

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO COM  
FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE VERSÁTIL COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE E DO  
CÂNCER DE MAMA

CATIÚSCIA PADILHA DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico com funcionalização de superfície versátil com potencial aplicação para o tratamento da artrite reumatoide e do câncer de mama

Tese apresentada por **Catiúscia Padilha de Oliveira** para a obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Raffin Pohlmann

PORTO ALEGRE, 2014



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia de Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19/09/2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Oliveira Battastini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane de Bona da Silva

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Oliveira, Catiúscia Padilha de  
DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO  
LIPÍDICO COM FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE VERSÁTIL  
COM POTENCIAL APLICAÇÃO PARA O TRATAMENTO DA ARTRITE  
REUMATOIDE E DO CÂNCER DE MAMA / Catiúscia Padilha  
de Oliveira. -- 2014.  
224 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2014.

1. nanotecnologia. 2. nanocápsulas poliméricas.  
3. artrite reumatoide. 4. câncer de mama. I.  
Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Título.



## APRESENTAÇÃO

Esta tese está dividida em seis capítulos, visando uma melhor organização e apresentação dos resultados obtidos, dividindo-se da seguinte maneira:

- Introdução;
- Objetivos;
- Capítulo 1: Revisão do tema.
- Capítulo 2: Artigo publicado na revista International Journal of Nanomedicine que aborda a redução das citocinas em células mononucleares derivadas de pacientes com artrite reumatoide e a redução na inflamação em modelo de inflamação com doses menores de metotrexato encapsulado do que o fármaco em solução.
- Capítulo 3: Artigo a ser enviado a periódico científico referente à avaliação da diminuição da concentração de bromelina necessária para obter atividade antiproliferativa quando funcionalizada em nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede.
- Capítulo 4: Artigo a ser enviado a periódico científico que verifica a influência de cargas, negativas e positivas, no mecanismo de distribuição dos fármacos em nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede.
- Capítulo 5: Artigo a ser enviado a periódico científico, que aborda a captação e a atividade antiproliferativa *in vitro* de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede contendo metotrexato na forma ácida e éster utilizando células sadias e tumorais.
- Capítulo 6: Artigo a ser enviado a periódico científico, que aborda estudo físico-químico de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas com infliximab ou etanercept e contendo éster de metotrexato.
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências bibliográficas.





## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>Capítulo 1:</b> Revisão do tema .....	29
<b>Capítulo 2:</b> Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo metotrexato são altamente eficazes no controle da inflamação em células sinoviais e em modelo de artrite crônica .....	47
<b>Capítulo 3:</b> MLNC funcionalizadas com bromelina versus solução de bromelina – diminuição em 160 vezes na concentração necessária para a mesma ação antiproliferativa frente à linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7 .....	73
<b>Capítulo 4:</b> Aplicação do algoritmo para nanocápsulas de núcleo lipídico aniônicas e catiônicas .....	115
<b>Capítulo 5:</b> MLNC funcionalizadas com MTX ou MTX(OEt) <sub>2</sub> : maior especificidade para células de câncer de mama e aumento na atividade antiproliferativa - estudo <i>in vitro</i> .....	133
<b>Capítulo 6:</b> Nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas com Infliximab e Etanercept e contendo MTX(OEt) <sub>2</sub> encapsulado.....	169
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	187
<b>CONCLUSÕES</b> .....	195



Esta sessão no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 11 e 13 traz a lista de figuras dessa tese e foi excluída por conter itens relacionaods aos artigos publicados ou em fase de submissão aos periódicos científicos.





Esta sessão no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 14 e 15 traz a lista de tabelas dessa tese e foi excluída por conter itens relacionaods aos artigos publicados ou em fase de submissão aos periódicos científicos.

## RESUMO

A área das Ciências Farmacêuticas busca constantemente por tratamentos mais eficientes, direcionados para alvos específicos, com diminuição da dose necessária e com a minimização dos efeitos adversos. Neste contexto, a área de Nanotecnologia Farmacêutica apresenta grande potencial de aplicabilidade, com resultados bastante promissores para o tratamento de diversas doenças. Os sistemas nanoestruturados têm sido avaliados para a incorporação de fármacos já utilizados em tratamentos administrados formas farmacêuticas convencionais que apresentam problemas farmacocinéticos ou farmacodinâmicos quando administrados. E, também, para a incorporação de novas moléculas com potencial para o tratamento de determinada doença. Neste trabalho de tese, nanocápsulas de núcleo lipídico versáteis contendo metotrexato na forma ácida e éster, bromelina, etanercept e infliximab foram desenvolvidas buscando contornar as limitações e aumentar a eficácia terapêutica desses fármacos. Inicialmente, as propriedades anti-inflamatórias de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas por micelas de polissorbato 80 contendo metotrexato encapsulado foram avaliadas em experimentos *in vitro* e *in vivo*, em células mononucleares obtidas a partir do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide e em ratos Lewis com artrite induzida por adjuvante completo de Freund, respectivamente. As nanocápsulas de núcleo lipídico demonstraram serem altamente eficazes no controle da inflamação, sendo que os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* foram alcançados em doses 75% menores que o metotrexato em solução. Na sequência, o tratamento *in vitro* da linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7, com nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas com bromelina demonstrou uma redução de 160 vezes na concentração necessária para obter o mesmo efeito quando comparada a uma solução de bromelina. A influência das pseudofases aniônicas e catiônicas no mecanismo de distribuição da indometacina, tacrolimus, aciclovir, metotrexato e éster etílico de metotrexato, foram avaliadas aplicando um algoritmo desenvolvido para nanocápsulas de núcleo lipídico. Verificou-se que somente a indometacina sofreu influência da presença de cargas, aumentando a afinidade pela fase dispersa das formulações. Formulações de nanocápsulas de núcleo

lipídico multiparede contendo metotrexato na forma ácida e éster encapsulados e/ou funcionalizando a superfície das nanocápsulas foram desenvolvidas e testadas *in vitro* em linhagens de células tumorais (MCF-7) e em linhagens de células sadias (HaCaT). Essas formulações demonstraram atividade antiproliferativa maior para as MCF-7 (com redução em mais de 50% na viabilidade celular) em comparação com as soluções de metotrexato e éster etílico de metotrexato e esta atividade foi maior para as formulações em que as moléculas foram funcionalizadas na superfície das nanopartículas. A captação das nanopartículas pelas células também foi maior para as formulações funcionalizadas com metotrexato ou éster etílico de metotrexato em comparação com a formulação em que o éster de metotrexato está encapsulado. As três formulações contendo metotrexato na forma ácida ou éster não demonstraram ação antiproliferativa em linhagens de células sadias (HaCaT). Devido à baixa expressão de receptores de folato nessas células, não houve aumento da captação celular em comparação à formulação sem fármaco. Por último, foram desenvolvidas satisfatoriamente formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas com os anticorpos monoclonais infliximab e etanercept, e contendo éster etílico de metotrexato encapsulado, demonstrando que são adequadas para futuros estudos visando o tratamento da artrite reumatoide. Esse conjunto de resultados demonstra que as nanocápsulas de núcleo lipídico com funcionalização de superfície versátil, sejam revestidas com polissorbato 80 ou multiparede funcionalizadas são um sistema bastante promissor para a administração de fármacos de modo a aumentar sua especificidade e eficácia.

**Palavras-chave:** nanocápsulas de núcleo lipídico, nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede, metotrexato, bromelina, etanercept, infliximab, câncer de mama, artrite.



## ABSTRACT

### **Development of lipid-core nanocapsules with versatile surface with potential application for the treatment of rheumatoid arthritis and breast cancer**

The Pharmaceutical Sciences field is constantly searching for more effective treatments, aiming specific targets, with dose reduction and minimization of side effects. In this context, the Pharmaceutical Nanotechnology field presents great applicability potential, with highly promising results for the treatment of several diseases. Nanostructured systems have been evaluated for the encapsulation of drugs approved for use in conventional pharmaceutical dosage forms that, however, exhibit pharmacokinetic or pharmacodynamics problems when administered, and for the encapsulation of novel molecules with potential to treat a determined disease. In the present thesis, versatile lipid-core nanocapsules containing methotrexate in the acid and ester forms, bromelain, etanercept and infliximab were developed, seeking to circumvent the limitations and increase the therapeutic efficacy of these drugs. Initially, the anti-inflammatory properties of methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules coated with polysorbate 80 micelles were evaluated in *in vitro* and *in vivo* experiments, using mononuclear cells obtained from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients and Lewis rats with Freund complete adjuvant-induced arthritis. Lipid-core nanocapsules demonstrated to be highly effective in the control of inflammation, and the *in vivo* anti-inflammatory effects were reached in a dose 75% lower than the methotrexate in solution. In the sequence, the *in vitro* treatment of a human breast cancer cell line, MCF-7, with bromelina-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules demonstrated a 160-fold reduction of the concentration required to obtain the same effect when compared with a bromelain solution. The influence of the anionic and cationic pseudo-phases in the distribution mechanism of indomethacin, tacrolimus, acyclovir, methotrexate and methotrexate ethyl ester was evaluated through an algorithm developed for lipid-core nanocapsules. It was verified that only indomethacin underwent influence in the presence of charge, increasing the affinity by the disperse phase of the formulations. Multiple-wall lipid-core nanocapsules formulations containing methotrexate in the acid and ester forms encapsulated and/or functionalizing the surface of the nanoparticles were developed

and tested *in vitro* in tumour MCF-7 cells and in a healthy cell line (HaCaT). These formulations demonstrated higher anti-proliferative activity for the MCF-7 cells (reduction of over 50 % in cellular viability) in comparison with the methotrexate and methotrexate ethyl ester solutions and this activity was higher for the formulations in which the molecules were functionalized in the surface of the nanoparticles. A higher cellular uptake was observed for the formulations functionalized with methotrexate or methotrexate ethyl ester in comparison with the formulations in which the methotrexate ester is encapsulated. The three formulations containing methotrexate in the acid or ester form did not demonstrate anti-proliferative activity in non-tumour cell lines (HaCaT). Since these cells have a small expression of folate receptors, the uptake was not increased in comparison with the formulation without drug. Lastly, formulations of methotrexate ethyl ester-loaded multiwall lipid core nanocapsules functionalized with monoclonal antibodies infliximab and etanercept were successfully developed demonstrating suitability for future studies aiming the treatment of rheumatoid arthritis. These groups of results demonstrate that versatile lipid core nanocapsules, either coated with polysorbate 80 or multiwalled functionalized are a very promising system for the administration of drugs aiming their specificity and efficacy.

**Keywords:** lipid-core nanocapsules, multiwall lipid-core nanocapsules, methotrexate, bromelain, etanercept, infliximab, breast cancer, arthritis.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---



Um dos grandes obstáculos na área farmacêutica são os efeitos adversos causados pela administração de agentes terapêuticos, devido a distribuição dos fármacos pelo organismo de forma inespecífica. Para contornar esse obstáculo, a Nanotecnologia Farmacêutica vem sendo estudada e aprimorada, apresentando grande potencial de aplicabilidade para o tratamento de diversas doenças. A utilização de sistemas nanocarreadores para a administração de fármacos auxilia no controle da liberação e pode direcionar o fármaco para o sítio de ação (Pan *et al.*, 2002; Couvreur *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2008, Fontana *et al.*, 2010; Torrecilla, *et al.*, 2013) e na diminuição dos efeitos adversos (Benvegnú *et al.*, 2012; Dimer *et al.*, 2014).

Entre os diversos sistemas nanocarreadores de fármacos apresentados na literatura, destacamos as nanocápsulas poliméricas (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Entre essas, um promissor sistema são as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC, do inglês lipid core nanocapsules) as quais são compostas por um núcleo organo-gel formado por um lipídeo líquido e um lipídeo sólido, revestido por um polímero aprovado pela FDA, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Cruz *et al.*, 2006; Jäger *et al.*, 2007; Jäger *et al.*, 2009; Venturini *et al.*, 2011; Poletto *et al.*, 2014). A estabilização deste nanossistema em solução é decorrente da presença de micelas de polissorbato 80 (Fiel *et al.*, 2013). Diversos estudos presentes na literatura demonstram que as LNC fazem a proteção de fármacos da degradação química (Kulkamp *et al.*, 2009) e fotoquímica (Fontana *et al.*, 2010; Ourique *et al.*, 2011). Esse sistema também demonstrou auxiliar na transposição de barreiras biológicas pelo fármaco e melhoria no índice terapêutico devido à possibilidade de captação celular (Guterres *et al.*, 2007; Tedesco *et al.*, 2007; Bernardi *et al.*, 2009a; Guterres *et al.*, 2010; Frozza *et al.*, 2010; Poletto *et al.*, 2012).

Com o intuito de encapsular substâncias ativas hidrofílicas, o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores que possibilitem a conjugação com este tipo de molécula torna-se um avanço necessário para a melhoria dos sistemas terapêuticos. Uma estratégia que pode ser utilizada é a inserção dessas moléculas em nanocápsulas de núcleo lipídico após sua formação utilizando uma funcionalização de superfície. Essa funcionalização pode ser obtida pela adição de tensoativos, polímeros ou outros componentes que permitam a adsorção de substâncias, como o sistema desenvolvido

por Bender e colaboradores (2014) em que foi realizada a funcionalização das nanocápsulas com o anticorpo scFv anti-LDL(-) devido a presença de zinco na superfície das mesmas.

O desenvolvimento de nanocarreadores poliméricos do tipo vesicular, como as nanocápsulas de núcleo lipídico, torna-se vantajoso para a funcionalização de superfície pela adição de um ligante, possibilitando a ligação de diferentes substâncias como, por exemplo, proteínas. Devido à presença de um núcleo lipídico capaz de interagir com moléculas hidrofóbicas é possível obter a encapsulação concomitante de moléculas que apresentem diferentes características químicas. Dessa forma, a associação de fármacos pode contribuir para um melhor efeito no tratamento, como já demonstrado para nanocápsulas de núcleo lipídico coencapsuladas com indometacina e seu éster etílico (Bernardi *et al.*, 2008). Outros estudos na literatura também comprovam a eficácia da coencapsulação em nanopartículas (Wang *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2009).

A artrite reumatoide e o câncer de mama têm uma ocorrência bastante significativa na população mundial (Tobon *et al.*, 2010; IARC, 2013; IARC, 2014). Entretanto, o tratamento conduz ao desencadeamento de diversos efeitos adversos que afetam a qualidade de vida do paciente, podendo levar, inclusive ao abandono do mesmo (Fossati *et al.*, 1998; Dervieux *et al.*, 2004; Varatharajan *et al.*, 2009; Conde *et al.*, 2006). Assim, a obtenção de sistemas nanocarreadores que auxiliem na diminuição da dose e aumentem a especificidade dos fármacos para o local afetado, contribuindo, assim, para a possibilidade de diminuição dos efeitos adversos é essencial para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes. Diversos fármacos são utilizados no tratamento dessas duas doenças, entre eles, o metotrexato, que atua como antagonista do ácido fólico, ligando-se aos receptores de folato presente nas células (Zeng *et al.*, 2001; Schroder e Stein, 2003; Vezmar *et al.*, 2003). Em situações de crescimento celular desordenado, as células necessitam de maior quantidade de folato para desencadear o processo de síntese de DNA e RNA, apresentando, assim, maior expressão de receptores de folato (Miquel *et al.*, 1980).

O uso de substâncias naturais, obtidas de alimentos, como a bromelina, tem demonstrado inúmeros benefícios (Gupta *et al.*, 2010). A bromelina é estudada desde a

década de 70 para o tratamento de tumores (Gerard, 1972; Nieper, 1976), sendo uma macromolécula com potencial para ser funcionalizada em nanocarreadores e utilizada para o tratamento do câncer de mama. O uso de fármacos biológicos para o tratamento de inflamações crônicas severas tem sido bastante estudado (Moreland *et al.*, 1999; Kekow *et al.*, 2012; Fabi *et al.*, 2014; Königsberg *et al.*, 2014). Entre estes, o infliximab e o etanercept são duas possibilidades, geralmente são utilizados em conjunto com o tratamento com metotrexato (Moreland *et al.*, 1999; Weinblatt *et al.*, 1999), entretanto causam diversos efeitos adversos por afetarem o sistema imune, que pela adição em nanocápsulas de núcleo lipídico versáteis podem, potencialmente serem minimizados.

Desse modo, este trabalho de tese propõe a obtenção de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico com funcionalização de superfície versátil formada por diferentes domínios que permite a associação de diversas moléculas, visando o aumento na eficácia pela diminuição da dose em comparação ao fármaco em solução. Ainda, obter o aumento *in vitro* da atividade antiproliferativa e da captação das nanopartículas pelas células pela funcionalização de superfície, avaliadas em linhagem de carcinoma de mama humano, e avaliar a seletividade *in vitro* das formulações em linhagens diferente expressão de receptores de folato. Os fármacos escolhidos para este trabalho, metotrexato, bromelina, infliximab e etanercept, foram selecionados devido as suas potencialidades para o tratamento da artrite reumatoide e/ou do câncer de mama.





**OBJETIVOS**

---



## Objetivo geral

O propósito deste trabalho consiste no desenvolvimento de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico com funcionalização de superfície versátil, contendo metotrexato na forma ácida e éster, bromelina, infliximab e etanercept, investigando a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* e a atividade antiproliferativa *in vitro* do metotrexato em modelo de inflamação crônica. Ainda, a atividade antiproliferativa *in vitro* do metotrexato em linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7 e em linhagem de células saudáveis, HaCaT, bem como a atividade antiproliferativa *in vitro* da bromelina em linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7.

## Objetivos específicos

- Avaliar o efeito das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo metotrexato em reduzir as citocinas derivadas de células mononucleares obtidas de pacientes com artrite reumatoide e a capacidade de reduzir a inflamação em modelo de artrite em doses menores que o fármaco em solução.
- Avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* da bromelina em nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede em linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7.
- Avaliar a influência de cargas, negativas e positivas, no mecanismo de distribuição dos fármacos em nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede.
- Avaliar a captação das nanopartículas e a atividade antiproliferativa *in vitro* em linhagem de células saudáveis, HaCaT, e em linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7, de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede contendo metotrexato na forma ácida ou esterificado.
- Obter nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas com infliximab ou com etanercept contendo éster de metotrexato encapsulado visando potencial aplicação no tratamento da artrite reumatoide.







Este capítulo que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 31 e 46 trata da revisão bibliográfica dos temas abordados na tese, sendo eles: o câncer de mama, a artrite reumatoide, os fármacos e como a área de nanotecnologia pode auxiliar nessas doenças.





## **CAPÍTULO 2**

---

**Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo metotrexato são altamente eficazes no controle da inflamação em células sinoviais e em modelo de artrite crônica**



Este capítulo que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 49 e 72 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo.

Boechat, A. L.; Oliveira, C. P.; Tarragô, A.; Guimarães, A.; Malheiro, A.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.: Methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules highly effective to control inflammation *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 10 6603-6614, 2015. doi: 10.2147/IJN.S85369.



### **CAPÍTULO 3**

---

**MLNC funcionalizadas com bromelina versus solução de bromelina – diminuição em 160 vezes na concentração necessária para a mesma ação antiproliferativa frente à linhagem de células de carcinoma de mama humano, MCF-7**



Este capítulo que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 75 e 114 é constituído por artigo científico a ser submetido a periódico científico. Consta do desenvolvimento e e caracterização de um nanocarreador funcionalizado com bromelina, bem como da avaliação de seu efeito antiproliferativo em linhagem de carcinoma de mama humano.





## **CAPÍTULO 4**

---

**Aplicação do algoritmo para nanocápsulas de núcleo lipídico aniônicas e catiônicas**



Este capítulo que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 117 e 132 é constituído por artigo científico a ser submetido a periódico científico. Consta do estudo da influência de cargas negativas e positivas na encapsulação de fármacos em nanocápsulas de núcleo lipídico.



## CAPÍTULO 5

---

**MLNC funcionalizadas com MTX ou MTX(OEt)<sub>2</sub>: maior especificidade para células de câncer de mama e aumento na atividade antiproliferativa - estudo *in vitro***



Este capítulo que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 135 e 168 é constituído por artigo científico a ser submetido a periódico científico. Consta da avaliação da captação das nanopartículas pelas células de adenocarcinoma de mama, bem como, da atividade antiproliferativa das formulações sobre estas.





## CAPÍTULO 6

---

**Nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas com Infliximab e Etanercept e contendo MTX(OEt)<sub>2</sub> encapsulado**



Este capítulo que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 171 e 186 é constituído por artigo científico a ser submetido a periódico científico. Consta do desenvolvimento de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparedes contendo dois fármacos, um encapsulado e um funcionalizando a superfície visando o tratamento da artrite reumatoide.



**DISCUSSÃO GERAL**

---



Esta sessão que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 189 e 194 trata da discussão dos resultados obtidos em todos os capítulos dessa tese. Essa sessão foi suprimida por estar relacionada ao artigo já publicado, bem como as publicações a serem enviadas aos periódicos científicos.





**CONCLUSÕES**

---



Esta sessão que no texto integral da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 197 que trata da conclusão dos resultados obtidos em todos os capítulos dessa tese. Essa sessão foi suprimida por estar relacionada ao artigo já publicado, bem como as publicações a serem enviadas aos periódicos científicos.



## **REFERÊNCIAS**

---



Ackerstaff, E.; Gimi, B.; Artemov D.; Bhujwala, Z. M. Anti-Inflammatory Agent Indomethacin Reduces Invasion and Alters Metabolism in a Human Breast Cancer Cell Line. **Neoplasia**. V. 9. P. 222-235, 2007.

Abad, J. M.; Mertens, S. F. L.; Pita, M.; Fernandez, V. M.; Schiffrin, D.J. Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. **Journal of the American Chemical Society**. V. 127. P. 5689-5694, 2005.

Adisheshaiah, P.P.; Hall, J. B.; McNeil, S. E.; Nanomaterials standards for efficacy and toxicity assessment. **Wiley interdisciplinary reviews: nanomedicine and nanobiotechnology**. V. 2. P. 99-112, 2010.

Amini, A.; Ehteda, A.; Moghaddam, S. M.; Akhter, J.; Pillai, K.; Morris, A. L. Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines. **Oncotargets and Therapy**. V. 6. P. 403-409, 2013.

Avouac, J.; Gossec, L.; Doodads, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. **Annals of the Rheumatic Diseases**. V. 7. P. 845–51, 2006.

Bader, R. A. The development of targeted drug delivery systems for rheumatoid arthritis treatment. **Syracuse Biomaterials Institute**. P. 111-132, 2012.

Banerjee, D.; Mayer-Kuckuk, P.; Capiiaux, G.; Budak-Alpdogan T.; Gorlick, R.; Bertino, J. R. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1587. P. 164-173, 2002.

Barratt, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. V. 3. P. 163-171, 2000.

Barrat, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**. V. 60, P. 21-37, 2003.

Barros, F. C. F.; Cavalcante, R. M.; Carvalho, T. V.; Dias, F. S.; Queiroz, D. C.; Vasconcellos, L. C. G.; Nascimento, R. F. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero**. V. 7. P. 232-246, 2006.

Baselga, J.; Campone, M.; Piccart, M.; Burris III, H. A.; Rugo, H. S.; Sahmoud, T.; Noguchi, S.; Gnant, M.; Pritchard, K. I.; Lebrun, F.; Beck, J. T.; Ito, Y.; Yardley, D.; Deleu, I.; Perez, A.; Bachelot, T.; Vittori, L.; Xu, Z.; Mukhopadhyay, P.; Lebwohl, D.; Hortobagyi, G. N. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor – Positive Advanced Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**. v, 366, p. 520-529, 2012.

Batkin, S.; Taussig, S. J.; Szekerezes, J. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. V. 114. P. 507-508, 1988.

Bender, E. A.; Adorne, M. D.; Colomé, L. M.; Abdalla, D. S P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**. 2012.

Bender, E. A.; Cavalcante, M. F.; Adorne, M. D.; Colomé, L. M.; Guterres, S. S.; Abdalla, D. S. P.; Pohlmann, A. R. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical Research**. 2014.

Benvegnú, D. M.; Barcelos, R. C. S.; Boufleur, N.; Pase, C. S.; Reckziegel, P.; Flores, F. C.; Ourique, A. F.; Nora, M. D.; Silva, C. Bo.; Beck, R. C. R.; Bürger, M E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. **Neurochemistry International**. V. 61. P. 623-631, 2012.

Bernardi, A.; Frozza, R. L.; Jager, E.; Figueiro, F.; Bavaresco, L.; Salbego, C.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M. O. .. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. **European Journal of Pharmacology**. V. 586. P. 24-34, 2008.

Bernardi, A.; Braganhol, E.; Jäger, E.; Figueiro, F.; Edelweiss, M. I.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, p. 53-63, 2009a.

Bernardi, A.; Zilberstein, A. C.; Jager, E.; Campos, M. M.; Morrone, F. B.; Calixto, J. B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M. O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**. V. 158. P. 1104-1111, 2009b.

Bernardi, A.; Frozza, R.L.; Meneghetti, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A $\beta$ 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**. V.7. P.4927-4942, 2012.

Beuth, J.; Bernhard, O.; Abolghassem, P.; Rethfeldt, E.; Bock, P. R.; Hanisch, J.; Schneider, B. Impact of complementary oral enzyme application on the postoperative treatment results of breast cancer patients – results of an epidemiological multicentre retrospective cohort study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. V. 47. P. S45-S54, 2001.



Bharali, D.J.; Mousa, S. A. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current prospective and future promise. **Pharmacology and therapeutics**. V. 128. P. 324-335, 2010.

Bhatnagar, P.; Gupta, K. C. Oral administration of Eudragit coated bromelain encapsulated PLGA nanoparticles for effective delivery of bromelain for chemotherapy *in vivo*. **29<sup>th</sup> Southern Biomedical Engineering Conference**. 2013.

Bhattacharya, R.; Patra, C. R.; Earl, A.; Wang, S.; Katarya, A.; Lu, L.; Kizhakkedathu, J. N.; Yaszemski, M. J.; Greipp, P. R.; Mukhopadhyay, D.; Mukherjee, P. Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. V. 3. P. 224-238, 2011.

Bhui, K.; Prasad, S.; George, J.; Shukla, Y. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-Kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. **Cancer Letters**. V. 282. P. 167-176, 2009.

Bhui, K.; Tyagi, S.; Prakash, B.; Shukla, Y. Pineapple bromelain induces autophagy, facilitating apoptotic response in mammary carcinoma cells. **Biofactors**. V. 36. P. 474-482, 2010.

Bhui, K.; Tyagi, S.; Srivastava, A. M.; Singh, M.; Roy, P.; Singh, R.; Shukla, Y. Bromelain inhibits nuclear factor Kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G<sub>2</sub>/M arrest to apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**. V. 51. P. 231-243, 2012.

Boechat, N. O.; Ogusku, M. M.; Boechat, A. L.; Sadahiro, A. Interaction between Smoking and HLA-DRB1\*04 Gene Is Associated with a High Cardiovascular Risk in Brazilian Amazon Patients with Rheumatoid Arthritis. **PLoS One**. V. 7. P. e41588, 2012.

Boing, A. F.; Vargas, S. A. L.; Crispim-Boing, A. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**. V. 53. P. 317-322, 2007.

Borchers, A. T.; Keen, C. L.; Cheema, G. S.; Gershwin, M. E. The use of methotrexate in Rheumatoid arthritis. **Seminars in arthritis and Rheumatism**. V. 34. P. 465-483, 2004.

Brennan, F. M.; Browne, K. A.; Green, P. A. Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  (cA2) Therapy. **British Journal of Rheumatology**. V. 36. P. 643-650, 1997.

Bulcão, R.; Freitas, F. A.; Dallegrave, E.; Venturini, C. G.; Baierle, M.; Durgante, J.; Sauer, E.; Cassini, C.; Cerski, C. T.; Zielinsky, P.; Salvador, M.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Gargia, S. C. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. P. , 2013.

Burger, M. M. Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. **Nature**. V. 227, P. 170-171, 1970.

Ca, J.; Chen, S.; Zhang, W.; Wei, Y.; Lu, J.; Xing, J.; Dong, Y. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in 5-fluorouracil-treated human breast cancer MCF-7 cells. **Clinical and Translational Oncology**. V. 16. P. 650-659, 2014.

Cantinelli, F. S.; Camacho, R. S.; Smaletz, O.; Gonsales, B. K.; Braguittoni, E.; Rennó, J. R. A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. **Revista de Psiquiatria Clínica**. V. 33. P. 124-33, 2006.

Cipriani, P.; Ruscitti, P.; Carubbi, F.; Liakouli, V.; Giacomelli, R. Methotrexate in rheumatoid arthritis: optimizing therapy among different formulations. Current and emerging paradigms. **Clinical Therapeutics**. V. 36. P. 427-435, 2014.

Chan, E. S.; Cronstein, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research**. V. 4. P. 266-273, 2012.

Chan, E. S.; Cronstein, B. N. Methotrexate-how does it really work? **Nature Reviews Rheumatology**. V. 6. P. 175-178, 2010.

Chen, D-H.; Huang S-H. Fast separation of bromelain by polyacrylic acid-bound iron oxide magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry**. V. 39. P. 2207-2211, 2004.

Chen, Y.; Cao, J.; Zhu, H. Y.; Cui, S.; Wang, A. Q.; Qian, Z. Y.; Gu, Y. Q. Synthesis and evaluation of methionine and folate co-decorated chitosan self-assembly polymeric micelles as a potential hydrophobic drug-delivery system. **Chinese Science Bulletin**. V. 58. P. 2379-2386, 2013.

Cheng, J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Sung, J.; Luther, G.; Gu, F. X.; Levy-Nissenbaum, E.; Radovic-Moreno, A. F.; Langer, R.; Farokhzad' O. C. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. **Biomaterials**. V. 28. P. 869-876, 2007.

Chiang, C-H.; Hu, S-H.; Liao, B-J.; Chang, Y-C.; Chen, S-Y. Enhancement of cancer therapy efficacy by trastuzumab-conjugated and pH-sensitive nanocapsules with the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. V. 10. P. 99-107, 2014.

Chiang, Y-C.; Kuo, L-N.; Yen, Y-H.; Tang, C-H.; Chen, H-Y. Infection risk in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept or adalimumab. **Computer methods and programs in biomedicine**. V. 116. P. 319-327, 2014.

Chintamani. Singhal, V.; Singh, J. P.; Lyall, A.; Saxena, S.; Bansal, A. Is drug-induced toxicity a good predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer? - A prospective clinical study. **BioMed Central Cancer**. V. 4. P.1-9, 2004.

Conde, D. M.; Pinto-Neto, A. M.; Freitas Jr, R.; Aldrighi, J. M. Qualidade de vida de mulheres com câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstratícia**. V. 28. P. 195-204, 2006.

Contri, R. V.; Kaiser, M.; Poletto, F. S.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. V. 10. P. 1-9, 2010.

Corbacho, M. I.; Dapuetto, J. J. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. V. 1. P. 31-42, 2010.

Couvreur, P.; Barrat, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

Couvrer, P.; Christine, V. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**. V. 23.P. 1417-1450, 2006.

Cronstein, B. How does methotrexate suppress inflammation? **Clinical and experimental rheumatology**. V. 28. P. S21-23, 2010.

Cruz, L.; Soares, L. U.. Dalla Costa, T.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 313. P 198-205, 2006.

Dhandayuthapani, S.; Perez, H. D.; Paroulek, A.; Chinnakkannu, P.; Kandalam, U.; Jaffe, M.; Rathinavelu, A. Bromelain-Induced Apoptosis in GI-101A breast cancer cells. **Journal of Medicinal Food**. V. 15. P. 344-349, 2012.

De, M.; Rana, S.; Rotello, V.M. Nickel-ion-mediated control of the stoichiometry of His-tagged protein/nanoparticle interactions. **Macromolecular Bioscience**. V. 9. P. 174-178, 2009.

De Azevedo, A. B.; Ferraz, M. B.; Ciconelli, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value Health**. V. 11. P. 869-77, 2008.

Dervieux, T.; Furst, D.; Lein, D. O.; Capps, R.; Smith, K.; Walsh, M.; Kremer, J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**. V. 50. P. 2766-2774, 2004.

Devakate, R. V.; Patil, V. V.; Waje, S. S.; Thorat, B. N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**. V. 64. P. 259-264, 2009.

Dhar, S.; Gu, F. X.; Langer, R.; Farokhzad, O. C.; Lippard, S. J. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 105. P. 17356-17361, 2008.

Dick, P. F. Síntese e estudo fotofísico de marcadores moleculares fluorescentes para bicamadas lipídicas. UFRGS, LUME - repositório digital, Mestrado, 94, 2012.

Dimer, F. A.; Ortiz, M.; Pase, C. S.; Roversi, K.; Friedrich, R. B.; Pohlmann, A. R.; Burger, M. E.; Guterres, S. S. Nanoencapsulation of Olanzapine Increases Its Efficacy in Antipsychotic Treatment and Reduces Adverse Effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 10. P. 1137-1145, 2014.

Dong, X.; Mattingly, C. A.; Tseng, M. T.; Cho, M. J.; Liu, Y.; Adams, V. R.; Mumper, R. J. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. **Cancer Research**. V. 69. P. 3918-3926, 2009.

Dougados, M.; Soubrier, M.; Antunez, A.; Balint, P.; Balsa, A.; Buch, M. H.; Casado, G.; Detert, J.; El-Zorkany, B.; Emery, P.; Hajjaj-Hassouni, N.; Harigai, M.; Luo, S. F.; Kurucz, R.; Maciel, G.; Mola, E. M.; Montecucco, C. M.; McInnes, I.; Radner, H.; Smolen, J. S.; Song, Y. W.; Vonkeman, H. E.; Winthrop, K. J. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). **Annals of the Rheumatic Diseases**. V. 73. P. 62-68, 2014.

Du, W.-L.; Niu, S.-S.; Xu, Y.-L.; Xu Z.-R.; Fan C.-L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p. 385–389, 2009.

Duthie, S. J. Folic-acid-mediated inhibition of human colon-cancer cell growth. **Nutrition**. V. 17. P. 736-737, 2001.

Elomaa, I.; Joensuu, H.; Blomqvist, C. Vinorelbine, methotrexate and fluorouracil (VMF) as first-line therapy in metastatic breast cancer: a randomized phase II trial. **Annals of Oncology**. V. 14., P. 699-703, 2003.

Emery, P.; Breedveld, F. C.; Hall, S.; Durez, P.; Chang, D. J.; Robertson, D.; Singh, A.; Pedersen, R. D. Koenig, A. S.; Freundlich, B. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. **The Lancet**. V. 372. P.375-382, 2008.

Emery, P.; Fleischmann, R. M.; Moreland, L. W.; Hsia, E. C.; Strusberg, I.; Durez, P.; Nash, P.; Amante, E. J.; Churchill, M.; Park, W.; Pons-Estel, B. A.; Doyle, M. K.; Visvanathan, S.; Xu, W.; Rahman, M. U.; Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naïve patients with active rheumatoid arthritis: twenty-fourweek results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**. V. 60. P. 2272-83, 2009

Eng, G.; Stoltenberg, M. B.; Szkudlarek, M.; Bouchelouche, P. N.; Christensen, R.; Bliddal, H.; Bartels, E. M. Efficacy of treatment intensification with adalimumab, etanercept and infliximab in rheumatoid arthritis: A systematic review of cohort studies with focus on dose. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. V. 43. P. 144-151, 2013.

Fabi, A.; Mottolese, M.; Segatto, O. Therapeutic targeting of ERBB2 in breast cancer: understanding resistance in the laboratory and combating it in the clinic. **Journal of Molecular Medicine**. v. 92, p. 681-695, 2014.

Faria, T.; Campos, A.; M.; Senna, E. L. Preparation and Characterization of Poly(D,L-Lactide) (PLA) and Poly(D,L-Lactide)-Poly(Ethylene Glycol) (PLA-PEG) Nanocapsules Containing Antitumoral Agent Methotrexate. **Macromolecular Symposia**. V. 229. P. 228-233, 2005.

Feldmann, M.; Brennan, F. M.; Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annual Review of Immunology**. V. 14. P. 397-440, 1996.

Fiel, L. A.; Rebêlo, L. M.; Santiago, T. M.; Adorne, M. D.; Guterres, S. S.; Sousa, J. S.; Pohlmann, A. R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**. V. 7, P. 7240 – 7247, 2011.

Fiel, L. A.; Adorne, M. D.; Guterres, S. S.; Netz, P. A.; Pohlmann, A. R. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: A quick quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. V. 431. P.93-104, 2013.

Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 796 – 810, 2010.

Figueiro, F.; Bernardi, A.; Frozza, R. L.; Terroso, T.; Zanotto-Filho, A.; Jandrey, E. H.; et al. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 9. P. 516-526, 2013.

Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**. V. 423. P. 356-361, 2003.

Fontana, M. C.; Coradini, K.; Guterres, S. S. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 5, P.n254-263, 2009.

Fontana, M.C.; Coradini, K.; Pohlmann, A.R. et a. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: Effect on the physiochemical characteristics, drug release, and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. V. 10, P. 3091-3099, 2010.

Fossati, R.; Confalonieri, C.; Torri, V.; Ghislandi, E.; Penna, A.; Pistotti, V.; Tinazzi, A.; Liberati, A. Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women. **Journal of Clinical Oncology**. V. 16. P. 3439-3460, 1998.

Franzi, A. S.; Silva, P. G. Avaliação da qualidade de vida em pacientes submetidos à quimioterapia ambulatorial no Hospital de Heliópolis. **Revista brasileira de cancerologia**. V. 49. P. 153-158, 2003.

Friedrich, R. B. ; Dimer, F. A. ; Guterres, S. S. ; Beck, R. C. R. ; Pohlmann, A. R. Nanoencapsulation of Tacrolimus in Lipid-Core Nanocapsules Showed Similar Immunosuppressive Activity After Oral and Intraperitoneal Administrations. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 10. P. 1599-1609, 2014.

Frozza, R. L.; Bernardi, A.; Paese, K. ;Hoppe, J. B. ; Silva, T. ; Battastini, A. M. O. ; Pohlmann, A. R. ; Guterres, S. S. ; Salbego, C. Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 6. P. 694 - 703, 2010.

Gabizon, A.; Horowitz, A. T.; Goren, D.; Tzemach, D.; Mandelbaum-Shavit, F.; Qazen, M. M.; Zalipsky, S. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: *in vitro* studies. **Bioconjugate Chemistry**. V. 10. P. 289-298, 1999.

Gabriel, S. E.; Crowson, C. S.; Kremers, H. M.; Doran, M. F.; Turesson, C.; O'Fallon, W. M.; Matteson, E. L. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. **Arthritis Rheumatology**. V. 48. P. 54-58, 2003.

Gaffo, A.; Saag, K.G.; Curtis, J.R. Treatment of rheumatoid arthritis. **American Journal of Health-System Pharmacy**. V. 63. P. 2451-2465, 2006.

Gerard, G. Therapeutique anti-cancereuse et bromelaine. **Agressologie**. V.13. P. 261-274, 1972.

Gil, E. M. C. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**. v, 40, p. 862–871, 2014.

Gomathi, T.; Govindarajan, C.;, Rose, M.H.; Sudha, P. N.; Mohamed Imran, P. K.; Venkatesan, J.; Kim, S-K. Studies on drug-polymer interaction, *in vitro* release and cytotoxicity from chitosan particles excipient. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 468. P. 214-222, 2014.

Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents ass trace impurities. **The Journal of Organic Chemistry**. V. 62. P. 7512-7515, 1997.

Guiu S, Michiels S, Andre F, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. **Annals of Oncology**. V. 23. P. 2997-3006, 2012.

Guo, J.; Gao, X.; Su, L.; Xia, H.; Gu, G.; Pang, Z.; Jiang, X.; Yao, L.; Chen, J.; Chen, H. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. **Biomaterials**. V. 32. P. 8010-8020, 2011.

Gupta, A.; Dai, Y.; Vethanayagam, R. R.; Hebert, M.F.; Thummel, K. E.; Unadkat, J. D.; Ross, D. D.; Mao, Q. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. V. 58. P. 374-383, 2006.

Gupta, S.C.; Patchva, S.; Aggarwal, B.B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **The AAPS Journal**. V. 15. P. 195-218, 2013.

Guterres, S. S.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: Marcelo M. Morales. (Org.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. Atheneu, cap. 17. P. 247-264, 2007.

Guterres, S. S.; Alves, M. P.; Pohlmann, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocápsulas, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**. V. 2, P. 147-157, 2007.

Guterres, S. S.; Poletto, F. S. ; Colome, L. M. ; Raffin, R. P.;Pohlmann, A. R. Polymeric nanocapsules for drug delivery: an overview. In: Monzer Fanun (Chief

Editor). (Org.). **Colloids in Drug Delivery**, 1. ed. Boca Raton: Taylor & Francis/CRC Press, cap. 3, P. 71-97, 2010.

Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. Reexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of immunological Methods**. V. 119. P. 203-210, 1989.

Hari, K.; Pichaimani, A.; Kumpati, P. Acridine orange tethered chitosan reduced gold nanoparticles: a dual functional probe for combined photodynamic and photothermal therapy. **RSC Advances**. V. 3. P. 20471-20479, 2013.

Harrach, T.; Eckert, K.; Schutze-Foster, K.; Nuck, R.; Grunow, D.; Maurer H. R. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. **Journal of Protein Chemistry**. V. 14. P. 41-52.

Harting, S. M.; Greene, R. R.; Dikov, M. M.; Prokop, A.; Davidson, J. M. Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. **Pharmaceutical Research**. V. 24. P. 2353-2369, 2007.

Hegen, M.; Keith, J. C.; Collins, M.; Nickerson-Nutter, C. L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**. V. 67. P. 1505-1515, 2008.

Hirsjärvi, S.; Peltonen, L.; Hirvonen, J. Layer-by-layer polyelectrolyte coating of low molecular weight poly (lactic acid) nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 49. P. 93-99, 2006.

Hong, R.; Fischer, N.O.; Verma, A.; Googman, C.M. Control of Protein Structure and Function through Surface Recognition by Tailored Nanoparticle Scaffolds. **Journal of the American Chemical Society**. V. 126. P. 739-743, 2004.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama). Acessado em 02 de agosto de 2014.

International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO). Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. Press release n. 223, 2013.

International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2014.



Issarachot, O.; Suksiriworapong, J.; Takano, M.; Yumoto, R.; Junyaprasert, V. S. Folic acid-modified methotrexate-conjugated PEGylated poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery. **Journal of Nanoparticle Research**. V. 16. P. 2276, 2014.

Jäger, A.; Stefani, V.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 338. P. 297-305, 2007.

Jäger, E., Venturini, C. G., Poletto, F., Colome, L. M., Pohlmann, J. P. U., Bernardi, A., Battastini, A. M. O., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V.5, P.130-140, 2009.

Johnson-Thompson, M. C.; Guthrie, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**. V. 88. P. 1224-1229, 2000.

Jung, T.; Kamm, W.; Breitenbach, A.; Hungerer, K.; Hundt, E.; Kissel, T. Tetanus Toxoid Loaded Nanoparticles from Sulfobutylated Poly(Vinyl Alcohol)-Graft-Poly(Lactide-co-Glycolide): Evaluation of Antibody Response After Oral and Nasal Application in Mice. **Pharmaceutical Research**. V. 3. P. 352-360, 2001.

Kalra, N.; Bhui, K.; Roy, P.; Srivastava, S.; George, J.; Prasad, S.; Shukla, Y. Regulation of p53, nuclear factor kB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 226. P. 30-37, 2006.

Kasim, N. A.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernäs, H.; Hussain, A. S.; Junginger, H. E.; Stavchansky, S. A.; Midha, K. K.; Shah, V. P. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**. V. 1. P. 85-96, 2004.

Kaul, G.; Amiji, M.; Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model. **Journal of Drug Targeting**, V.12. P. 585, 2004.

Kekow J, Mueller-Ladner U, Schulze-Koops H. Rituximab is more effective than second anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients and previous TNF $\alpha$  blocker failure. **Biologics**. V. 6. P. 191-199, 2012.

Kelly, G. S. Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic application. **Alternative Medicine Review**. V. 1. P. 243-267, 1996.

Khan, Z. A.; Tripathi, R.; Mishra, B. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. **Expert Opinion on Drug Delivery**. V. 9. P. 151-169, 2012.

Klarenbeek, N. B.; Kerstens, P. J.; Huizinga, T. W.; Dijkmans, B. A.; Allaart, C. F. Recent advances in the management of rheumatoid arthritis. **British Medical Journal**. V. 341:c6942, 2010.

Knight, D. M.; Trinh, H.; Le, J.; Siegel, S.; Shealy, D.; McDonough, D.; Scallon, B.; ArevaloMoore, M.; Vilcek, J.; Daddona, P.; Grayeb, J.; Construction and initial characterization of a mouse-human chimaeric anti-TNF antibody. **Molecular Immunology**. V. 30. P. 1443-1453, 1993.

Kobara, H.; Wakisaka, A.; Takeuchi, K. Preferential Solvation of Na<sup>+</sup> in N,N-Dimethylformamide–Water Binary Mixture. **The Journal of Physical Chemistry B**. V. 107. P. 11827-11829, 2003.

Kobelt, G.; Jonsson, B. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: outcome and cost-utility of treatments. **The European Journal of Health Economics**. V. 8. P. 95-106, 2008.

Kobelt, G.; Woronoff, A-S.; Richard, B.; Peeters, P.; Sany, J. Disease status, costs and quality of life of patients with rheumatoid arthritis in France: The ECO-PR Study. **Joint Bone Spine**. V. 75. P. 408-415, 2008.

Kohler, N.; Sun, C.; Wang, J.; Zhang, M. Methotrexate-modified supermagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. **Langmuir**. V. 21. P. 8858-8864.

Königsberg, R.; Maierhofer, J.; Steininger, T.; Kienzer, G.; Dittrich, C. Long-term remission of a Her2/neu positive primary breast cancer under double monoclonal antibody therapy with trastuzumab and bevacizumab. **Radiology and Oncology**. v. 48, p. 184-188, 2014.

Kreuter, J.; Shamenkov, D.; Petrov, V.; Ränge, P.; Cychutek, K.; Koch-Brandt, C.; Alyautdin, R. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain barrier. V. 10. P. 317-325, 2002.

Kreuter, J.; Ränge, P.; Petrov, V. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs of the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. **Pharmaceutical Research**. V. 20. P. 409–16, 2003.

Kreuter, J. Influence of the surface properties on nanoparticle-Mediated Transport of Drugs o the Brain. **Journal of nanoscience and Nanotechnology**. V. 4. P. 484-488, 2004.

Kulkamp, I. C.; Paese, K.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**. V. 32. P. 2078-2084, 2009.

Kukowska-Latallo, J.F.; Candido, K.A.; Cao, Z.; Nigavekar, S.S.; Majoros, I.J.; Thomas, T.P.; Balogh, L.P.; Khan, M.K.; Baker Jr., J.R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer Research**. V.65, P.5317–5324, 2005.

Lebret, V.; Raehm, L.; Durand, J-O.; Smaïhi, M.; Werts, M. H. V.; Blanchard-Desce, M.; Méthy-Gonnod, D.; Dubernet, C. Surface functionalization of two-photon dye-doped mesoporous silica nanoparticles with folic acid: cytotoxicity studies with HeLa and MCF-7 cancer cells. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**. V. 48. P. 32-39, 2008.

Lesuis, N.; Befrits, R.; Nyberg, F.; Van Vollenhoven, R. F. Gender and the treatment of immune-mediated chronic inflammatory diseases: rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and psoriasis: an observational study. **BMC Medicine**. V. 10. P. 82, 2012.

Li, J.; Hu, X. L.; Liu, M.; Hou, J.; Xie, Z. G.; Huang, Y. B.; Jing, X. B. Complex of cisplatin with biocompatible poly(ethylene glycol) with pendant carboxyl groups for the effective treatment of liver cancer. **Journal of Applied Polymer Science**. V. 131. P. 1-9, 2014.

Liang, Y.; Besch-Williford, C.; Aebi, J. D.; Mafuvadze, B.; Cook, M. T.; Zou, X.; Hyder, S. M. Cholesterol biosynthesis inhibitors as potent novel anti-cancer agents: suppression of hormone-dependent breast cancer by the oxidosqualene cyclase inhibitor RO 48-8071. **Breast Cancer Research Treatment**. V. 146. P. 51-62, 2014.

Liang, J.; Wuc, W-L.; Xub, X-D.; Zhuo, R-X.; Zhang, X-Z. pH Responsive micelle self-assembled from a new amphiphilic peptide as anti-tumor drug carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 114. P. 398–403, 2014.

Lieb, J. Antidepressants, prostaglandins and the prevention and treatment of cancer. **Medical Hypotheses**. V. 69. P. 684-689, 2007.

Lucena, G. L.; Silva, A. G.; Honório, L. M. C.; Santos, V. D. Remoção de corantes têxteis a partir de soluções aquosas por quitosana modificada com tioacetamida. **Revista Ambiente & Água**. V. 8, 2013.

Maini, R. N.; Breedveld, F. C.; Kalden, J. R.; Smolen, J. S.; Davis, D. A.; Macfarlane, J. D.; Antoni, C.; Leeb, B.; Elliott, M.J.; Woody, J.N.; Schaible, T.F.; Feldmann, M., Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**. V. 4. P. 1552–1563, 1998.

Mamounas, E. P.; Bryant, J.; Lembersky, B.; Fehrenbacher, L.; Sedlacek, S. M.; Fisher, B.; Wickerham, D. L.; Yothers, G.; Soran, A.; Wolmark, N. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. **Journal of Clinical Oncology**. V. 23. P. 3686-3696, 2005.

Marcatto P. D.; Durán, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, V. 8. P. 2216-2229, 2008.

Mayti, A. R.; Chakraborty, A.; Mondal, A.; Jana, N. R. Carbohydrate coated, folate functionalized colloidal graphene as a nanocarrier for both hydrophobic and hydrophilic drugs. **Nanoscale**. V. 6. P. 2752-2758, 2014.

McInnes, I. B.; O'Dell, J. R. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatoid Diseases**. V. 69. P.1898-1906, 2010.

McInnes, I. B.; Schett, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**. V. 365. P. 2205-2219, 2011.

Meinig, G.E. Bromelain. **Phytomedicine**. V.2. P.1-2, 1999.

Mello, S. B.; Tavares, E. R.; Bulgarelli, A.; Bonfa, E.; Maranhao, R. C. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. **International Journal of Nanomedicine**. V. 8. P. 443-449, 2013.

Mendonca, M. A.; Cunha, F. Q.; Murta, E. F.; Tavares-Murta, B. M. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. V. 57. P. 663-670, 2006.

Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 385. P. 113-142, 2010.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. V. 65. P. 55-63, 1983.

Moss, J. N.; Frazier, C. V.; Martin, G. J. Bromelains: The pharmacology of the enzymes. **Arch International of Pharmacodynamics**. V. 145. P. 166-189, 1963.

Murachi, T.; Yasui, M.; Yasuda, Y. **Biochemistry**. V.3. P.48-55, 1964.

Murawala, P.; Tirmale, A.; Shiras, A.; Prasad, B. L. V. In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: effective Carrier of anticancer drug methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. **Materials Science and Engineering C**. V. 34. P. 158-167, 2014.

Mynott, T.L.; Ladhams, A.; Scarmato, P.; Engwerda, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. **The Journal of Immunology**. v.163, p. 2568-2575, 1999.

Myung Joo Kang, M. J.; Park, S. H.; Kang, M. H.; Park, M. J.; Choi, Y. W. Folic acid-tethered Pep-1 peptide-conjugated liposomal nanocarrier for enhanced intracellular drug delivery to cancer cells: conformational characterization and in vitro cellular uptake evaluation. **International Journal of Nanomedicine**. V. 8. P. 1155-1165, 2013.

Musgrove, E. A.; Sutherland, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews Cancer**. V. 9. P. 631-643, 2009.

Mynott, T.L.; Ladhams, A.; Scarmato, P.; Engwerda, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. **Journal of Immunology**. V.163. P. 2568-2575, 1999.

Nadin, S. B.; Sottile, M. L.; Montt-Guevara, M. M.; Gauna, G. V.; Daguerre, P.; Leuzzi, M.; Gago, F. E.; Ibarra, J.; Cuello-Carrión, F. D.; Ciocca, D. R.; Vargas-Roig, L. M. Prognostic implication of HSPA (HSP70) in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. **Cell Stress and Chaperones**. v. 19, p. 493-505, 2014.

Nam, J. L.; Winthrop, K. L.; van Vollenhoven, R. F.; Pavelka, K.; Valesini, G.; Hensor, E. M.; Worthy, G. Landewé, R. Smolen, J. S.; Emery, P.; Buch, M. H. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. **Annals of the Rheumatic Diseases**. V. 69. P. 976-986, 2010.

Nam, J. L.,; Ramiro, S.; Gaujoux-Viala, C.; Takase, K.; Leon-Garcia, M.; Emery, P.; Gossec, L.; Landewe, R.; Smolen, J. S.; Buch, M. H. Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. V. 7, 2014.

Nieper, H. A. Bromelain in der Kontrolle malignen Wachstums. **Krebsgeschehen**. V.1. P. 9–15, 1976.

Noe, V.; Alemany, C.; Nicolas, M.; Ciudad, C. J. Sp1 involvement in the 4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-mediated increase in resistance to methotrexate in Chinese hamster ovary cells. **European Journal of Biochemistry**. V. 268. P. 3163-3173, 2001.

Nogueira, D. R.; Tavano, L.; Mitjans, M.; Pérez, L.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**. V. 34. P. 2758-2772, 2013.

Oliveira, C. P.; Venturini, C. G.,; Donida, B.; Poletto, F. S.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**. V. 9. P. 1141-1150, 2013.

Onken, J. E.; Greer, P. K.; Calingaert, B.; Hale, L. P. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies *in vitro*. **Clinical Immunology**. V. 126. P. 345-352, 2008.

Ourique, A.F.; Azoubel, S.; Ferreira, C.V. et al. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and *in vitro* antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 6. P. 214-223, 2010.

Ourique, A. F., Melero, A., Silva, C. B., Schaefer, U. F., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Lehr, C-M., Kostka, K-H., Beck, R. C. R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 79. P 95-101, 2011.

Ota, S.; Horie, K.; Hagino, F.; Hashimoto, C.; Date, H.; **Journal of Biochemistry**. V.71. P. 817-830, 1972.

Owens III, D.E.; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. V.93. P. 307, 2006.

Pan, Y.; Li, Y.J.; Zhao, H.Y.; Zheng, J-M.; Wei, H. X. G.; Hao, J-S.; Cui, F-D. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo* **Internacional Journal of Pharmaceutics**. V. 249. P. 139–147, 2002.

Pan, J.; Liu, Y.; Feng, S-S. Multifunctional nanoparticles of biodegradable copolymer blend for cancer diagnosis and treatment. **Nanomedicine**. V. 5. P. 347-350, 2010.

Patel, T.; Zhou, J.; Piepmeier, J.M. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 64, P. 701-705, 2012.

Pearson, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine**. V. 91. P. 95-101, 1956.

Pillai, K.; Akhter, J.; Chua, T. C. Anticancer Property of Bromelain With Therapeutic Potential in Malignant Peritoneal Mesothelioma. **Cancer Investigation**. V. 31. P. 241-250, 2013.

Pillai, K.; Ehteda, A.; Akhter, J.; Chua, T. C.; Morris, D. L. Anticancer effect of bromelain with and without cisplatin or 5-FU on malignant peritoneal mesothelioma cells. **Anti-Cancer Drugs**. V. 25. P. 150-160,2014.

Pincus, T.; Cronstein, B.; Braun, J. Methotrexate – the anchor drug – an introduction. **Clinical and experimental rheumatology**. V. 28. P. S1-2,2010.

Pissinate, K.; dos Santos Martins-Duarte, É.; Schaffazick, S. R.; Oliveira, C. P.; Vommaro, R. C.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Souza, V. Pyrimethamine-loaded lipid-core nanocapsules to improve drug efficacy for the treatment of toxoplasmosis. **Parasitology research**. V. 113. P. 555-564, 2013.

Poletto, F. S.; Fiel, L. A.; Lopes, M. V.; Schaab, G.; Gomes, A.M. O.; Guterres, S. S.; Rossi-Bergmann, B.; Pohlmann, A. R. Fluorescent-Labeled Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. **Journal of colloid science and biotechnology**. V. 1. P. 1-10, 2012.

Poletto, F. S.; Oliveira, C. P.; Wender, H.; Regent, D.; Teixeira, S. R.; Guterres, S. S.; Rossi-Bergman, B.; Pohlmann, A. R. How sorbitan monostearate can increase drug-loading capacity of lipid-core polymeric nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 2014.

Prabhu, P.; Shetty, R.; Koland, M.; Vijayanarayana, K.; Vijayalakshmi, K. K, Nairy, M. H.; Nisha, G. S. Investigation of nano lipid vesicles of methotrexate for anti-rheumatoid activity. **International Journal of Nanomedicine**. V. 7. P.177-186, 2012.

Prasad, V., Semwogerere, D.; Weeks, E. R. Confocal microscopy of colloids. **Journal of Physics Condensed Matter**. V. 19. P. 1-25, 2007.

Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Li, Y.; Wang, M. Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V.15, P. 1397–1399, 2005.

Quinn, M. A.; Conaghan, P. G.; O'Connor, P. J.; Karim, Z.; Greenstein, A.; Brown, A.; Fraser, A.; Jarret, S.; Emery, P. Very early treatment with infliximab in addition to methotrexate in early, poor prognosis rheumatoid arthritis reduces magnetic resonance imaging evidence of synovitis and damage, with sustained benefit after infliximab withdrawal: results from a twelvemonth randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. **Arthritis & Rheumatology**. V. 52. P. 25-35, 2005.

Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. V. 2. P. 8-21, 2006.

Rocca, A.; Bravaccini, S.; Scarpi, E.; Mangia, A.; Petroni, S.; Puccetti, M.; Medri, L.; Serra, L.; Ricci, M.; Cerasoli, S.; Biglia, N.; Maltoni, R.; Giunchi, D. C.; Gianni, L.;

Tienghi, A.; Brandi, M.; Faedi, M.; Sismondi, P.; Paradiso, A.; Silvestrini, R.; Amadori, D. Benefit from anthracyclines in relation to biological profiles in early breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**. v. 144, p. 307–318, 2014.

Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; Medina, L. F. C.; Brandelli, A.; Stefani, V. Synthesis and spectroscopic characterisation of new ESIPT fluorescent protein probes. **Photochemical & Photobiological Science**. V. 4. P. 254-259, 2005.

Romano, B.; Fasolino, I.; Pagano, E.; Capasso, R.; Pace, S.; De Rosa, G.; Milic, N.; Orlando, P.; Izzo, A. A.; Borrelli, F. The chemopreventive action of bromelain, from pineapple stem (*Ananas comosus* L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects. **Molecular Nutrition and Food Research**. V. 58. P. 457-465, 2014.

Rowan, A. D.; Buttle, D. J.; Barret, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**. V. 226. P. 869-875, 1990.

Ruiz-Ruiz, M. C.; López-Rivas, A. p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. **Cell Death and Differentiation**. V. 6. P. 271-280, 1999.

Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N. Regulatory T cells in self-tolerance and autoimmunity disease. **International Reviews of Immunology**. V. 24. P. 211-226, 2005.

Sartori, T.; Seigi Murakami, F.; Pinheiro Cruz, A, Machado de Campos, A. Development and validation of a fast RP-HPLC method for determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules. **Journal of Chromatographic Science**. V. 46. P. 505-509, 2008.

Saxne, T.; Palladino, M. A. Jr; Heinegard, D.; Detection of tumor necrosis factor  $\beta$  in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. **Arthritis and Rheumatism**. V. 31. P. 1041-1045, 1988.

Schaffazick, S. R.; Siqueira, I. R.; Badejo, A. S.; Jornada, D. S.; Pohlmann, A. R.; Netto, C. A.; Guterres, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 69. P. 64-71, 2008.

Schnabel, A.; Gross, W. Low-dose methotrexate in rheumatic diseases efficacy, side effects, and risk factors for side effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. V. 23. P.310–27, 1994.

Schultze, E.; Ourique, A.; Yurgel, V. C.; Begnini, K. R.; Thurow, H.; De Leon, P. M.; Campos, V. F.; Dellagostin, O. A.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Seixas, F. K.; Beck, R. C. R.; Collares, T. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **European journal of pharmaceutics and**



**biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV.** V. 87. P. 55-63, 2014.

Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine.** V. 17. P. 704-712, 2006.

Secor Jr, E. R.; Singh, A.; Guernsey, A. L.; McNamara, J. T.; Zhan, L.; Maulik, N.; Thrall, R. S. Bromelain treatment reduces CD25 expression on activated CD4+ T cells in vitro. **International Immunopharmacology.** V. 9. P. 340-346, 2009.

Selga, E.; Oleaga, C.; Ramírez, S.; Almagro, M. C.; Noé, V.; Ciudad, C. J. Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. **Genome Medicine.** V. 1. P. 83, 2009.

Seo, D.; Jeong, Y.; Kim, D.; Jang, M.; Jang, M.; Nah, J. Methotrexate-incorporated polymeric micelles composed of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** V. 69 P.157–163, 2009.

Shapira, A.; Livneya, Y. D.; Broxtermanc, H. J.; Assaraf, Y. G. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug Resistance. **Drug Resistance Updates.** V. 14. P. 150–163, 2011.

Shen, C.; Maerten, P.; Geboes, K.; van Assche, G.; Rutgeerts, P.; Ceuppens, J.L. Infliximab induces apoptosis of monocytes and T lymphocytes in a human-mouse chimeric model. **Clinical Immunology.** V. 115. P. 250–259, 2005.

Sirotnak, F. M.; Tolner, B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. **Annual Review of Nutrition.** V. 19. P. 91-122, 1999.

Smolen, J. S.; Han, C.; van der Heijde, D. M.; Emery, P.; Bathon, J. M.; Keystone, E. Radiographic changes in rheumatoid arthritis patients attaining different disease activity states with methotrexate monotherapy and infliximab plus methotrexate: the impacts of remission and tumour necrosis factor blockade. **Annals of the Rheumatic Diseases.** V. 68. P. 823-827, 2009.

Smolen, J.; Aletaha, D.; Bijlsma, J.; Breedveld, F.; Boumpas, D.; Burmester, G.; Combe, B.; Cutolo, M.; de Wit, M.; Dougados, M.; Emery, P.; Gibofsky, A.; Gomez-Reino, J. J.; Haraoui, B.; Kalden, J.; Keystone, E. C.; Kvien, T. K.; McInnes, I.; Martin-Mola, E.; Montecucco, C.; Schoels, M.; van der Heijde, D. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. **Annals of the Rheumatic Diseases.** V. 69. P. 631, 2010;.

Soares, P. A. G.; Vaz, A. F. M.; Correia, M. T. S.; Pessoa Jr, A.; Carneiro-da-Cunha, M. G. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology.** V. 98. P. 389-395, 2012.

Sociedade Americana do Câncer (ACS). Cancer Facts and Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society, 2014.

Suarez-Almazor, M. E.; Belseck, E.; Shea, B.; Wells, G.; Tugwell, P. Methotrexate for rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Systematic Reviews**. 2:CD000957, 2000.

Sokka, T.; Toloza, S.; Cutolo, M.; Kautiainen, H.; Makinen, H.; Gogua, F.; Skakiv, V.; Badsha, H.; Peets, T.; Baranauskaite, A.; Géher, F.; Újfalussy, F.; Skopouli, F. N.; Mavrommati, M.; Alten, R.; Pohl, C.; Sibila, J.; Stancati, A.; Salaffi, F.; Romanowski, W.; Zarowny-Wierzbinska, D.; Henrohn, D.; Bresnihan, B.; Minnock, P.; Knudsen, L. S.; Jacobs, J. W. G.; Calvo-Alen, J.; Lazovskis, J.; Pinheiro, G. R. C.; Karateev, D.; Andersone, D.; Rexhepi, S.; Yazici, Y.; Pincus, T. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatment in the QUEST-RA Study. **Arthritis Research & Therapy**. V. 11, 2009.

St Clair, E. W.; van der Heijde, D. M.; Smolen, J. S.; Maini, R. N.; Bathon, J. M.; Emery, P. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**. V. 50. P. 3432-3443, 2004.

Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaele, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 89. P. 1452-1464, 2000.

Sudimack, J.; Lee, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 41. P. 147-162, 2000.

Sukthankar, P.; Avila, L. A.; Whitaker, S. K.; Iwamoto, T.; Morgenstern, A.; Apostolidis, C.; Liu, K.; Hanzlik, R. P.; Dadachova, E.; Tomich, J. M. Branched amphiphilic peptide capsules: Cellular uptake and retention of encapsulated solutes. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1838. P. 2296–2305, 2014.

Sun, Y.; Rowehl, L. M.; Huang, L.; Mackenzie, G. G.; Vrankova, K.; Komninou, D.; Rigas, B. Phospho-ibuprofen (MDC-917) suppresses breast cancer growth: an effect controlled by the thioredoxin system. **Breast Cancer Research**. V. 14R20, 2012.

Takahashi, N.; Yasuda, Y.; Goto, K.; Miyak, J.; Murachi, T.; **Journal of Biochemistry**. V.74. P. 355-373, 1973.

Taylor, P. C.; Mehta, P.; Tull, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. **Medicine**. V. 38. P. 163-166, 2010.

Tedesco, A. C.; Simioni, A. R.; Primo, F. L. Introdução à Nanotecnologia. In: Marcelo M. Morales. (Org.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. Atheneu, cap. 16. P. 237-246, 2007.

Tobon, G. J.; Youinou, P.; Saraux, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal Autoimmunity**. V. 35. P. 10-14, 2010.

Todd, E.W., 1949. Quantitative studies on the total plasmin and trypsin inhibitor of human blood serum. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 39. P. 295-308, 1949.

Torrecilla, D.; Lozano, M. V.; Lallana, E. Anti-tumor efficacy of chitosan-g-polyethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 83. P. 330-337, 2013.

Trotta, M.; Peira, E.; Carlotti, M. E.; Gallarate, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 270 P. 119–125, 2004.

Tu, Y.; Hershman, D. L.; Bhalla, K.; Fiskus, W.; Pellegrino, C.M.; Andreopoulou, E.; Makower, D.; Kalinsky, K.; Fehn, K.; Fineberg, S.; Negassa, A.; Montgomery, L. L.; Wiechmann, L. S.; Alpaugh, R. K.; Huang, M.; Sparano, J. A. A phase I-II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat plus sequential weekly paclitaxel and doxorubicincyclophosphamide in locally advanced breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 146, p. 145-152, 2014.

Tysnes, B. B.; Maurer, H. R.; Porwol, T.; Probst, B.; Bjerkvig, R.; Hoover, F. Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells. **Neoplasia**. V. 3. P. 469-479, 2001.

Van den Brande, J. M. H.; Koehler, T.; Zelinkova, Z.; Bennink, R.J.; Hommes, D.W.; te Velde, A. A.; Ten Kate, F.; van Deventer, S. J.; Peppelenbosch, M.P. Prediction of anti-TNF clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. **GUT**. V. 56. P. 509-517, 2007.

Vanniasinghe, A. S.; Bender, V.; Manolios, N. The potential of liposomal drug delivery for the treatment of inflammatory arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. V. 39. P. 182-196, 2009.

Varatharajan, N.; Lim, I. G.; Anandacoomarasamy, A.; Russo, R.; Byth, K.; Spencer, D. G.; Manolios, N.; Howe, G. B. Methotrexate: long-term safety and efficacy in an Australian consultant rheumatology practice. **Internal Medicine Journal**. V. .39. P 228-236, 2009.

Vasir, J. K.; Reddy, M. K.; Labhasetwar, V. D.; Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Current Nanoscience*. V. 1. N. 1. P. 47-64, 2005.

Venturini, C. G.; Jäger, E.; Oliveira, C. P.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. V. 375P. 200-208, 2011.

Vladimir, R.; Maximov, V.; Vertegel, A. Proteins to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticle as potential neuroprotective agents. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 108. P. 243-252, 2010.

Vyas, D.; Castro, P.; Saadeh, Y.; Vyas, A. The role of Nanotechnology in gastrointestinal cancer. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 10. P. 3204-3218, 2014.

Wang, R.-M., He, N.-P., Song, P.-F., He, Y.-F., Ding, L., Lei, Z. Preparation of low-molecular-weight chitosan derivative zinc complexes and their effect on the growth of liver cancer cells in vitro. **Pure and Applied Chemistry**. V. 81. P. 2397–2405, 2009.

Wang, J.; Liu, W.; Tu, Q.; Wang, J.; Song, N.; Zhang, Y.; Nie, N.; Wang, J. Folate-decorated hybrid polymeric nanoparticles for chemically and physically combined paclitaxel loading and targeted delivery. **Biomacromolecules**. V. 12. P. 228-234, 2011.

Wang, H.; Zhao, Y.; Wu, Y.; Hu, Y.-L.; Nan, K.; Nie, G.; Chen, H. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. **Biomaterials**. V. 32. P. 8281-8290, 2011.

Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Y.; Wang, X.; Ma, X.; Deng, Z.; Li, Y.; Liu, Z. Imaging-Guided pH-sensitive photodynamic therapy using charge reversible upconversion nanoparticles under near-infrared light. **Advanced Functional Materials**. V. 23. P. 3077-3086, 2013.

Wang, Y.; Ma, S.; Xie, Z.; Zhang, H. Synergistic combination therapy with paclitaxel and doxorubicin loaded micellar nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 116. P. 41-48, 2014.

Weber, C.; Reiss, S.; Langer, K. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 211. P. 67-68, 2000.

Weinblatt, M. E.; Coblyn, J. S.; Fox, D. A.; Fraser, P. A.; Holdsworth, D. E.; Glass, D. N.; Trentham, D. E. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**. V. 312. P. 818-822, 1985.

Westhovens, R.; Yocum, D.; Han, J.; Berman, A.; Strusberg, I.; Geusens, P. The safety of infliximab, combined with background treatments, among patients with rheumatoid arthritis and various comorbidities: a large, randomized, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**. V. 54. P. 1075-1086, 2006.

Wigginton, S. M.; Chu, B. C.; Weisman, M. H.; Howell, S. B. Methotrexate pharmacokinetics after intraarticular injection in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**. V. 23. P. 119-122, 1980.

Williams, A. S.; Camilleri, J. P.; Goodfellow, R. M.; Williams, B. D. A single intra-articular injection of liposomally conjugated methotrexate suppresses joint inflammation in rat antigen-induced arthritis. **British Journal of Rheumatology**. V. 35. P. 719-724, 1996.

Wolfe, F.; Cathey, M. A. The assessment and prediction of functional disability in rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**. V. 18. P. 1298-1306, 1991.

Xiang, G.; Wu, J.; Lu, Y.; Liu, Z.; Lee, R. J. Synthesis and evaluation of a novel ligand for folate-mediated targeting liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 356. P. 29-36, 2008.

Yang, Y.; Yang, Y.; Xie, X.; Cai, X.; Zhang, H.; Gong, W.; Wang, Z.; Mei, Z. PEGylated liposomes with NGR ligand and heat-activable cell-penetrating peptide-doxorubicin conjugate for tumor-specific therapy. **Biomaterials**. V. 35. P. 4368-4381, 2014.

Yurgel, V. C.; Oliveira, C. P.; Begnini, K. R.; Schultze, E.; Thurow, H. S.; Leon, P. M.; Dellagostin, O. A.; Campos, V. F.; Beck, R. C. R.; Guterres, S. S.; Collares, T.; Pohlmann, A. R.; Seixas, F. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**. V. 9. P. 1583-1591, 2014.

Zagouri, F.; Sergentanis, T. N.; Chrysikos, D.; Filipits, M.; Bartsch, R. mTOR inhibitors in breast cancer: A systematic review. **Gynecologic Oncology**. V. 127. P. 662-672, 2012.

Zanotto-Filho, A.; Coradini, K.; Braganhol, E.; Schröder, R.; Oliveira, C. M.; Simões-Pires, A.; Battastini, A. M. O.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Forcelini, C. M.; Beck, R. C. R.; Moreira, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 83. P. 156-167, 2013.

Zelenka, K.; Borsig, L.; Alberto, R. Trifunctional <sup>99m</sup>Tc based radiopharmaceuticals: metal-mediated conjugation of a peptide with a nucleus targeting intercalator. **Organic & Biomolecular Chemistry**. V. 9. P. 1071-1078, 2011.

Zhao, R.; Goldman, I. D. Resistance to antifolates. **Oncogene**. V. 22. P. 7431-7457, 2002.

Zhou, S.; Li, Y.; Cui, F.; Jia, M.; Yang, X.; Wang, Y.; Xie, L. Development of multifunctional folate-poly(ethylene glycol)-chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for biomedical applications. **Macromolecular Research**. V. 22. P. 58-66, 2014.

Zordoky, B. N. M.; Bark, D.; Soltys, C. L.; Sung, M. M.; Dyck, J. R.B. The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1840. P. 1943-1957, 2014.