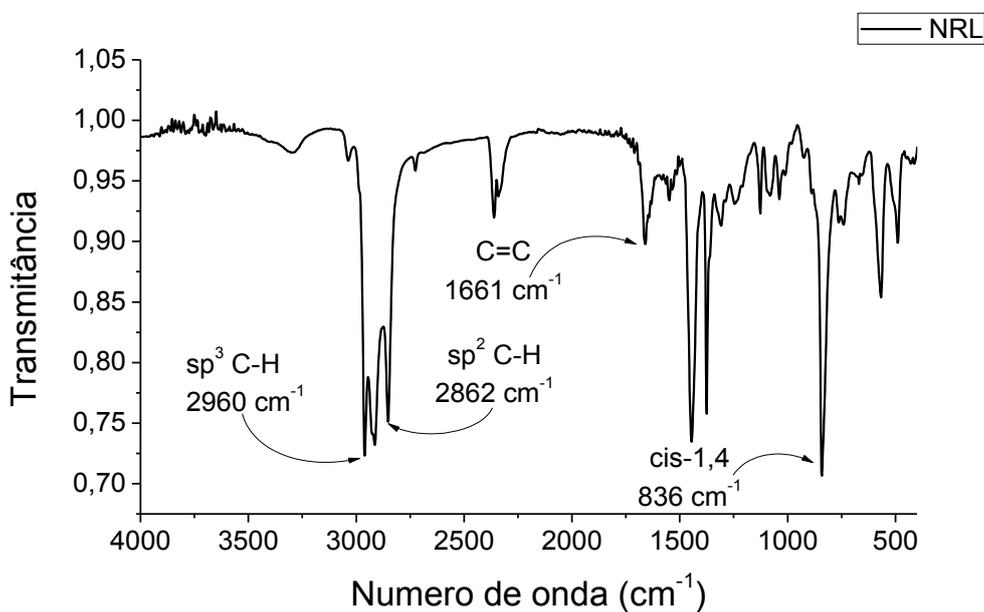


Figura 6: Espectro de FTIR da membrana de látex natural.

A Figura 7 mostra o espectro de FTIR para a Anf.B onde podemos identificar absorções características: 3350 cm^{-1} deformação OH; 1710 cm^{-1} deformação COOH, 1550 cm^{-1} deformação NH_2 ; 1068 cm^{-1} deformação CO e 1005 cm^{-1} deformação CH fora do plano característica de um polieno.

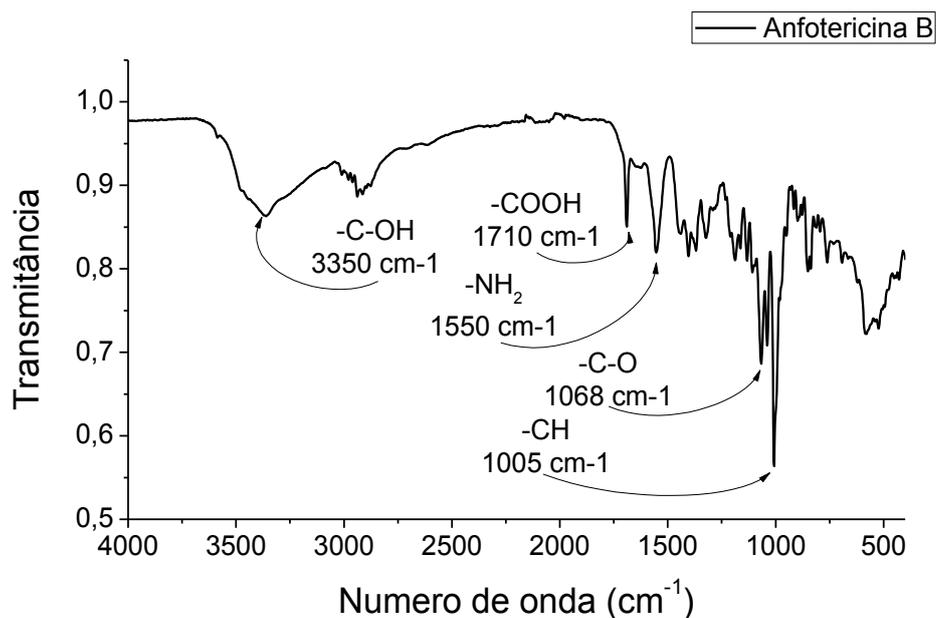


Figura 7: Espectro de FTIR da Anf.B.

A figura 8 mostra o espectro de FTIR para a membrana NRL com Anf.B, onde podemos observar absorções características tanto para o NRL quanto para a Anf.B. Adicionalmente foram observadas diferenças nas bandas de absorção: em 3350 cm^{-1} (deformação OH) onde o aumento da banda indica maior quantidade de interações do tipo ligação de hidrogênio; em 1550 cm^{-1} (deformação NH_2) onde a definição e o aumento da intensidade da banda indica a presença de maior concentração do grupo funcional NH_2 de aminas. Estas duas observações evidenciam a incorporação do fármaco na matriz polimérica, e que estes não interagem covalentemente.

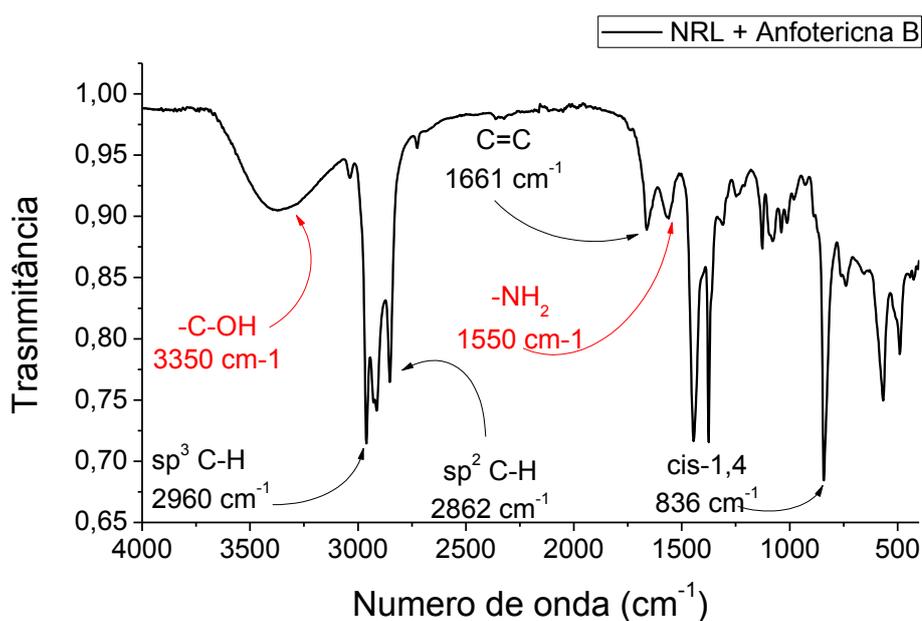


Figura 8 Espectro da membrana de látex impregnada de Anf. B

2.2 Identificação da concentração de fármaco em solução

Para a identificação da quantidade de fármaco liberada pelas membranas de látex natural durante os ensaios de liberação foi contruída uma curva de calibração. Esta curva foi obtida utilizando diferentes concentrações do fármaco, dissolvidos em solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As leituras das absorbâncias apresentadas pelas soluções de diferentes concentrações do fármaco foram realizadas no comprimento de onda de 330 nm (comprimento de onda de maior absorção para a Anfotericina B dissolvida em NaOH $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ – Figura 9). A curva obtida é apresentada na Figura 10.

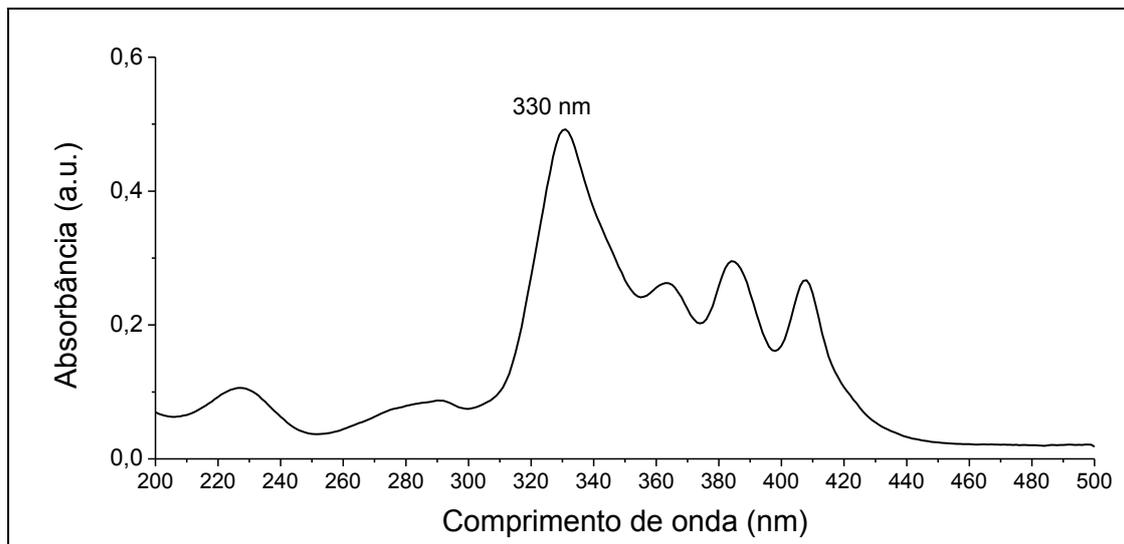


Figura 9: Espectro de absorvância da Anfotericina B.

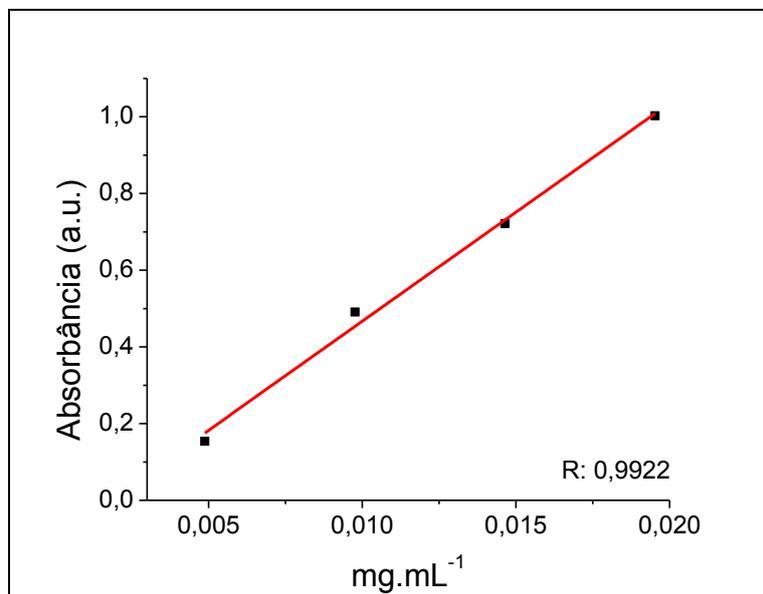


Figura 10: Curva de Calibração

2.3 Cinética de liberação

As membranas funcionalizadas com Anfotericina B foram capazes de liberar em um período de 120 horas (5 dias) até 55 % de todo o fármaco incorporado nas membranas.

A Figura 8 apresenta a cinética de liberação do fármaco pelas membranas de látex natural utilizando água deionizada como solvente.

A cinética de liberação para a Anfotericina B foi obtida utilizando a função bi-exponencial: $y(t) = y_0 + A_1e^{-t/\tau_1} + A_2e^{-t/\tau_2}$, onde $y(t)$ é a quantidade fármaco liberado pelas membranas em função do tempo t , y_0 é a quantidade inicial de fármaco nas membranas,

os valores para as constantes A_1 e A_2 são respectivamente -46,60437 e -6,08242, e os tempos característicos τ_1 e τ_2 são 26,69628 e 0,43631, respectivamente.

A cinética de liberação da Anfotericina B por membranas de látex natural confeccionadas em liofilizador utilizando as proporções de látex natural e solução de fármaco 1:2 apresenta duas etapas durante a cinética de liberação: (i) liberação inicial rápida (“burst release”) em um período de 3 horas, liberando 15% de todo o fármaco presente nas membranas, seguida de (ii) liberação mais lenta de 40 % do fármaco em 120 horas, como mostra a figura 11.

Durante a confecção das membranas funcionalizados com o fármaco uma parcela deste cristaliza na superfície das membranas sendo liberada nas primeiras horas de ensaio sendo responsável pelo “burst release” (a primeira etapa da cinética de liberação). A segunda etapa desta cinética (etapa lenta) depende da capacidade de difusão do meio aquoso entre os poros presentes nas membranas, o fluido permeia as membranas carregando o fármaco através de ligações de hidrogênio entre a água e o fármaco.

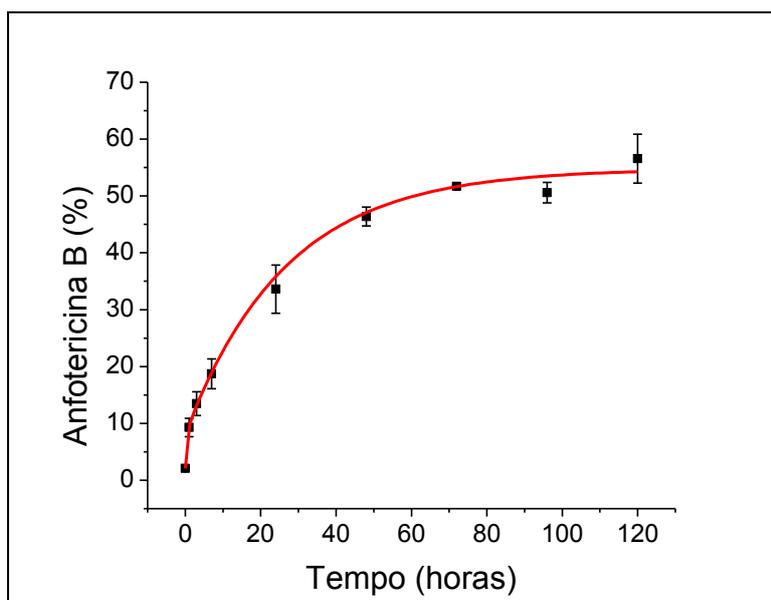


Figura 11: Cinética de liberação da Anfotericina B em membranas de látex.

2.4 Estabilidade

A Anf. B é caracterizada pela sua toxicidade quando da formação de dímeros e agregados, diminuindo a concentração de sua forma livre. Estes dímeros e agregados, quando formados, diminuem a absorção da amostra no comprimento de onda de 330 nm, e apresentam variações em outras regiões do espectro.

A estabilidade de Anf. B pode ser observada pela não diminuição do pico de absorção no comprimento de onda de 330 nm durante os ensaios de liberação do fármaco pelas membranas de látex natural (Figura 12), esta estabilidade pode ser observada com maior facilidade no período que se estende de 48 -120 horas.

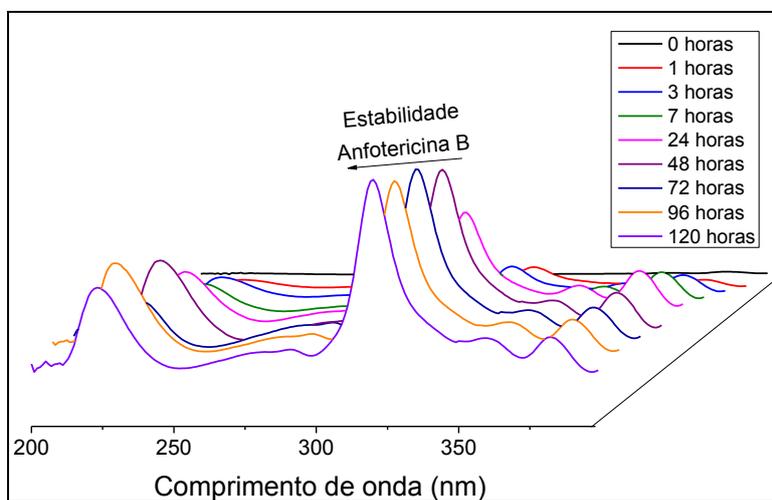


Figura 12 Estabilidade de Anf. B em solução liberada pelo látex natural.

3. Conclusão

Os espectros de FTIR para a membrana de látex natural e para a Anf. B permitiram a identificação de grupos funcionais característicos para estes, além disso a análise de FTIR para a membrana de látex natural impregnada com Anf. B não apresentou nenhuma banda de absorção adicional, provando a ausência de interação covalente entre o fármaco e a matriz polimérica. Estes resultados demonstram a capacidade de as membranas de látex natural funcionarem como matriz sólida na liberação sustentada de Anf. B.

Os ensaios de liberação *in vitro* da Anf. B sustentada por membranas de látex natural mostraram que a matriz polimérica é capaz de manter o fármaco estável após a incorporação e confecção das membranas, e posteriormente, proporcionar uma gradual liberação da substância quando carregada através de interações do tipo ligação de hidrogênio pela solução difundida no interior das membranas. A matriz mostrou-se eficaz na liberação sustentada de Anf. B por 48 horas (2 dias), liberando neste período aproximadamente 45% de todo o fármaco incorporado. A matriz ainda foi capaz de liberar mais 10 % de fármaco no período que se estende entre 48 – 120 horas.

As soluções concentradas de Anf. B (5 mg/ ml) em água, mantém sua potência durante 24 horas em temperatura ambiente e protegidas da luz, ou por uma semana em

refrigerador.(CRISTALIA 2015). No entanto, durante os ensaios realizados a Anf. B apresentou estabilidade em temperatura ambiente (25°C) quando em solução com a presença de substâncias liberadas pelo látex natural por todo o período que se estenderam os ensaios (120 horas), não apresentando nenhum indício de formação de dímeros e agregados durante os 5 dias analisados.

Com base nos resultados obtido durante a realização do projeto concluímos que o látex natural extraído da Seringueira *Hevea brasiliensis* pode ser utilizado como matriz sólida em futuras investigações quanto a liberação tópica de Anf. B no tratamento de feridas cutâneas causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*. Possíveis ensaios a serem realizados nesta temática são: tratamento de fibroblastos contaminados com o protozoário da *Leishmania*; tratamento de cães portadores de *Leishmania*; e futuramente, o estudo clínico em humanos, utilizando matrizes de látex natural como sistema de liberação sustentada de Anf. B.

Referências bibliográficas

- ALLARCON, J. B; MALITO, M; LINDE, H. e BRITO, M. E. M. “Alergia ao látex”. Revista Brasileira de Anestesiologia. v.53, n.1, p.89-93, 2003.
- BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. J. Liposome Res., v. 3, p. 409-427, 1993.
- ALVES MCO. “Teste da angiogênese estimulada por membranas de látex natural”. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, p. 70, 2003.
- CRISTALIA produtos químicos e farmacêuticos LTDA disponível em: <<http://www.2cristalia.com.br/takvip/arquivos/bulas/a05b842fdee4ade3a66a5465422a221a.pdf>> Acesso em Jul 2015.
- DAS, S.; SURESH, P. K. Nanosuspension: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface..Application to amphotericin B. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v.7, p. 242-247, 2011.
- FILIPPIN, F.B., SOUZA, L.C., Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 42, p. 162-194, 2006.
- FRADE MAC *et al.* Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana, v.32, n.4, p.157-162, 2004.

FRANZINI, C. M. Estudo de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

GUINEBRETIERE, S., BRIANÇON, S., LIETO, J., MAYER, C., FESSI, H. Study of the Emulsion-Diffusion of Solvent: Preparation and Characterization of Nanocapsules. Drug Development Research, vol. 57 p. 18 – 33, 2002.

HERCULANO, R. D.; SILVA, C. P.; ERENO, C.; GUIMARÃES, S. A. C.; KINOSHITA, A. e GRAEFF, C. F. O. “Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR)”. Materials Research, v.12, n.2, p.253-256, 2009.

JAIN, J. P., KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation., European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.40, p.456-465, 2010.

MENEZES, T.; ALVES, A.; VIEIRA, J.; MENEZES, S.; ALBES, B.; MENDONCA. L. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de Candida albicans. Revista de Odontologia da UNESP, v.3, p. 184191, 2009.

MIRANDA, M. C. R. Obtenção e estudos físico-químicos de biomembranas conjugadas de látex e peptídeos bioativos. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A. e TAMBELINI, H. “Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane”. Materials Research. v.7, n.2, p.277- 283, 2004

NAWAMAWAT, K.; SAKDAPIPANICH, J. T.; HO, C. C.; MA, Y.; SONG, J. e VANCSEA, J. G. “Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles”. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v.390, p.157–166, 2011

OLIVEIRA, R. B., LIMA, E.M. Polímeros na Obtenção de Sistemas de liberação de Fármacos. Revista Eletrônica de Farmácia, vol 3, no. 1, p. 29-35, 2006.

OLIVEIRA, T. R. Caracterização estrutural de agregados formados pelo antibiótico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma possível formulação farmacológica. 2008. Dissertação (Mestrado em Física Geral) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESÚS, M.N., MARZAL, P.C., Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte, Química Nova, 26(4), 550-555, 2003.

- PINHO, E. C. C. M.; SOUSA, S. J. F.; SCHAUD, F. e LACHAT, J. J. “Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival”. *Arquivos Brasileiros de Oftamologia*. v.67, n.1, p.27-32, 2004.
- SHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v.26, no. 5, 726-737, 2003.
- SZOKA, F.C.; TANG, M. Amphotericin B formulated in liposomes and lipid based systems: a review. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 363-375, 1993.
- VANCSA, J. G. “Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.390, p.157–166, 2011
- VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWSTER, M. B.; PRÉAT, V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethyleneglycol)-block-poly(ϵ -caprolactone-cotrimethylenecarbonate) polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.309, p.234–240, 2006.
- WASAN, E. K.; BARLETT, K.; GERSHKOVICH, P.; SIVAK, O.; BANNO, B.; WONG, Z.; GAGNON, J.; GATES, B.; LEON, C. G.; WASAN, K. M. Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. *Int. J. Pharm.*, v. 372, p. 76-84, 2009.