

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA POLIMÉRICO
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
 α -TOCOFEROL**

Esio de Carvalho Coelho Junior

SAPIENTIA AEDIFICAT

2019

ESIO DE CARVALHO COELHO JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA POLIMÉRICO PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE α -TOCOFEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Inovação de Produtos e Terapêutica dos Agravos em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Alves de Sousa

João Pessoa – PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

J95d Junior, Esio de Carvalho Coelho.

Desenvolvimento de sistema polimérico para liberação controlada de Alfa-tocoferol / Esio de Carvalho Coelho Junior. - João Pessoa, 2019.
60 f.

Orientação: Paulo Rogério Ferreti Bonan Bonan.

Coorientação: Simone Alves de Sousa Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Mucosite Oral. 2. Nanopartículas. 3. Tocoferol. 4. Antioxidante. 5. Quitosana. 6. Poloxâmero. I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti Bonan. II. Sousa, Simone Alves de Sousa. III. Título.

UFPB/BC

ESIO DE CARVALHO COELHO JUNIOR

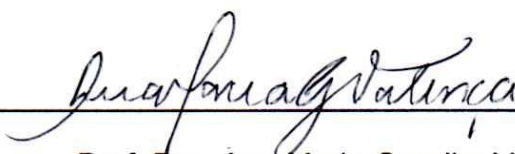
**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA POLIMÉRICO PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE α -TOCOFEROL**

Banca Examinadora



Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Presidente - UFPB



Prof. Dra. Ana Maria Gondim Valença

Examinadora - UFPB

Prof. Dr. Danyel Elias Cruz Perez

Examinador – UFPE

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos **Gabriel** e **Pedro**, cujos abraços e demonstrações de carinho fazem ressurgir o vigor e o ânimo perdidos pelas longas horas de trabalho e estudo.

À minha esposa **Erika von Söhsten Marinho**, pelo companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos nesses últimos quinze anos. Tenho certeza que minha incessante busca pelo desenvolvimento pessoal e profissional nada mais é do que uma tentativa, talvez intangível, de ver em mim o que vejo nela.

A meus pais **Bernadete de Jesus Coelho** e **Esio de Carvalho Coelho**, que sempre me incentivaram e me orientaram na busca do conhecimento e desenvolvimento intelectual e moral.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Paulo Rogério Ferretti Bonan** que, com sua personalidade cordial e sempre solícito, permitiu a elaboração das bases teóricas deste trabalho. Sempre ofereceu respostas e caminhos, com um surpreendente nível conhecimento, a todos os meus questionamentos necessários à condução da pesquisa. Agradeço principalmente pela maneira como conduziu a orientação do trabalho: acompanhando e orientando de perto, nunca tolhendo minha iniciativa e criatividade!

À **Prof^a. Dr^a. Simone Alves de Sousa**, pelo apoio contínuo, sempre se colocando à disposição para ajudar. Uma pessoa que admiro bastante pela cordialidade, bom humor e competência profissional.

Ao meu amigo **Jeferson Muniz**, pelo suporte constante nos testes biológicos e na análise estatística deste trabalho.

Ao **Dr. Lucas Ricardo Fernandes Figueiredo**, pelas orientações constantes e apoio na caracterização no material objeto desta pesquisa.

À equipe do **grupo de pesquisa do Hospital Napoleão Laureano**, por todo o convívio e aprendizado.

Aos **colegas do LACEC Tatiana, Camila, Miguel**, por todo o apoio prestado durante a condução dos trabalhos laboratoriais.

Aos **amigos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Carlos, Raíres, Hugo e Gregório**, por todos os momentos de descontração, companheirismo e apoio mútuo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A mucosite oral é um dos efeitos colaterais mais debilitantes para o paciente durante a terapia antineoplásica, seja ela quimio ou radioterápica. Não raramente a terapia antineoplásica necessita ser interrompida até a remissão da mucosite oral grave. A utilização tópica de agentes antioxidantes de liberação controlada tem sido sugerida como uma medida preventiva promissora. O presente trabalho desenvolveu um sistema polimérico para liberação controlada de α -tocoferol através de um novo método de encapsulamento do fármaco. As nanomicelas desenvolvidas apresentaram tamanhos médios de partícula de 193,80nm (α -tocoferol 50mg/ml) e 714,53nm (α -tocoferol 200mg/ml) ($p < 0,05$); o potencial zeta para as duas concentrações foi +12,8mV. As nanomicelas carregadas com α -tocoferol não apresentaram citotoxicidade aguda ou crônica ($p > 0,05$), avaliadas pelos métodos MTT e clonogênico sobre células do epitélio bucal (NOE e HNK); não obstante, as nanomicelas carregadas com α -tocoferol apresentaram médias de proliferação celular superior às nanomicelas não carregadas e ao Trolox (análogo hidrossolúvel da Vitamina E). As nanomicelas carregadas com α -tocoferol apresentaram liberação mais lenta e controlada quando comparadas ao α -tocoferol não encapsulado. Portanto, o sistema de liberação controlada apresenta propriedades e bom potencial para usos em modelos biológicos, especialmente a formulação com α -tocoferol 50mg/ml.

Descritores: Mucosite Oral; Nanopartículas; Tocoferol; Antioxidante; Quitosana; Poloxâmero.

Linha de pesquisa: Inovação de produtos e terapêutica dos agravos em saúde.

ABSTRACT

Oral mucositis is a one of the most debilitating side effects among cancer patients, either induced by radiation or due to chemotherapy. Depending on the severity, the antineoplastic treatment interruption is required until regression of severe oral. Controlled-release delivery system for topical application of antioxidants has been suggested as a promising preventive approach. The present research developed a polymeric system for controlled-release of α -tocopherol through a new encapsulation method. Developed nanomicelles presented mean particle size of 193,80nm (for α -tocopherol concentration of 50mg/ml) and 714,53nm (200mg/ml) ($p < 0,05$); zeta potential was +12,8mV for both concentrations. α -tocopherol entrapped micelles did not present acute nor chronic cytotoxic effects ($p > 0,05$) and presented a higher cell proliferation rate - after evaluation through MTT and clonogenic assays, respectively – over NOE and HNK cells from buccal epithelium. α -tocopherol entrapped micelles exhibited a slower and controlled release pattern when compared to free α -tocopherol. Therefore, this system of controlled release presented a good potential for biologic application, specially 50mg/ml α -tocopherol.

Key-words: Oral mucositis; Nanoparticles; Tocopherol; Antioxidant; Chitosan; Poloxamer.

Research area: Product innovation and health disorder therapeutics.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3T3 – Linhagem de fibroblastos dérmicos

α Toc – α -tocoferol

C - Concentração

CH - Quitosana

COX-2 – Cicloxigenase 2

DLS – Dynamic Light Scattering – Espalhamento Dinâmico de Luz

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

EGF – Epithelial Growth Factor – Receptor do Fator de Crescimento Epitelial

EGFR – Epithelial Growth Factor Receptor – Receptor do Fator de Crescimento Epitelial

HaCaT – Queratinóticos Epidérmicos

HNK – Queratinócitos Imortalizados da Mucosa Bucal

HPV – Papilomavírus humano

I κ B – Inactive κ B – Fator Nuclear κ B Inativo

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil -2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NF- κ B – Nuclear Factor κ B – Fator Nuclear κ B

NO – Óxido nitroso

NOE - Queratinócitos não-malignos imortalizados com genes E6/E7 de HPV tipo 16

M/V – Massa/Volume

P407 – Poloxamer 407

PBS – Phosphate Buffered Saline – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PDGF – Platelet-Derived Growing Factor – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PDI – Índice de Polidispersividade

PEG – Polietileno Glicol

PEO – Poli (óxido de etileno)

PETA - Tetracrilato de eritritol

PPO – Poli (óxido de propileno)

ROS – Reactive Oxygen Species – Espécies Reativas de Oxigênio

RPM – Rotações por Minuto

STPP – Sodium Tripolyphosphate – Tripolifosfato de Sódio

TGF- β - Transforming Growth Factor Beta – Fator de Transformação do Crescimento Beta

TNF- α - Tumor Necrosis Factor Alpha – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UV-VIS – Ultravioleta-Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - α -tocoferol	17
Figura 2 - Copolímero Tribloco de Poloxamer	22
Figura 3 - Representação esquemática da micelização e mudança de fase do Poloxamer 407.	22
Figura 4 – Quitosana.....	24
Figura 5 - Curva de Calibração UV-VIS	32
Figura 6 - Fluxograma do desenvolvimento do sistema polimérico	35
Figura 7 - (A) Adição de P407 em solução aquosa e temperatura ambiente; (B) Solução de P407 após ciclos de agitação e refrigeração; (C) Solução de TOC50-P407 após ciclos de agitação e refrigeração.....	35
Figura 8 - Soluções TOC50-P407-CH (A) e TOC200-P407-CH (B)	35
Figura 9 - Nanomicelas liofilizadas. Da esquerda para a direita: P407-CH, TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH	36
Figura 10 - Tamanho médio das partículas (média e desvio padrão)	38
Figura 11 - Distribuição do tamanho de partículas em relação à intensidade de espalhamento de luz – TOC50-P407-CH.....	37
Figura 12 - Distribuição do tamanho de partículas em relação ao volume - TOC50-P407-CH.....	38
Figura 13 - Distribuição do tamanho de partículas em relação à intensidade de espalhamento de luz – TOC200-P407-CH.....	38
Figura 14 - Distribuição do tamanho de partículas em relação ao volume – TOC200-P407-CH.....	38
Figura 15 – Espectro FTIR	39
Figura 16 - Termograma obtido por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	40
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura. (a) P407-CH; (b) TOC50-P407-CH;	41
Figura 18 - Curva de liberação UV-VIS	42
Figura 19 - Proliferação de NOE pelo método MTT. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$	43
Figura 20 - Proliferação de HNK pelo método MTT. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$	43

Figura 21 - Proliferação de NOE pelo método Clonogênico.....	44
Figura 22 - Colônias celulares do ensaio Clonogênico. A: Controle; B: P407-CH (0,5µg/ml); C: P407-CH (5µg/ml); D: Trolox (0,125µg/ml); E: Trolox (1,25µg/ml); F: TOC-P407-CH (0,125µg/ml); G: TOC-P407-CH (1,25µg/ml).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações nas soluções finais	30
Tabela 2 - Picos de distribuição do tamanho das partículas	37
Tabela 3 - Tamanho médio das partículas (d_{DLS}), Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta	37
Tabela 4 - Análise de picos endotérmicos de entalpia (DSC)	40
Tabela 5 - Comparação entre grupos sobre proliferação de NOE. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	43
Tabela 6 - Comparação entre grupos sobre proliferação de HNK. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 TRATAMENTO DA MUCOSITE ORAL E α -TOCOFEROL	15
2.2 MICELAS DE POLOXAMER 407 E QUITOSANA.....	21
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 LOCAL DE TRABALHO.....	28
4.2 MATERIAIS UTILIZADOS	28
4.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA POLIMÉRICO	29
4.4 CARACTERIZAÇÃO.....	30
4.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	31
4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	32
4.6.1 Ensaio MTT.....	32
4.6.2 Ensaio Clonogênico.....	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
5.1 DESENVOLVIMENTO.....	34
5.2 CARACTERIZAÇÃO.....	36
5.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	41
5.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	42
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A mucosite constitui um efeito colateral significativo decorrente dos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos antineoplásicos, podendo acometer qualquer porção do trato gastrointestinal (1). Em torno de 40% dos pacientes apresentam manifestações bucais adversas, sendo que aproximadamente metade deles desenvolvem mucosite orais severas que requerem alteração no protocolo quimioterápico ou até mesmo sua suspensão temporária até a remissão do quadro (2,3). Em crianças, é considerada uma das complicações mais comuns e debilitantes, afetando aproximadamente 16 a 32% dos pacientes em tratamento quimioterápico (4).

A mucosite do trato gastrointestinal, incluindo a cavidade oral, está associada a uma maior demanda por recursos e serviços hospitalares. Não raramente, pacientes acometidos por essa complicação requerem um maior tempo hospitalar até remissão do quadro. Consequentemente, o custo hospitalar gerado pela mucosite representa um aumento considerável nos custos totais do tratamento oncológico (5).

A patogênese da mucosite está diretamente relacionada à mucotoxicidade de vários agentes antineoplásicos como metotrexato, doxorrubicina, busulfano, bleomicina, 5-fluorouracil, cisplatina, carboplatina, etoposídeo, inibidores do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) e inibidores seletivos de tirosina quinase (6).

Clinicamente, a mucosite oral (MO) induzida evolui de lesões eritematosas atróficas até o desenvolvimento de úlceras que atingem os lábios, língua, mucosa jugal, palato e gengiva – com maior susceptibilidade para regiões não ceratinizadas (7,8). A dificuldade em se alimentar em consequência da dor e da xerostomia potencialmente levam à um quadro de deficiência nutricional, com prejuízo ao estado geral do paciente (9). A perda da integridade da mucosa, particularmente em pacientes submetidos a terapias mieloablativas, representa ainda um risco significativo para desenvolvimento da bacteremia, fungemia e sepsis (10).

A utilização de agentes antioxidantes na neutralização das ROS no estágio inicial tem se mostrado bastante eficaz no controle da cadeia pró-apoptótica (11,12). Entretanto, na terapia antineoplásica, certos quimioterápicos atuam gerando radicais livres para causar danos celulares que culminam com a morte das células malignas. Obviamente, uma preocupação lógica é se a utilização sistêmica de compostos antioxidantes concomitantemente ao tratamento quimioterápico pode influenciar negativamente na terapia antineoplásica (13).

Após revisão sobre drogas experimentais direcionadas ao tratamento da MO, Sonis e Villa (2018) (12) concluíram que, levando-se em consideração o fato de que tanto a radiação como a quimioterapia impactam diretamente nas zônulas de oclusão (aumentando a permeabilidade epitelial), a utilização de agentes tópicos com um bom tempo de retenção na mucosa é uma estratégia bastante apropriada. Cabe ressaltar que a interação de substâncias lipofílicas, como a vitamina E, com as glicoproteínas e lipídeos do muco que recobre a superfície epitelial da mucosa oral pode ocasionar uma redução da absorção e biodisponibilidade da droga (14); o encapsulamento da droga pode mitigar essas características adversas.

A vitamina E compreende uma família de oito vitâmeros: quatro tocoferóis (α , β , δ e γ) e quatro tocotrienóis (α , β , δ e γ), sendo o α -tocoferol o mais comum e reconhecido por ser um potente antioxidante (15). Atualmente a Vitamina E é utilizada empiricamente na prevenção da mucosite induzida por quimioterapia devido ao seu potencial antioxidante. A aplicação tópica é realizada através bochechos da vitamina na sua forma oleosa, o que dificulta sua utilização em pacientes pediátricos com idades de até 03 anos de idade e predispõe à deglutição excessiva, gerando possíveis inconvenientes ao tratamento quimioterápico, conforme exposto acima.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver através de um novo método de síntese desenvolvido pelos autores, caracterizar e avaliar a citotoxicidade de um sistema polimérico de liberação controlada de α -tocoferol.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRATAMENTO DA MUCOSITE ORAL E α -TOCOFEROL

O modelo de desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterapia aceita atualmente envolve cinco estágios: iniciação, ativação e regulação positiva, amplificação, ulceração e reparo. A geração de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS) pelas mitocôndrias e os danos diretos ao DNA pelos agentes quimioterápicos marcam a fase da iniciação (16). Entretanto, os efeitos diretos são responsáveis apenas por uma pequena fração do dano tecidual; a ação indireta causada pelas ROS parece ser o principal responsável pela degeneração mucosa observada na fase ulcerativa (5).

A resposta imune inata e as ROS geradas na fase de iniciação causam danos celulares adicionais, estimulando macrófagos e ativando uma série de fatores de transcrição nuclear, dentre os quais se destaca o NF- κ B (I κ B plasmática fosforilada). A expressão gênica mediada pelo NF- κ B resulta na síntese de várias citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-6 e IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (3). Apesar do NF- κ B regular a expressão de citocinas pró-apoptóticas, como TNF- α e o ligante FAS, sua habilidade em inibir a apoptose parece ser mais acentuada do que seu papel potencial em promover a morte celular (17,18). De fato, o NF- κ B é essencial para a sobrevivência celular após exposição ao TNF- α ; a apoptose TNF- α -dependente é exacerbada em decorrência da inibição do NF- κ B (19–21).

Durante a fase da amplificação, o TNF- α ativado induz uma retroalimentação positiva sobre o NF- κ B, amplificando ainda mais a geração de citocinas pró-inflamatórias (16). A ativação da via extrínseca da apoptose pelo TNF- α na célula-alvo parece estar diretamente relacionado à ubiquilação do receptor-interativo serina/treonina-proteína quinase 1 (RIPK1): quando essa não se encontra ubiquilada, a sinalização para a ativação do NF- κ B é inibida, prevalecendo as vias pró-apoptose do TNF- α (22–24). Basicamente essas vias são a p38-MAPK e JNK e a cadeia apoptótica clássica via ativação da caspase (25,26).

Os três estágios iniciais levam à fase ulcerativa com a apoptose de células não diferenciadas na camada submucosa. No caso de epitélios estratificados – como o trato digestivo superior – a falta de renovação celular leva à atrofia e ulceração. Clinicamente, observa-se que lesões eritematosas atróficas surgem por volta do quarto dia após o início do tratamento quimioterápico como resultado de degenerações dessa camada submucosa. O colapso do tecido de sustentação epitelial leva ao surgimento de úlceras entre o sexto e décimo dia (16).

Após a interrupção ou término da terapia por agentes antineoplásicos, há uma progressiva transição do estado fenotípico dos macrófagos e neutrófilos para M2 e N2, respectivamente. Tal evento resulta num aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) assim como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) com subsequente deposição de nova matriz extracelular, reepitelização e angiogênese, característica da fase reparativa (27).

Devido à gravidade e a dificuldade na prevenção e tratamento da MO, diversos agentes terapêuticos vêm sendo testados ao longo das últimas décadas; entretanto ainda não há evidências científicas suficientes para o estabelecimento de um protocolo efetivo. As abordagens se dividem entre: (1) protocolos preventivos prévios ao início da terapia antineoplásica e que se estendem enquanto durarem a exposição ao fator de risco; (2) protocolos terapêuticos iniciados após o surgimento dos primeiros sinais e sintomas da MO; (3) protocolos para controle da dor relacionada aos estágios mais avançados da MO (28–31).

Os agentes terapêuticos para a prevenção ou tratamento da MO podem ser empregados de forma tópica ou sistêmica. Dentre os agentes sistêmicos, o Palifermin (Kepivance - Swedish Orphan iovitrum AB) estimula o crescimento epitelial além de inibir o potencial apoptótico somente em células que apresentam o receptor de crescimento queratinócitos (KGF). Lucchese *et al.*, (2016) (32) verificaram que nos pacientes portadores de tumores hematológicos que receberam Palifermin intravenoso (60 μ g/kg ao dia) iniciando três dias antes da quimioterapia, apresentaram 3 dias de duração mediana de MO grau III e IV; enquanto a mediana da duração no grupo controle (sem Palifermin) foi de 8 dias ($p < 0,001$). Entretanto, a segurança do Palifermin em tumores não-hematológicos permanece desconhecida

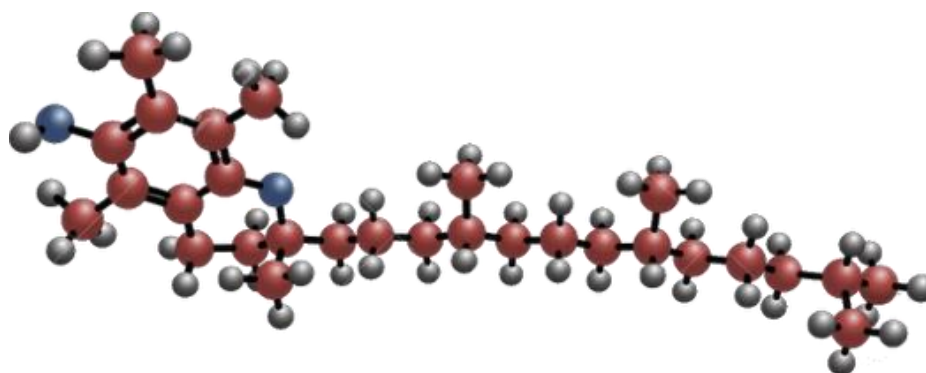
(33). Outra desvantagem é o custo do medicamento – estimado em \$8.500,00 dólares por paciente (34).

A amifostina é um agente antioxidante sistêmico derivado da pró-droga aminotiol fosforilado. Sua ativação decorre da fosforilação do aminotiol pela enzima fosfatase alcalina, presente em níveis elevados nos tecidos saudáveis, ao contrário das células tumorais. Apesar de sua seletividade na atuação em células saudáveis, seu uso é limitado pela sua elevada toxicidade e efeitos adversos como episódios eméticos e hipotensão arterial (27).

Uma miríade de agentes tópicos vêm sendo estudados nos últimos anos: eritropoietina (35), curcumina (36), mel de abelha (37), própolis (38,39), hialuronato de sódio (40), crioterapia (41), fotobiomodulação (42), rebamipida (43,44), umectantes (45), fator de crescimento epitelial (EGF) recombinante humano (46) e vitamina E (47).

Devido às suas características físico-químicas, particularmente a presença de um anel de cromanol, o α -tocoferol é considerado um potente antioxidante solúvel em lipídeos que possui a capacidade de evitar a propagação de radicais livres, particularmente radicais peroxil, prevenindo assim alterações em proteínas plasmáticas e das membranas celulares (48) (Figura 01).

Figura 1 - α -tocoferol



Fonte: Google Imagens

A ação antioxidante do α -tocoferol é baseada na alta estabilidade do radical α -tocoferil formado após a perda do hidrogênio fenólico. O radical recém-formado

pode se ligar a um radical livre ou ser reconvertido em α -tocoferol. O radical α -tocoferil é relativamente estável devido ao elétron não-pareado do átomo de oxigênio deslocado do anel aromático (49).

A neutralização das ROS pelo α -tocoferol repercute na inativação de várias vias pró-inflamatórias e pró-apoptóticas. A capacidade em bloquear a fosforilação da I κ B, precursora do NF- κ B ocasiona uma redução da apoptose TNF- α -dependente (50,51). Não obstante, a diminuição dos níveis de TNF- α atenua a liberação de IL-1 β , IL-8, COX-2 (52) e a capacidade de adesão leucocitária pelas células epiteliais (53). Estudos demonstram ainda a ação do α -tocoferol no bloqueio da fosforilação da proteína p38, impedindo assim a iniciação da via apoptótica p38-MAPK-JNK (54,55).

Além da ação indireta sobre citocinas pró-inflamatórias via bloqueio da ativação do NF- κ B, o α -tocoferol melhora a resposta imune tanto em modelos animais como em humanos, conferindo maior proteção contra diversas doenças infecciosas. As hipóteses levantadas para essas mudanças são: (1) redução dos níveis de prostaglandina E₂ pela inibição da atividade da COX-2 mediada pela redução da produção de óxido nítrico (NO); (2) aumento na efetividade de sinapses do sistema imune em células T nativas e iniciação de seus sinais de ativação; (3) modulação no balanço de células T Helper Th1/Th2 (56).

A vitamina E possui baixa toxicidade, não é mutagênica, carcinogênica ou teratogênica, apresentando poucos efeitos adversos em humanos, mesmo em dosagens de 3200mg/dia. A administração oral de vitamina E pode exacerbar problemas de coagulação relacionadas à deficiência de vitamina K causada por má-absorção ou terapia anticoagulante; entretanto, esse efeito não foi observado em indivíduos que não possuem deficiência da vitamina K (57).

Erhardt *et al.* (2002) (58) avaliaram o efeito da suplementação sistêmica via oral de α -tocoferol nos níveis plasmáticos e em células da mucosa bucal. Os pacientes receberam suplementação de α -tocoferol durante 7 dias (134,2mg/dia) e foram analisados após 7 e 14 dias. Os resultados mostraram um aumento nos níveis plasmáticos de α -tocoferol ao contrário das células mucosas, que permaneceram com níveis estáveis da vitamina.

Khurana *et al.* (2013) (59) realizaram um ensaio clínico randomizado em pacientes pediátricos submetidos à terapia quimioterápica para avaliar os efeitos da vitamina E e do Picnogenol sobre o desenvolvimento da MO. Concernente à vitamina E, os resultados do estudo mostraram que houve uma melhora significativa no grau da MO nos pacientes tratados em relação ao controle ($p < 0,001$). Uma vez que a metodologia previa que os pacientes mantivessem a solução na boca durante 30s com posterior deglutição, apesar dos efeitos benéficos desse antioxidante, não foi possível determinar se esse foi decorrente da ação tópica na mucosa ou sistêmica.

Chaitanya *et al.* (2017) (60) concluíram, por meio de uma revisão sistemática com meta-análise, que a utilização tópica da vitamina E gerou resultados mais positivos contra a MO em relação à sua utilização sistêmica. Ainda sobre o tema, El-Housseiny *et al.* (2007) concluíram que a aplicação tópica de 100mg de vitamina E, duas vezes ao dia, é uma medida efetiva no tratamento da MO, enquanto a administração sistêmica da mesma dose não apresentou a mesma eficácia.

Tanto a ação indireta, via atividade antioxidante, como a ação direta sobre a regulação imunológica vem estimulando a realização de pesquisas com resultados animadores da utilização do α -tocoferol sobre a regeneração tecidual e citoproteção em mucosa gástrica sob estresse alcoólico (62), mucosa bucal (63) e nasal (64), proteção e cicatrização da pele (65–68), regeneração pós miringotomia (69), prevenção de câncer e potencialização da terapia antineoplásica (70,71).

O α -tocoferol pode ser dispensado na sua forma livre, como um derivado (acetato de tocoferol), emulsão ou nanoencapsulado. A utilização de vitaminas encapsuladas em nanopartículas poliméricas permite que a liberação seja controlada, reduzindo a dose utilizada. A bioatividade e a estabilidade do α -tocoferol são protegidas pela cápsula e sua biodisponibilidade aumentada, fatores críticos particularmente em vitaminas lipofílicas (49).

Zigoneanu, Astete e Sabliov (2008) (72) encapsularam α -tocoferol em nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) – PLGA utilizando o método de evaporação de solvente com dodecil sulfato de sódio (SDS) ou poli(álcool vinílico) (PVA). Os autores observaram que o aumento na concentração de α -tocoferol ocasionou uma redução no tamanho médio das partículas, independente do

surfactante (71,2 a 53,6nm – SDS; 216,2 a 206,3nm – PVA). O potencial zeta variou positivamente à medida que a concentração de α -tocoferol nas partículas aumentou (-28,67 a -12,66mV). A cinemática de liberação no meio de PVA ocorreu em duas fases: pico de liberação inicial e liberação continuada. O aumento na concentração de α -tocoferol gerou uma diminuição tanto na intensidade do pico de liberação inicial (de 86% para 34% na primeira hora), como na liberação continuada (97% para 82% após 24h).

Luo *et al.* (2011) (73) desenvolveram nanopartículas de quitosana/zeína para a liberação controlada de α -tocoferol no trato gastrointestinal. Segundo os autores, comparado a outros sistemas de liberação, nano e micropartículas de quitosana apresentam mucoadesividade e capacidade de abertura transitória das junções intercelulares entre células epiteliais devido ao potencial elétrico de superfície positivo das partículas. Diferentes proporções de zeína, α -tocoferol e quitosana foram utilizadas. Os autores observaram que o tamanho médio das partículas aumentou (294 a 811nm, PDI 0,14 e 0,15, respectivamente) à medida que a concentração de α -tocoferol aumentou (10 a 30% de carregamento). No tocante ao potencial zeta, todas as nanopartículas desenvolvidas apresentaram valores positivos (22,8 a 40,9mV), à exceção da nanopartícula sintetizada sem quitosana (-2,8mV). A cinética de liberação em meio de PBS mostrou um processo em duas fases: uma rápida liberação durante os primeiros 90 minutos seguida de uma liberação lenta continuada. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de α -tocoferol potencializou as duas fases. Os autores concluíram ainda que interações eletrostáticas e hidrofóbicas, além da formação de pontes de hidrogênio foram as principais forças no complexo Zeína/Tocoferol/Quitosana.

Numa análise acerca da citoproteção provida pela vitamina E em fibroblastos gengivais humanos (HGF), Torshabi *et al.* (2017) (63) concluíram que o fármaco - na concentração de 5mM (2,15mg/ml) - reduziu de forma significativa a citotoxicidade da nicotina e seu metabólito cotimina em concentrações equivalentes à saliva de pacientes fumantes. Os resultados mostraram que a viabilidade de HGF em concentrações de 0,1 a 1mM de vitamina E não apresentaram diferenças em relação ao controle; concentrações de 5 a 10mM aumentaram a viabilidade celular de forma dose-dependente.

Caddeo *et al.* (2018) (74) encapsularam α -tocoferol em transferossomos de polissorbatos (Tween 20, 40, 60 e 80) para aplicação tópica na pele. As nanopartículas apresentaram tamanho médio de 85nm com boa homogeneidade ($PDI \leq 0,27$) e potencial zeta negativo ($\sim -80\text{mV}$). Os resultados mostraram ainda ausência de toxicidade em queratinócitos epidérmicos (HaCat) independente da concentração utilizada (0,1 – 20 $\mu\text{g/ml}$ α -tocoferol), enquanto houve redução na viabilidade celular em fibroblastos dérmicos (3T3) dose-dependente de aproximadamente 95% (0,1 $\mu\text{g/ml}$ α -tocoferol) a 75% (20 $\mu\text{g/ml}$ α -tocoferol). Os autores concluíram que o desenvolvimento de formulações vesiculares de α -tocoferol pode ser usado no controle do estresse oxidativo, acelerando a cicatrização.

Seguindo essa mesma linha de pesquisa, Bonferoni *et al.*, (2018) (75) desenvolveram nanoemulsões de α -tocoferol com oleato de quitosana para cicatrização de feridas. A nanoemulsão com concentrações finais de 0,33mg/ml de α -tocoferol, 0,35mg/ml de ácido oleico e 0,5mg/ml de quitosana apresentaram tamanho médio de partícula de 233nm e índice de polidispersividade de 0,24. Segundo os autores, o potencial zeta positivo de 56,8mV confirmou a cobertura de quitosana nas nanopartículas. A análise de citotoxicidade em fibroblastos dérmicos resultou em proliferação numa taxa de 150-195% de crescimento em relação ao controle (concentração de α -tocoferol entre 0,10 $\mu\text{g/ml}$ e 4,3 $\mu\text{g/ml}$); apesar da redução progressiva na proliferação celular, no intervalo de concentração entre 8,60 $\mu\text{g/ml}$ e 17,2 $\mu\text{g/ml}$ a taxa ficou próxima a 100%. Os autores concluem que nanoemulsões de oleato de quitosana carregadas com α -tocoferol apresentaram efeito proliferativo em fibroblastos e queratinócitos, sendo viável a utilização tópica visando a cicatrização de queimaduras.

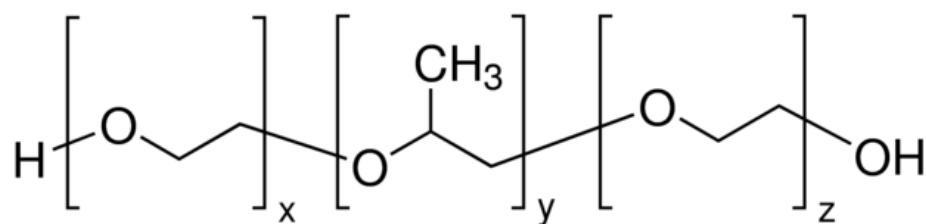
2.2 MICELAS DE POLOXAMER 407 E QUITOSANA

Poloxamer 407, também conhecido pela marca registrada Pluronic® F127 (BASF), é um classe de copolímeros tribloco A-B-A e B-A-B hidrossolúveis não-

iônicos, onde “A” corresponde ao poli(óxido de etileno) (PEO) e “B” ao poli(óxido de propileno) (PPO) (

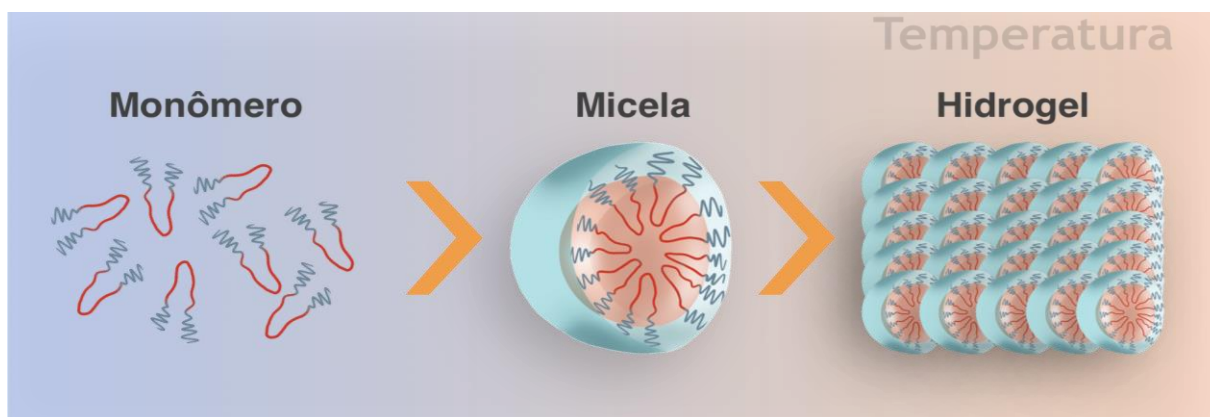
Figura 2). Em soluções aquosas, o poloxamer exibe características anfipáticas baseado na solubilidade em água do PEO e na lipossolubilidade do PPO (76). Apresenta gelificação térmica reversível, caracterizada por uma transição do estado sol-gel em determinada temperatura ($T_{\text{sol} \rightarrow \text{gel}}$): abaixo dessa temperatura, a solução permanece líquida; acima dela, apresenta um estado de gel (77). A temperatura $T_{\text{sol} \rightarrow \text{gel}}$ é concentração-dependente e aumenta à medida que a concentração de poloxamer 407 na solução diminui, até o ponto em que não há mais transição para o estado gel devido à baixa concentração do soluto (Figura 3).

Figura 2 - Copolímero Tribloco de Poloxamer



Fonte: Sigma Aldrich, Disponível em sigmaaldrich.com

Figura 3 - Representação esquemática da micelização e mudança de fase do Poloxamer 407.



Fonte: Autoria própria

Segundo Wanka, Hoffmann e Ulbricht (1994) (78), o processo de micelização do P407 em solução aquosa consiste em micelas com núcleos hidrofóbicos de PPO e uma coroa de PEO hidratado. Os autores identificaram que os blocos de PPO apresentam propriedades hidrofóbicas fracas; entretanto, o aumento da temperatura acentua suas características apolares, culminando num processo de gelificação devido à formação de uma fase cúbica. Verificaram ainda que a temperatura onde ocorre um pico endotérmico no DSC de soluções de P407 25% m/v indica a transição da fase de solução isotrópica para uma fase cúbica, corroborado pelas mensurações reológicas que indicam expressivos aumentos nos módulos de elasticidade e tensão de escoamento.

Barba *et al.* (2009) (79) analisaram a transição de fases do P407 por meio de DSC e identificaram temperaturas de gelificação de 17°C para C=22% e 18°C para C=20%. Fakhari, Corcoran e Schwarz (2017) verificaram que a temperatura de gelificação variou entre 18°C (concentração 18% m/v) e 28°C (concentração 12,6% m/v); não houve gelificação nas concentrações abaixo 12,6% até a temperatura de 34°C. Segundo os autores, a elevação da temperatura leva monômeros a se agregarem às micelas inicialmente formadas, aumentando o tamanho das mesmas; na temperatura onde ocorre a gelificação máxima da solução, o meio é composto basicamente de água, com todos os monômeros fazendo parte da micela. Para que ocorra a transição de fase, as micelas formadas devem ocupar, no mínimo, 52,3% do volume da solução.

A influência do P407 no encapsulamento de hidroclorotiazida no potencial zeta e tamanho da nanopartícula foi avaliado por Sultan *et al.* (2017) (81). Os autores verificaram que nanopartículas de P407 apresentaram potencial de -19,3mV, contra -59,5mV de PEG e -61,8mV nas micelas sem polímeros. O P407 apresentou tamanho médio de partícula de 28nm, enquanto o PEG 52,6nm e 119nm na ausência de polímeros. O ponto de fusão do P407 puro, determinado pelo DSC, foi 57,3°C.

Alexander *et al.* (2012) (82) avaliaram o efeito da temperatura e da adição de flurbiprofeno na micelização de poloxâmeros. A adição da droga hidrofóbica levou a um aumento na micelização do polímero e no tamanho do núcleo hidrofóbico de PPO, além de redução no volume de solvente no núcleo. Os autores concluíram que

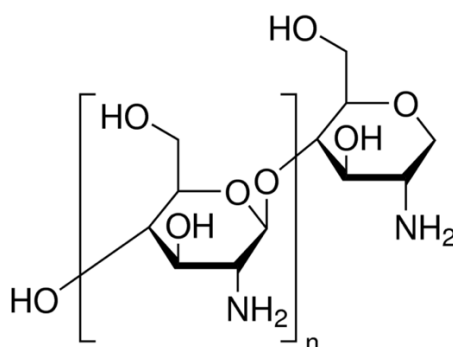
a incorporação de uma droga hidrofóbica favoreceu a formação de micelas de poloxâmeros.

Basak e Bandyopadhyay (2013) (83) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar os efeitos da hidrofobicidade, temperatura da solução e pH no encapsulamento de drogas hidrofóbicas com o P407. A incorporação das drogas foi realizada pela agitação ultrassônica de soluções aquosas em temperaturas entre 40 e 60°C. O tamanho médio das partículas variou entre 68-70nm, aferidos por meio de MEV. Os autores verificaram que o tamanho do núcleo hidrofóbico de PPO aumenta consideravelmente após a incorporação das drogas, o que se reflete numa redução da temperatura micelar crítica. A elevação da temperatura resultou num aumento da hidrofobicidade dos blocos de PPO, expulsando o solvente do núcleo e reduzindo o tamanho médio das partículas, resultando em micelas mais compactas.

Arranja *et al.* (2014) (84) avaliaram a citotoxicidade de micelas de P407 e P94 (Pluronic® P94) estabilizadas pelo agente de ligação cruzada PETA (tetracrilato de eritritol) através de ensaios de colorimetria por MTT em fibroblastos 3T3. Os resultados mostraram que micelas de P407 puro foram consideradas biocompatíveis na concentração máxima utilizada no estudo (0,5% m/v), com crescimento celular próximo a 100% do controle. A utilização de PETA não comprometeu a citotoxicidade do P407 e reduziu a toxicidade do P94.

A quitosana é um copolímero polissacarídico linear catiônico formado por uma distribuição aleatória dos monômeros N-acetil-d-glucosamina e D-glucosamina com um grupo amino (NH₂) e dois grupos hidroxila (OH) em cada unidade de repetição glicosídica (85) (Figura 4). A quitosana é tipicamente obtida por desacetilação da quitina, um abundante polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos. fonte de quitosana. Apresenta excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de propriedades hemostáticas, bacteriostática, antiolesterol, anticarcinogênico e fungistático (86).

Figura 4 – Quitosana



Fonte: Sigma Aldrich, Disponível em sigmaaldrich.com

Devido à sua natureza policatiónica, a quitosana possui mucoadesividade, que é definida como a capacidade de aderir ao muco carregado negativamente que reveste o epitélio gastrointestinal. Essa característica favorece um maior tempo de contato da droga com o epitélio, controlando sua liberação e prolongando seu tempo de ação sobre o tecido alvo (86). Apesar da atração eletrostática ser a principal responsável pelo fenômeno da mucoadesividade, esta é potencializada pela presença de pontes de hidrogênio e hidrofobicidade (87). A interação da quitosana com a membrana celular parece abrir as zônulas de oclusão, aumento, assim, a permeabilidade epitelial (88).

Pepić *et al.* (2010) (89) desenvolveram micelas de P407 com cobertura de quitosana para aplicação tópica ocular de dexametasona. A incorporação de dexametasona (1mg/ml) nas micelas foi realizada através da agitação suave por 24 horas em temperatura ambiente, método conhecido como dissolução direta. Três concentrações diferentes de quitosana foram utilizadas nas formulações: 0,005%, 0,01% e 0,015% m/v. Os tamanhos médios de partícula variaram entre 27,0nm (PDI = 0,517) na concentração de 0,005% a 28,9nm (PDI = 0,514) na concentração de 0,015%. Os potenciais zeta aferidos foram +9,3, +12,3 e +17,6mV, respectivamente. Segundo os autores, os resultados do tamanho de partícula e potencial zeta não foram influenciados pelo carregamento da dexametasona. Os resultados da curva de liberação da dexametasona mostrou uma liberação de aproximadamente 66% nas três primeiras horas para as três concentrações de quitosana utilizadas.

Seguindo uma linha de pesquisa semelhante, Kesavan *et al.* (2013) (90) desenvolveram microemulsões de dexametasona com cobertura de quitosana para

aplicação ocular tópica. O objetivo da cobertura com quitosana (concentração de 0,5% m/v, pH - 5) foi prover mucoadesividade à microemulsão, devido à interação iônica entre os grupos amino positivamente carregados e os resíduos de ácido siálico no muco com potencial negativo. Os resultados mostraram que o potencial zeta das microemulsões apresentaram carga de superfície que variou de +20,3mV a +26,4mV. Segundo os autores, a carga de superfície positiva pode ser atribuída à presença de quitosana na interface água/óleo, uma vez que os surfactantes usados na formulação (Tween 80 e propilenoglicol) são não-iônicos.

Singh *et al.*, (2017) (91) avaliaram o efeito do encapsulamento de Anfotericina B em diferentes concentrações nas propriedades físico-químicas de micelas de P407 com cobertura de quitosana. Os autores verificaram que a proporção de droga/p407 foi 1:20 (em massa), onde os resultados mostraram um tamanho médio de partícula de 98,2nm (PDI = 0,101) e potencial zeta de +11,25mV. Os autores analisaram ainda o efeito de diferentes concentrações de quitosana utilizada na cobertura das micelas e concluíram que a concentração de 0,1% m/v foi a mais apropriada, gerando partículas com tamanho médio de 139,23nm e potencial zeta de +11,0mV.

O desenvolvimento de um sistema polimérico mucoadesivo para liberação controlada de α -tocoferol em mucosa oral ainda não foi relatado na literatura. A proposta do presente trabalho consiste no desenvolvimento de uma solução de nanomicelas carregadas com α -tocoferol. A utilização das micelas de poloxamer 407 incrustadas com quitosana na sua coroa de PEO confere, além da mucoadesividade, uma liberação controlada do α -tocoferol no tecido alvo associada à facilidade de aplicação, como spray, por exemplo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema polimérico de liberação controlada de α -tocoferol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um sistema de liberação controlada de α -tocoferol baseado em nanomicelas de P407 com cobertura de quitosana (TOC-P407-CH);
- Caracterizar física e quimicamente as nanomicelas de TOC-P407-CH;
- Determinar a curva de liberação da TOC-P407-CH;
- Analisar a citotoxicidade das nanomicelas desenvolvidas mediante a proliferação celular de queratinócitos não-malignos da mucosa bucal espontaneamente imortalizados (HNK) e queratinócitos não-malignos imortalizados com genes E6/E7 de HPV tipo 16 (NOE) da mucosa bucal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE TRABALHO

O desenvolvimento do sistema polimérico e os ensaios de liberação controlada e de atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC) - Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

A caracterização físico-química foi realizada no Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB) da Universidade Federal da Paraíba e no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Lady Davies Institute of Cancer do Jewish General Hospital, na McGill University, Canadá.

4.2 MATERIAIS UTILIZADOS

Para o desenvolvimento do sistema polimérico, foram utilizados os seguintes materiais: Quitosana de baixo peso molecular (>75% de desacetilação, peso molecular 50-190 KDa), Tripolifosfato de Sódio (grau técnico 85%, peso molecular

367,86g/mol), Poloxamer 407 (pureza >99%, massa molar 12600g/mol, 30% PPO), Trolox (pureza 97%, peso molecular 250,29g/mol), brometo de 3-(4,5-dimetil -2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT – pureza >97,5%, peso molecular 414,32g/mol) – adquiridos na Sigma Aldrich (USA); meio de cultura Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) (10-101-CV) e solução de Penicilina-Estreptomicina (30-002-CI) foram adquiridos na Corning (USA); soro bovino fetal (080-150) foi adquirido na Wisent Bioproducts (USA); o meio de cultura de queratinócitos livre de soro (SFM) (GIBCO 17005075) foi adquirido na ThermoFischer Scientific (USA); α -tocoferol (pureza 99,3%, peso molecular 472,75g/mol) foi adquirido na Farmácia de Manipulação Dilecta (Brasil).

4.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA POLIMÉRICO

O desenvolvimento do sistema polimérico de liberação controlada envolveu três etapas: **1)** preparo de solução de fase isotrópica (monômeros dispersos) de P407 (92); **2)** carregamento de α -tocoferol e micelização do P407; **3)** cobertura das micelas com quitosana e estabilização através da gelificação iônica (90,93,94).

A solução de fase isotrópica foi obtida pela dissolução de 7,5g de P407 em 32ml de água deionizada sob agitação magnética (300rpm) por 10min e temperatura ambiente. A solução foi então refrigerada a 6°C por 10min e submetida a mais um ciclo de agitação magnética por 10min. Após 3 ciclos de refrigeração/agitação, a solução foi mantida em refrigeração a 6°C sem agitação durante 24 horas para permitir melhor solubilização do P407.

Após esse período, o α -tocoferol (2,5g para a solução TOC500-P407-CH e 10g para a solução TOC200-P407-CH) foi incorporado a 32ml da solução de P407 sob agitação magnética (600rpm) por 10min. A solução foi então refrigerada a -10°C por 10min e submetida a mais um ciclo de agitação magnética por 10min. O ciclo de refrigeração/agitação foi repetido por 3 vezes para permitir a máxima interação entre o α -tocoferol e os grupos PPO do P407 não micelizado. A solução foi mantida em temperatura ambiente para permitir a micelização espontânea do P407 carregado com α -tocoferol em seu núcleo hidrofóbico.

A etapa de cobertura das micelas de TOC50-P407 e TOC200-P407 foi iniciada pela solubilização de 40mg de quitosana em 40ml solução aquosa de ácido acético 1% v/v sob agitação magnética a 300rpm durante 24 horas; o pH das soluções variou entre 5,5 e 6,5. Após a fase de solubilização, 12ml dessa solução foi vertida em 32ml de solução TOC50-P407 e TOC200-P407, as quais foram mantidas sob agitação magnética a 300rpm por 20min em temperatura ambiente. Uma bomba de infusão foi utilizada para gotejar 6ml de solução tripolifosfato de sódio (1,5% m/v) 44ml das soluções TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH. O gotejamento foi realizado com uma seringa de 10ml e agulha 25mm x 0,7mm (Gauge 22G x 1”) numa taxa de 2ml/min (aproximadamente 3 gotas/segundo) e altura de 8cm. Os 50ml da solução resultante foram mantidos sob agitação constante de 300rpm por 60min.

Soluções de micelas de P407-CH não carregadas com α -tocoferol foram sintetizadas seguindo as mesmas etapas de desenvolvimento. As concentrações dos componentes na solução final estão descritas na

Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações nas soluções finais

	P407-CH		TOC50-P407-CH		TOC200-P407-CH	
	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%
α -tocoferol	0	0	50	5	200	20
Poloxamer 407	150	15	150	15	150	15
Quitosana	0,24	0,024	0,24	0,024	0,24	0,024
TPP	0,30	0,03	0,30	0,03	0,30	0,03

4.4 CARACTERIZAÇÃO

As análises do tamanho e índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas foram obtidas pelos métodos de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS) e mobilidade eletroforética associada à equação de Henry, respectivamente (Zetasizer Nano-ZS; Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram previamente diluídas com água destilada a 2,5% da

concentração inicial. A análise foi realizada a 25°C e a difração monitorada num ângulo de 90°. As análises foram realizadas em triplicata.

A calorimetria diferencial de varredura Differential Scanning Calorimetry – DSC) foi utilizada para análise do perfil calorimétrico. As mensurações foram realizadas no analisador térmico SHIMADZU DSC 60 Plus mediante aquecimento das amostras numa taxa de 10°C/min num espectro de -40°C a 70°C sob atmosfera dinâmica de ar e de nitrogênio, com vazão de gás da ordem de 50ml/min.

A caracterização estrutural foi confirmada pela espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier FTIR (IRPrestige-21, Shimadzu, Kyoto, Japão). Para obtenção de espectro na região infravermelho, amostras de aproximadamente 1,5mg foram trituradas juntamente com 150mg de brometo de potássio (KBR) para confecção das pastilhas. Todo o espectro foi obtido em modo de transmissão (64 varreduras) com resolução de 4cm⁻¹ e variação de frequência de 4000 a 400cm⁻¹.

A microscopia eletrônica de varredura (JSM-6610 – JEOL, Tóquio, Japão – tensão de aceleração de 25kV) foi utilizada para análise morfológica do sistema polimérico liofilizado. As amostras foram montadas em fitas condutivas de carbono.

4.5 ENSAIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

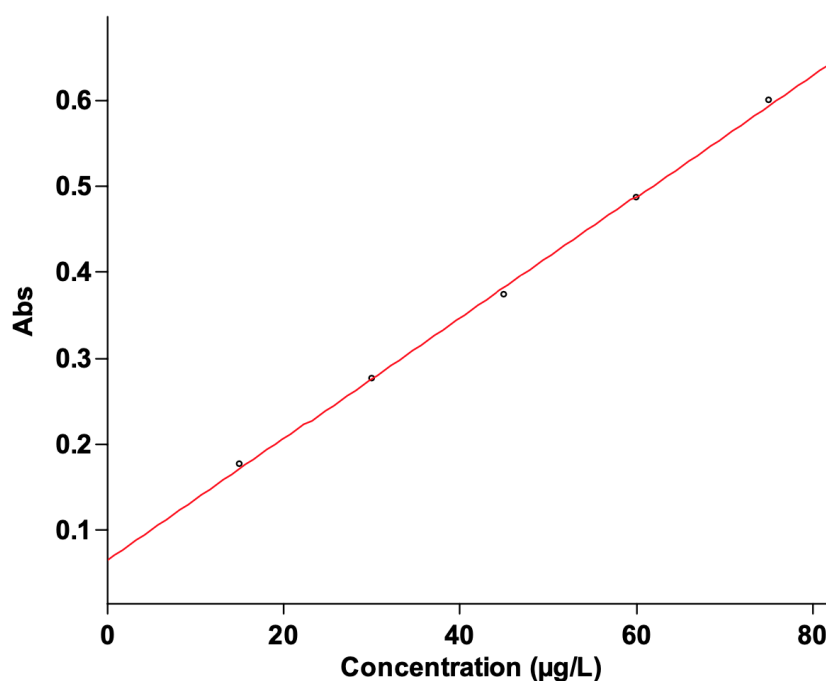
A análise da curva de liberação *in vitro* do α -tocoferol foi realizada por meio de espectrofotometria UV-VIS (500-200nm). Uma curva de calibração padrão foi obtida através da leitura da absorbância nas concentrações de 15, 30, 45, 60 e 75µg/ml de α -tocoferol a 290nm em cubeta de quartzo (coeficiente de correlação $r > 0,998$) (

Figura 5). As concentrações foram obtidas a partir da absorbância pela aplicação da fórmula:

$$C = (Abs - 0,06545) / 0,00704$$

Soluções de P407 (1mg/ml) em PBS foram utilizadas para determinar a absorbância na concentração 'zero' e para a preparação das soluções-padrão de α -tocoferol, conforme modelo proposto por Varga *et al.* (2019) (96).

Figura 5 - Curva de Calibração UV-VIS



As amostras de TOC-P407-CH foram colocadas no interior de uma membrana de celulose em 5ml de PBS-P407. A membrana foi imersa no meio de dissolução de 35ml de PBS e mantidas a 37°C. As absorbâncias de alíquotas de 1ml do meio de dissolução foram aferidas a intervalos não regulares durante 24 horas. As medidas foram realizadas em triplicata para cada concentração.

4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

4.6.1 Ensaio MTT

A citotoxicidade aguda do sistema polimérico desenvolvido foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular pela técnica do MTT, conforme metodologia proposta por Kumar *et al.* (2018) (97). Queratinócitos não-malignos da mucosa bucal espontaneamente imortalizados (HNK) e queratinócitos não-malignos imortalizados com genes E6/E7 de HPV tipo 16 (NOE) foram cultivadas em meio Keratinocyte-SFM suplementado com L-glutamina e extrato pituitário bovino. As células foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂.

Placas de 96 poços foram preenchidas com 5x10³ células por poço e tratadas com diferentes concentrações de TOC-P407-CH, P407-CH e Trolox (análogo hidrossolúvel do α -tocoferol) por 24, 48 e 72 horas. O meio de cultura celular foi aspirado e 100µl de solução MTT foram adicionados. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C protegidas da luz e os cristais roxos de formazana foram dissolvidos em 100µl de DMSO por 5 minutos num agitador orbital. A coloração final foi quantificada pela aferição da absorbância no leitor de microplaca FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 560nm com subtração da leitura em 790nm.

4.6.2 Ensaio Clonogênico

Os efeitos crônicos do sistema polimérico no crescimento de células tumorais foram avaliados pelo ensaio de formação de colônia (clonogênico), de acordo com metodologia proposta por Selvaag *et al.* (2002) (98). Células da linhagem NOE foram incubadas numa placa de 6 poços (1000 células/poço) por 6 horas e tratadas com TOC-P407-CH, P407-CH e Trolox nas concentrações 0,125µg/ml e 1,25µg/ml de α -tocoferol (0,5 e 5µg/ml das micelas não carregadas) durante 15 dias. Após lavagem com PBS, as amostras foram coradas com cristal de violeta 0,05% m/v e formaldeído 4% v/v. Colônias com diâmetro maior que 50nm foram quantificadas por meio de um contador de colônias (Oxford Optronix Gelcount, Reino Unido).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8.3.0 para Mac OS X (San Diego, Califórnia, USA. número de série: GPS-1637073-T) Os resultados do tamanho de partícula foram analisados comparados por meio do teste T não-pareado para amostras heterogêneas (G1: TOC50-P407-CH e G2: TOC200-P407-CH); o nível de significância do teste foi de 5%. A normalidade dos dados foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk. O índice de polidispersividade e potencial zeta foram analisados descritivamente baseado nas médias e desvios-padrão.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade (MTT) foram analisados por ANOVA de um fator, seguido do teste de Tukey para múltipla comparação entre grupos (post-hoc). Posteriormente foram realizadas análises por meio de teste T não-pareado para comparação entre as diferentes concentrações intergrupos. O nível de significância dos testes foi de 5% (G1: TOC-P407-CH; G2: Trolox; G3: P407-CH e G4: Controle). Os dados do ensaio clonogênico foram tratados estatisticamente por meio do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguidos do teste de Dunn para múltipla comparação entre grupos (post-hoc), com nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi verificada por meio dos testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

Os dados referentes ao FTIR, DSC e microscopia eletrônica de varredura não são aplicáveis para o tratamento estatístico.

5. RESULTADOS

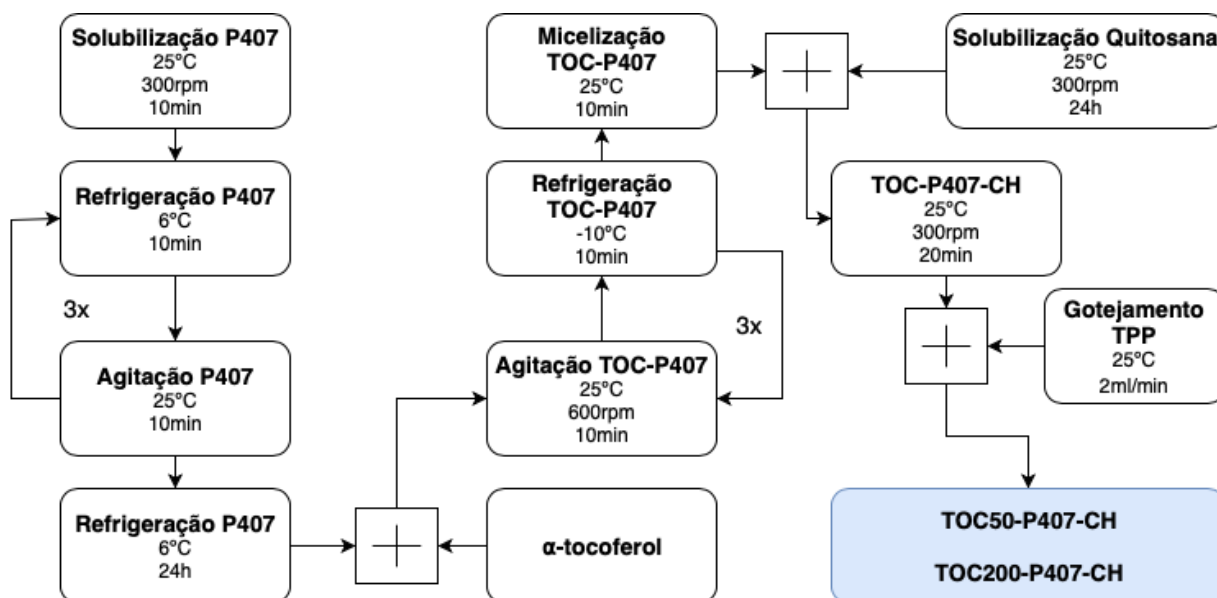
5.1 DESENVOLVIMENTO

*O desenvolvimento de nanomicelas de α -tocoferol seguiu uma metodologia desenvolvida pelos autores baseada na micelização termossensível do P407 (**Figura 6**). Acima da CMC e da TMC, o P407 apresenta micelização espontânea, com um núcleo hidrofóbico de PPO e coroa hidrofílica de PEO. A encapsulação de α -*

tocoferol por meio de ciclos alternados de agitação e refrigeração permitiu gerar soluções de nanomicelas sem uma fase de α -tocoferol não encapsulado visível, mesmo numa concentração elevada de 50mg/ml (

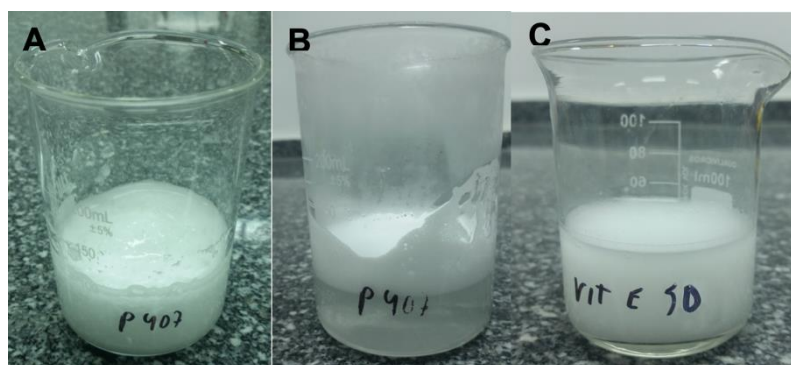
Figura 7 e Figura 8).

Figura 6 - Fluxograma do desenvolvimento do sistema polimérico



Fonte: Autoria própria

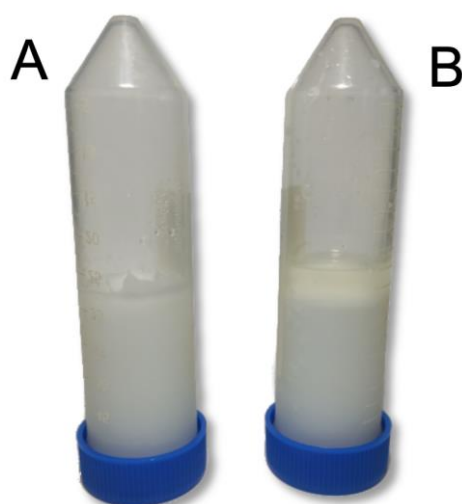
Figura 7 - (A) Adição de P407 em solução aquosa e temperatura ambiente; (B) Solução de P407 após



ciclos de agitação e refrigeração; (C) Solução de TOC50-P407 após ciclos de agitação e refrigeração.

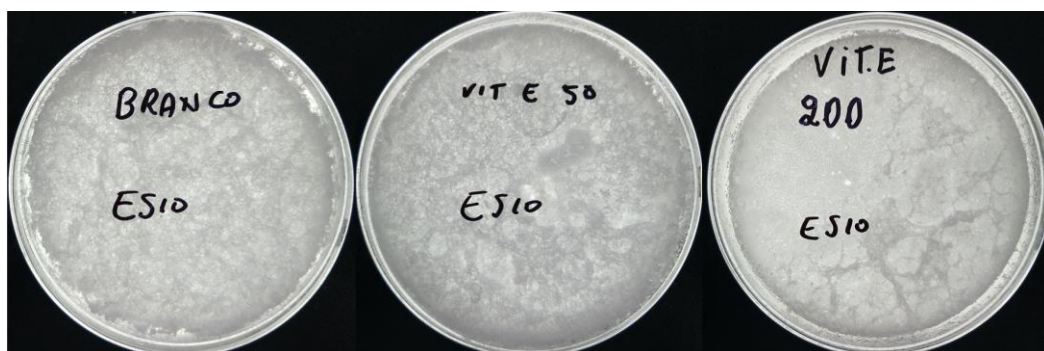
Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Soluções TOC50-P407-CH (A) e TOC200-P407-CH (B)



Fonte: Autoria própria

Figura 9 - Nanomicelas liofilizadas. Da esquerda para a direita: P407-CH, TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH



Fonte: Autoria própria

5.2 CARACTERIZAÇÃO

As soluções TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH foram submetidas ao método de espalhamento de luz dinâmico para determinação da distribuição e do tamanho das partículas. O tamanho médio das soluções de TOC50-P407-CH foi de 193,80nm (Tabela 3) com picos de volume em 50,75 e 531,20nm (Tabela 2 e

Figura 11); as soluções de TOC200-P407-CH apresentaram tamanho médio de 714,53nm (Tabela 3) e picos de volume em 58,77 e 3091nm (Tabela 2 e

Figura 13). A diferença entre os tamanhos de partícula foi estatisticamente significativa ($p=0,0018$; diferença entre as médias $520,7 \pm 70,11\text{nm}$; IC = 326,1 / 715,4; $\eta^2= 0,9324$) (Figura 14).

O potencial zeta aferido por meio de mobilidade eletroforética associada à equação de Henry, foi de +12,8mV, tanto para a TOC50-P407-CH como TOC200-P407-CH.

Tabela 2 - Picos de distribuição do tamanho das partículas

Solução		Pico 01	Pico 02
TOC50-P407-CH	Tamanho de partícula (nm)	91,28	458,7
	Intensidade (%)	8,6	4,9
	Tamanho de partícula (nm)	50,75	531,2
	Volume (%)	15,3	0,9
TOC200-P407-CH	Tamanho de partícula (nm)	68,06	1990
	Intensidade (%)	2,1	9,1
	Tamanho de partícula (nm)	58,77	3091
	Volume (%)	4,9	9,0

Tabela 3 - Tamanho médio das partículas (d_{DLS}), Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta

Solução	$d_{\text{DLS}} \pm \text{DP}$ (nm)	PDI $\pm$ DP	Potencial Zeta (mV)
TOC50-P407-CH	$193,80 \pm 51,03$	$0,502 \pm 0,068$	+12,8
TOC200-P407-CH	$714,53 \pm 110,18$	$0,886 \pm 0,196$	+12,8

Figura 10 - Distribuição do tamanho de partículas em relação à intensidade de espalhamento de luz – TOC50-P407-CH

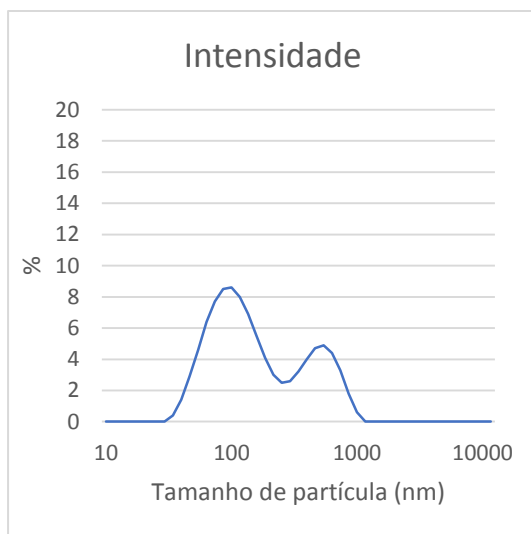


Figura 11 - Distribuição do tamanho de partículas em relação ao volume - TOC50-P407-CH

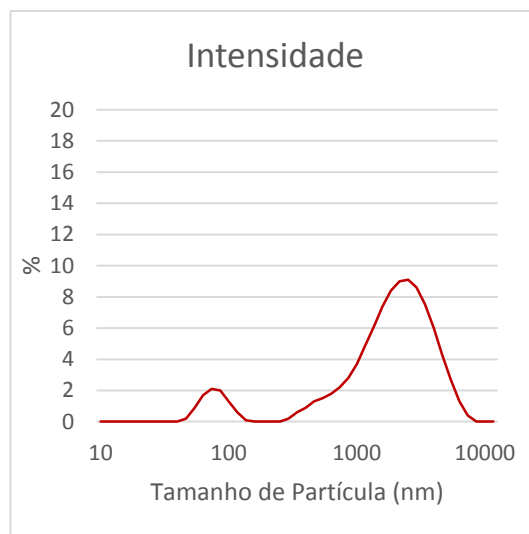


Figura 13 - Distribuição do tamanho de partículas em relação ao volume - TOC200-P407-CH

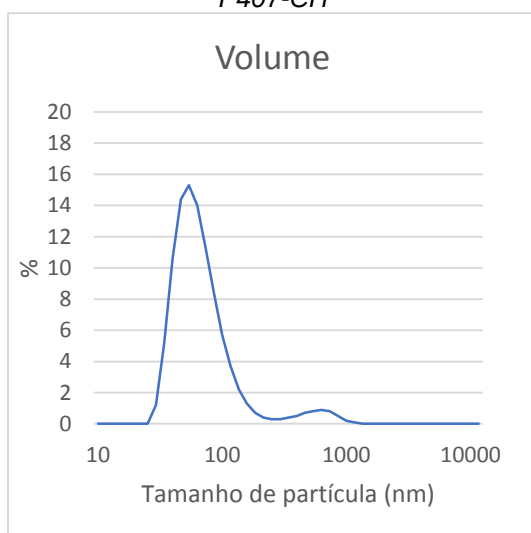


Figura 12 - Distribuição do tamanho de partículas em relação à intensidade de espalhamento de luz - TOC200-P407-CH

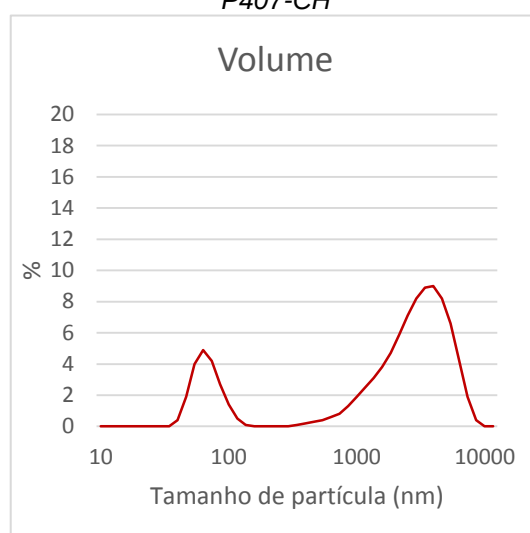


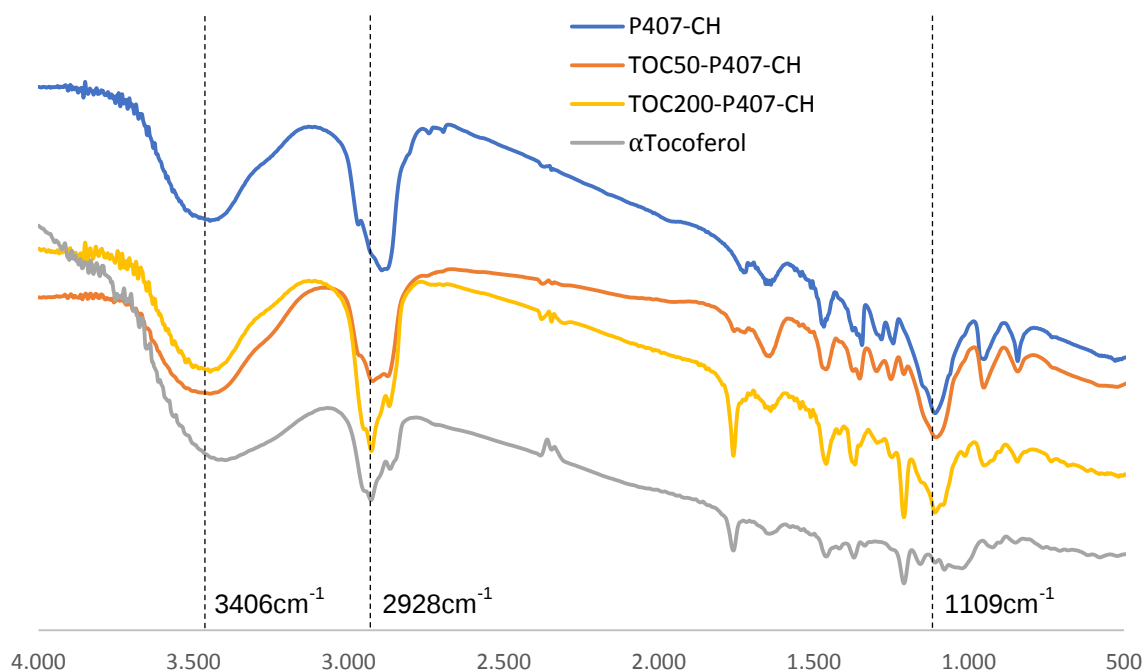
Figura 14 - Tamanho médio das partículas (média e desvio padrão)

A análise dos espectros FTIR do α -tocoferol puro evidencia duas regiões: a primeira (principalmente estiramentos simétricos e assimétricos) compreende uma banda em 3406cm^{-1} referente à ligação O-H do cromanol e um intervalo entre 3100 e 2700cm^{-1} que representa a sobreposição de bandas intensas referente aos hidrogênios das metilas ligadas ao anel aromático e heteroanel na cabeça e deformações assimétricas dos hidrogênios nas extremidades da cadeia caudal. Na segunda região, destacam-se as bandas em torno de 1649cm^{-1} e 1467cm^{-1} que caracterizam torção do anel benzênico.

O espectro FTIR do P407-CH, apresenta picos de transmitância em 2868cm^{-1} referente aos radicais metila dos grupos PPO, 3433cm^{-1} ligados aos radicais O-H dos grupos PEO e 1109cm^{-1} das ligações éter C-O-C comum aos dois grupos.

Nos espectros do TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH, os picos de transmitância coincidem com os picos do α -tocoferol puro e do P407, em diferentes intensidades (Figura 15).

Figura 15 – Espectro FTIR



Por meio da Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), As nanopartículas P407-CH, TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH apresentaram picos endotérmicos nas temperaturas de 53,8°C, 52,3°C e 50,0°C (Figura 16 e

Tabela 4).

Figura 16 - Termograma obtido por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

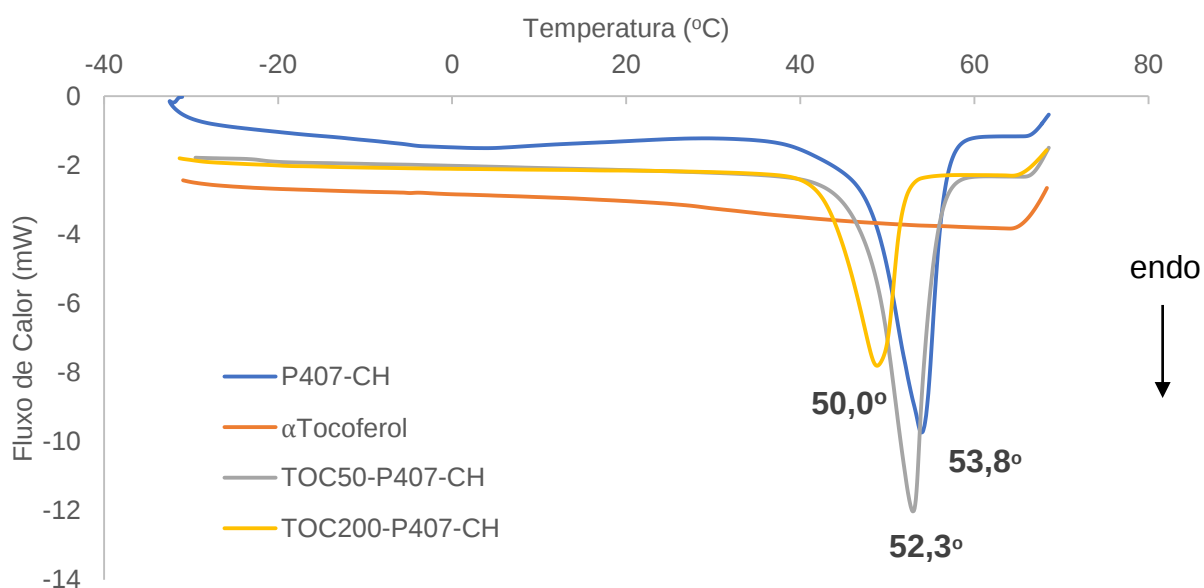


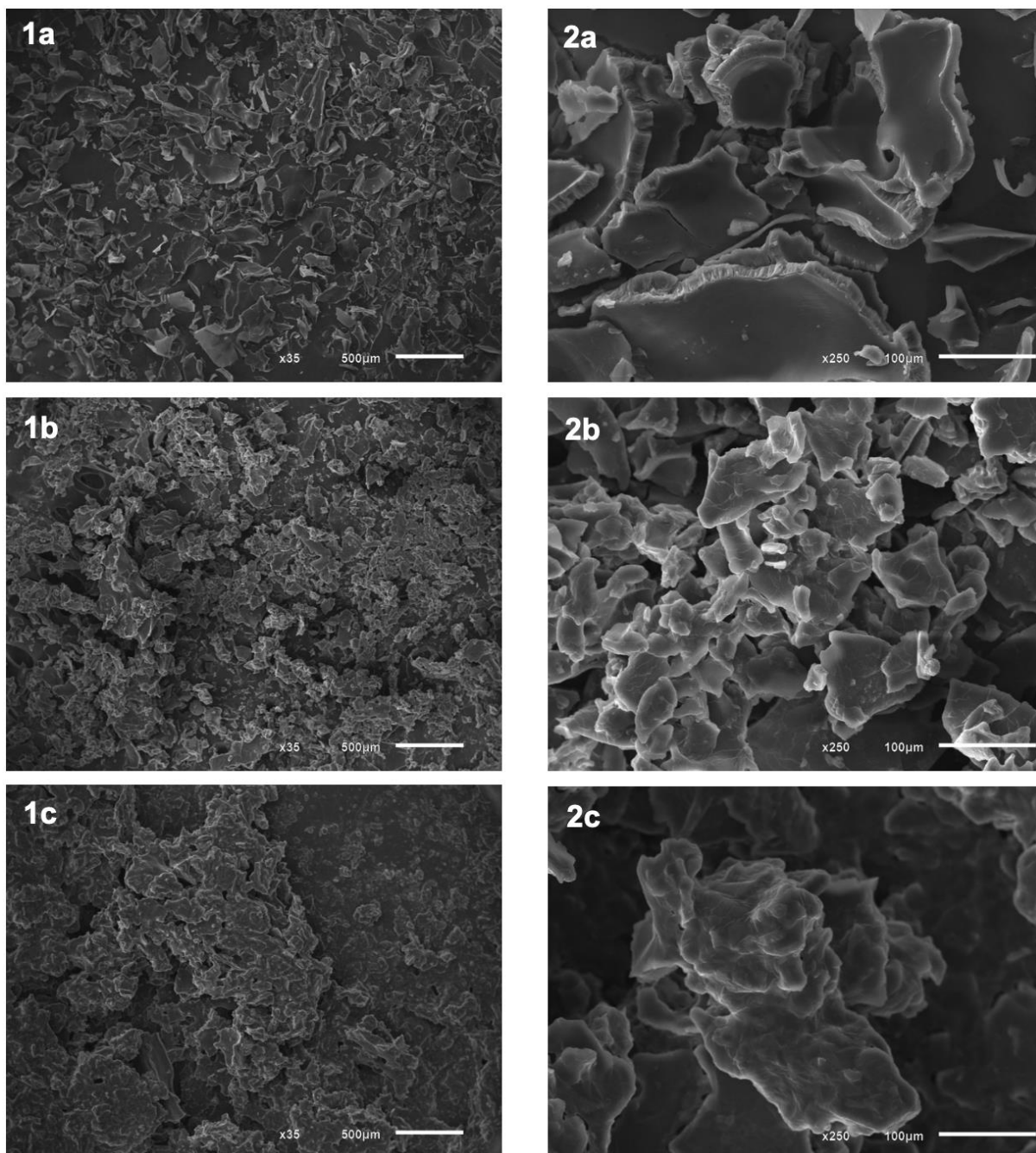
Tabela 4 - Análise de picos endotérmicos de entalpia (DSC)

Amostra	Temperatura (°C)		
	Onset	Pico	Endset
P407-CH	43,0	53,8	57,8
TOC50-P407-CH	46,4	52,3	56,3
TOC200-P407-CH	41,6	50,0	55,6

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a análise morfológica das nanomicelas liofilizadas. As partículas de P407-CH apresentaram superfícies lisas, sem poros ou irregularidades. Tanto as partículas de TOC50-P407-CH como

de P200-P407-CH apresentaram tamanhos de partícula compatíveis com os resultados do DLS e rugosidade superficial não identificada nas partículas P407-CH.

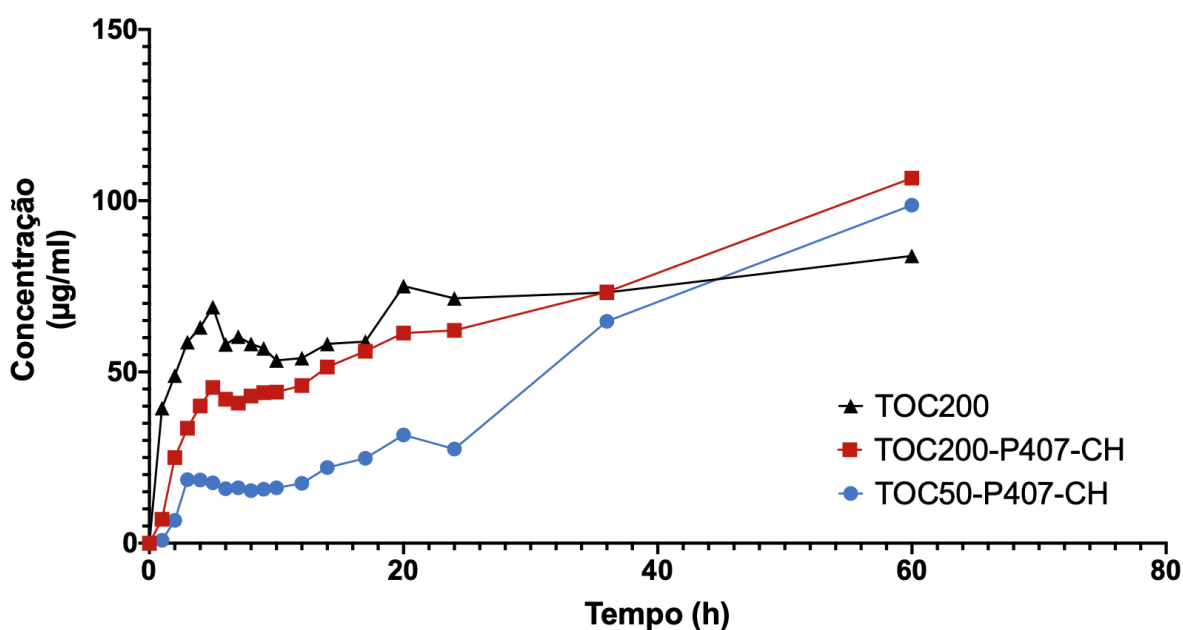
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura. (a) P407-CH; (b) TOC50-P407-CH; (c) TOC200-P407-CH evidenciando formato micelar não esférico nos grupos com carregamento da do α -tocoferol.



5.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Os resultados do ensaio de liberação controlada pelo método UV-VIS identificaram os padrões de liberação do α -tocoferol puro, TOC50-P407-CH e TOC200-P407-CH. O α -tocoferol puro apresentou uma cinemática de liberação em duas fases: um pico de liberação inicial seguido por uma liberação continuada; aproximadamente 82% da liberação foi obtida após as primeiras 05 horas. A TOC200-P407-CH apresentou a mesma cinemática de liberação, entretanto com um menor percentual de liberação na fase inicial (42% nas primeiras 05 horas). A TOC50-P407-CH não apresentou cinemática de liberação em duas fases; houve liberação do α -tocoferol de forma contínua ao longo do período analisado. A liberação nas primeiras 05 horas correspondeu a 18% (Figura 18)

Figura 18 - Curva de liberação UV-VIS



5.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Da análise estatística ANOVA de um fator do ensaio de citotoxicidade com base na atividade metabólica celular evidenciada pela técnica MTT, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1, G2 e G3 e o grupo controle, tanto para células NOE ($p < 0,001$; $F = 27,21$) como HNK ($p < 0,001$; $F = 21,65$) nas concentrações estudadas (400 a

6,25µg/ml). O teste post-hoc para múltiplas comparações de Tuckey identificou diferença significativa apenas entre G3 e o controle ($p < 0,001$; magnitude de efeito = 14,82; CI 95% 8,41/21,22). Na comparação entre pares de grupos por meio de testes t não-pareados, (G1-G2, G1-G3 e G2-G3), houve diferença significativa em concentrações variadas, tanto em células NOE como NHK, conforme Tabela 5 e Tabela 6.

Figura 19 - Proliferação de NOE pelo método MTT. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

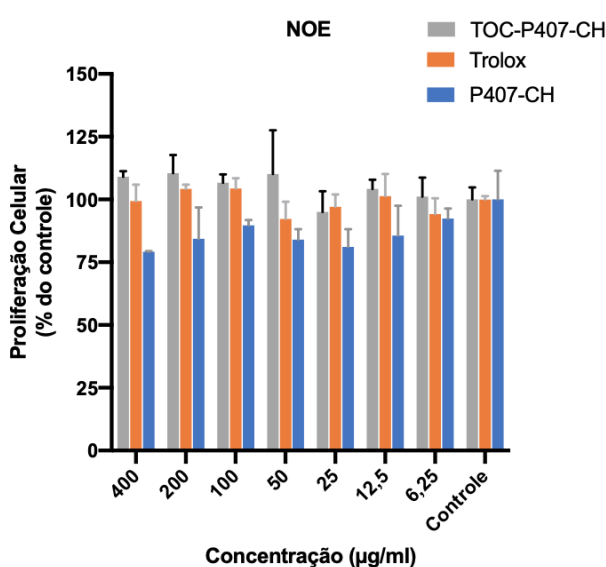


Figura 20 - Proliferação de HNK pelo método MTT. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

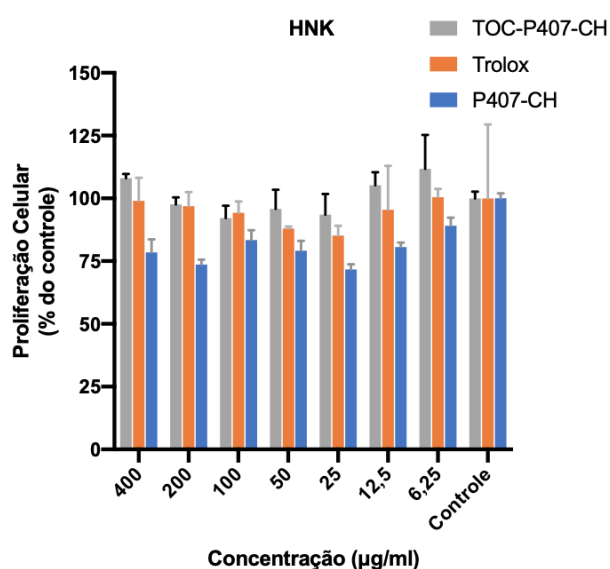


Tabela 5 - Comparação entre grupos sobre proliferação de NOE. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Concentração (µg/ml)	TOC-P407-CH (% do controle)	Trolox (% do controle)	P407-CH (% do controle)
400	109,0 ^a	99,35 ^a	79,16 ^b
200	110,5 ^a	104,2 ^a	84,33 ^b
100	106,6 ^a	104,4 ^a	89,66 ^b
50	110,2 ^a	92,25 ^b	84,01 ^b
25	94,99 ^{ab}	97,09 ^a	81,10 ^b
12,5	104,2 ^a	101,3 ^a	85,62 ^b
6,25	101,1 ^a	94,18 ^a	91,41 ^a

Tabela 6 - Comparação entre grupos sobre proliferação de HNK. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	TOC-P407-CH (% do controle)	Trolox (% do controle)	P407-CH (% do controle)
400	108,0 ^a	99,02 ^a	78,5 ^b
200	97,56 ^a	96,91 ^a	73,62 ^b
100	92,18 ^a	94,30 ^a	83,39 ^a
50	95,77 ^a	87,95 ^{ab}	79,15 ^b
25	93,49 ^a	85,18 ^{ab}	71,66 ^b
12,5	105,2 ^a	95,44 ^a	80,62 ^b
6,25	111,7 ^a	100,5 ^{ab}	89,09 ^b

O teste de Kruskal-Wallis para comparação entre grupos da proliferação celular em NOE tumorais (clonogênico) evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, $\chi^2 = 9,199$). A análise individual intergrupos, o teste de Dunn (post-hoc) não identificou diferenças significantes na comparação entre os grupos para uma mesma concentração. Os resultados estão apresentados na Figura 21 e Figura 22.

Figura 21 - Proliferação de NOE pelo método Clonogênico.

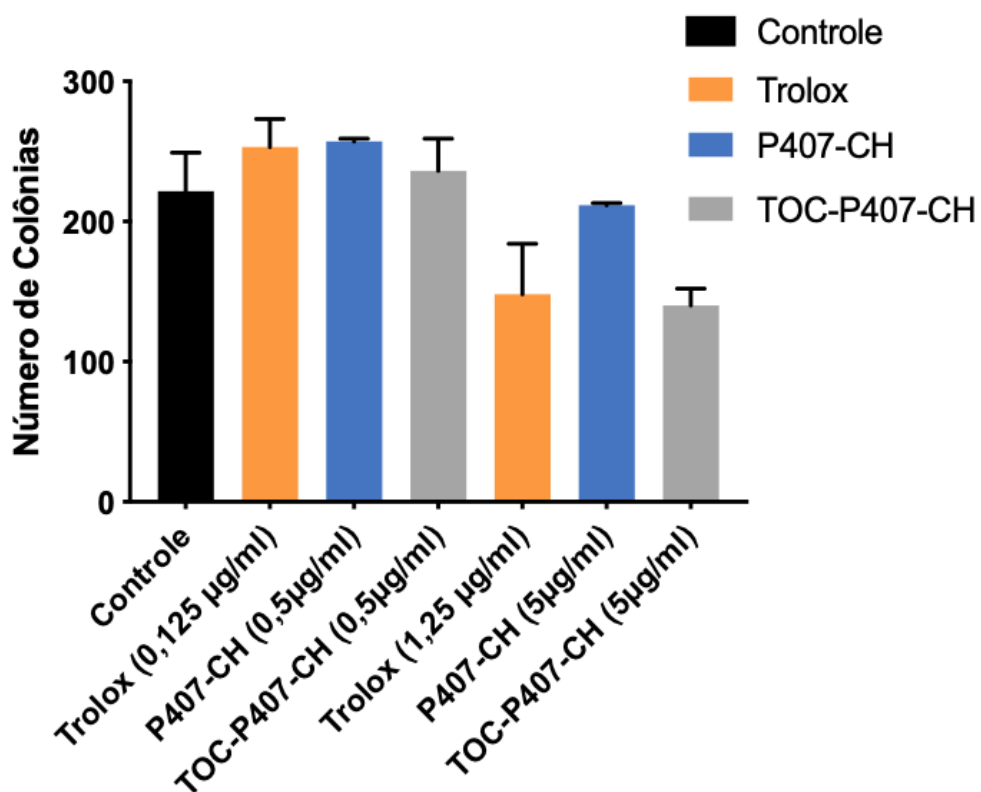
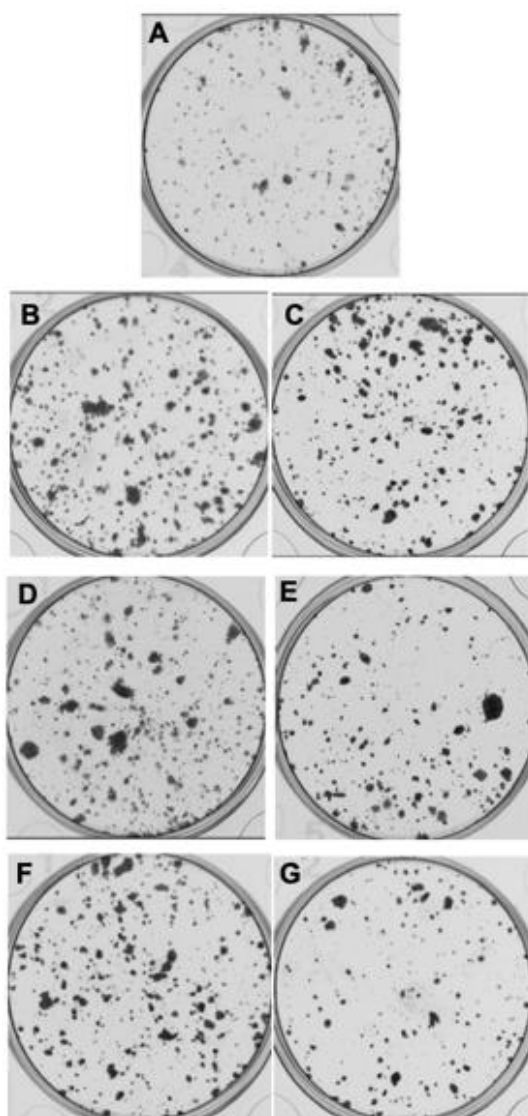


Figura 22 - Colônias celulares do ensaio Clonogênico. A: Controle; B: P407-CH (0,5µg/ml); C: P407-CH (5µg/ml); D: Trolox (0,125µg/ml); E: Trolox (1,25µg/ml); F: TOC-P407-CH (0,125µg/ml); G: TOC-P407-CH (1,25µg/ml)



6. DISCUSSÃO

A utilização de agentes antioxidantes tópicos, particularmente o α -tocoferol, parece ser uma das estratégias promissoras na prevenção da mucosite oral induzida por quimioterápicos. Entretanto, a aplicação direta sobre a mucosa ocasiona a deglutição de uma grande quantidade da vitamina devido à ausência de mucoadesividade, gerando uma possível – e indesejada – proteção contra o estresse oxidativo em células neoplásicas.

A metodologia empregada neste trabalho permitiu o desenvolvimento de nanomicelas de poloxamer 407 com quitosana aderida à coroa hidrofílica de PEO e carregadas com α -tocoferol no núcleo hidrofóbico de PPO. A incorporação do α -tocoferol foi realizada por uma técnica ainda não relatada na literatura: o α -tocoferol foi associado ao PPO dos monômeros de P407 refrigerado; a posterior elevação da temperatura permitiu a micelização com a droga já incorporada ao núcleo hidrofóbico. As concentrações de α -tocoferol encapsuladas no estudo basearam-se nas concentrações utilizadas topicamente na forma não encapsulada (47,60,61), levando em consideração ainda a baixa toxicidade do α -tocoferol (57).

Os resultados evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre o tamanho médio das nanomicelas TOC50-P407-CH (193,80nm) e TOC200-P407-CH (714,53nm). O resultado está de acordo com Alexander *et al.* (2012), que verificaram que a adição de uma droga hidrofóbica gerou um aumento do núcleo de PPO. A literatura aponta para uma ampla variação nos tamanhos médios de micelas de P407: 27 a 29nm (81,89), 68 a 70nm (83), 98,2 a 139,23nm (91); provavelmente a grande variação nos tamanhos médios de partícula está relacionada à concentração da droga hidrofóbica utilizada no estudo, o que impactou diretamente no tamanho do núcleo hidrofóbico.

A mucoadesividade de fármacos baseia-se principalmente na interação eletrostática entre partículas de carga negativa do muco e carga positiva nas partículas (quantificado por meio do potencial zeta). Vários polímeros vêm sendo testados para o encapsulamento do α -tocoferol: PLGA (72), quitosana/zeína (73), propilenoglicol (90), polissorbato (74) e oleato de quitosana (75). Na grande maioria dos estudos (à exceção daqueles onde a quitosana foi utilizada), o potencial zeta resultante foi negativo (variação de -80mV a -2,8mV), o que torna os sistemas poliméricos desenvolvidos incompatíveis com a mucoadesividade. Apesar do P407

apresentar inúmeras vantagens na micelização de moléculas hidrofóbicas, o seu caráter não-iônico também não contribui para a mucoadesividade. Sultan *et al.*, (2017) desenvolveram nanomicelas de P407 carregadas com hidroclorotiazida e obtiveram um potencial zeta de -19,3mV.

Para obter um potencial zeta positivo, o presente estudo incorporou a quitosana na coroa de PEO das nanomicelas, comprovado pelo potencial positivo de +12,8mV tanto na TOC50-P407-CH como na TOC200-P407-CH. O resultado corrobora os achados de Pepić *et al.* (2010), que verificaram que o potencial zeta aumenta de acordo com o aumento da concentração da quitosana utilizada. A obtenção de potencial zeta positivo após a incorporação de quitosana também foi um achado nos estudos de Luo *et al.* (2011) (+22,8 a +40,9mV), Kesavan *et al.* (2013) (+20,3 a +26,4mV), Singh *et al.* (2017) (+4,72 a +14,07mV) e Bonferoni *et al.* (2018) (+56,8mV).

A análise dos espectros FTIR (Figura 15) identificou o pico característico em 3406cm^{-1} referente ao radical O-H. A identificação do pico no espectro de todos os grupos (P407-CH; TOC50-P407-CH; TOC200-P407-CH e α -tocoferol) permitiu inferir que não houve reação envolvendo os radicais. A preservação dos radicais hidroxila favorece a mucoadesividade pela formação de pontes de hidrogênio entre as micelas e o muco (87). Observa-se ainda grande semelhança entre o espectro das nanomicelas não-carregadas P407-CH e a TOC50-P407-CH; a TOC200-P407-CH apresenta um espectro que se aproximou do α -tocoferol, sugerindo uma saturação das micelas com presença de grande quantidade de fármaco não encapsulado.

O processo de transição de fase de solução isotrópica para a fase cúbica envolve o crescimento das micelas até que as mesmas ocupem, no mínimo, 52,3% do volume da solução. A elevação da temperatura leva a um aumento da hidrofobicidade dos grupos PPO, ocasionando um progressivo aumento no tamanho das micelas (79). Como discutido anteriormente, a incorporação de drogas lipofílicas gera, por si só, um aumento no tamanho médio das micelas, o que foi comprovado pelos resultados deste estudo. Wanka, Hoffmann e Ulbricht (1994) verificaram que a temperatura onde ocorre um pico endotérmico no DSC de soluções P407 25% m/v corresponde à transição da fase de solução isotrópica para uma fase cúbica, corroborado pelas mensurações reológicas que indicam expressivos aumentos nos

módulos de elasticidade e tensão de escoamento. Uma vez que a incorporação de compostos hidrofóbicos aumenta o tamanho médio das micelas, teoricamente, nanomicelas carregadas com α -tocoferol deveriam apresentar picos de DSC em temperaturas mais baixas que os picos das micelas não carregadas. No presente estudo, as nanomicelas não carregadas apresentaram um pico endotérmico de DSC na temperatura de 53,8°C, enquanto a TOC50-P407-CH em 52,3°C e a TOC200-P407-CH em 50,0°C, corroborando os achados da literatura referenciada.

A análise morfológica das amostras por meio da microscopia eletrônica de varredura não identificou micelas no formato esférico. Tal fato decorre de uma limitação metodológica do experimento: o processo de liofilização é feito a partir do resfriamento das amostras até o seu congelamento e posterior desidratação. Conforme descrito anteriormente, o resfriamento até uma temperatura abaixo da temperatura micelar crítica causa a abertura das micelas, gerando uma solução isotrópica de monômeros de P407. As nanomicelas carregadas com α -tocoferol apresentaram superfície irregular, em contraste com as nanomicelas não carregadas, que se apresentaram lisas. Tal diferença no aspecto físico indica uma interação entre as componentes estudadas, fato este corroborado por Leyva-Gómez *et al.* (2017) (99). Levando-se em conta que os espectros do FTIR analisados concluíram pela ausência de reação química entre os componentes, a interação entre o α -tocoferol e as nanomicelas de P407-CH, particularmente a porção do PPO, ocorreram num nível de atração covalente de Van der Waals, conforme descrito por Giuliano *et al.* (2018) (100). As microfotografias confirmaram os resultados atinentes ao tamanho de partícula obtidos pelo DLS: a concentração de 50mg/ml de α -tocoferol gerou partículas com menores diâmetros.

A utilização de agentes tópicos para a prevenção da mucosite oral envolve a ação direta do fármaco sobre células epiteliais e queratinócitos da mucosa bucal. Este estudo avaliou a citotoxicidade aguda e crônica sobre as linhagens NOE e HNK por meio dos métodos MTT e clonogênico, respectivamente. Os resultados do MTT mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos estudados e a proliferação celular do grupo controle (sem exposição à nanomicelas ou ao α -tocoferol). Cabe ressaltar que, apesar da ausência de diferença significativa, a proliferação celular da TOC-P407-CH apresentou média superior aos grupos P407-CH (nanomicelas não carregada com α -tocoferol) e Trolox, sugerindo um efeito

sinérgico do carregamento do α -tocoferol nas nanomicelas. É esperado que a realização dos testes em sextuplicatas reduza os desvios padrões encontrados e, conseqüentemente, a significância. A concentração da TOC-P407-CH não influenciou na citotoxicidade tanto em células NOE como HNK, independente da concentração utilizada (6,25 a 400 μ g/ml). O ensaio clonogênico para análise da citotoxicidade crônica não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, nas mesmas concentrações estudadas (0,125 e 1,25 μ g/ml de α -tocoferol). Os resultados da proliferação celular e citotoxicidade apresentados corroboram os achados de Torshabi *et al.* (2017), Bonferoni *et al.* (2018) e Caddeo *et al.* (2018).

Dispositivos para a liberação controlada de fármacos permitem a redução da dosagem utilizada, reduzindo possíveis efeitos adversos e mantendo níveis terapêuticos por períodos prolongados. O ensaio de liberação controlada pela metodologia UV-VIS realizado neste experimento identificou que o α -tocoferol puro apresentou uma cinemática com um pico de liberação inicial (primeiras 5 horas) seguido por uma liberação residual de longa duração. Nanomicelas com 200mg/ml de α -tocoferol evidenciaram o mesmo padrão, entretanto com uma menor intensidade no pico inicial, resultado este em concordância com a literatura revisada (72,73,89). Já na concentração de 50mg/ml de α -tocoferol, não se observou um pico de liberação inicial, o que confere às nanomicelas a característica de liberação controlada almejada pelo presente estudo, contradizendo os achados de Zigoneanu, Astete e Sabliov (2008) (72), uma vez que os autores concluíram que o aumento na concentração de α -tocoferol gerou uma redução na liberação inicial do fármaco. O pico de liberação inicial para o α -tocoferol na concentração de 200mg/ml encontrado no ensaio deste trabalho corrobora com os achados do DLS, que concluíram pela presença de α -tocoferol não encapsulado (

Figura 8), sendo este o responsável pelo referido pico de liberação inicial.

O desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de α -tocoferol baseado em numa solução aquosa de nanomicelas de P407-CH abre a possibilidade para a aplicação tópica do fármaco em forma de spray, por exemplo, com intervalos diários entre doses (baseado nos resultados dos ensaios de liberação), facilitando sobremaneira o emprego do mesmo em pacientes pediátricos menores de 03 anos de idade, que ainda não possuem habilidade motora para

realizar bochechos. Apesar da extrapolação de resultados de estudos *in vitro* para seres humanos apresentar ressalvas, as perspectivas apontam para possíveis resultados promissores do emprego tópico diário das nanomicelas de α -tocoferol previamente ao início da quimioterapia (entre 3 a 5 dias antes) até o término do ciclo da terapia antineoplásica como forma de prevenir ou atenuar a mucosite oral. Os novos estudos devem considerar ainda o impacto da aplicação tópica nas dosagens séricas do antioxidante; elevações consideráveis nos níveis plasmáticos podem se tornar preocupantes em decorrência de um possível efeito protetor do α -tocoferol sobre células neoplásicas.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho desenvolveu um novo método para o encapsulamento de α -tocoferol em nanomicelas de poloxamer 407 com cobertura de quitosana. As nanomicelas apresentaram potencial zeta positivo, compatível com mucoadesividade. Concentrações menores de α -tocoferol geraram partículas menores e com menor índice de polidispersividade. O carregamento do α -tocoferol nas nanomicelas gerou uma redução na temperatura de gelificação, porém acima da temperatura corporal. O sistema polimérico desenvolvido não apresentou citotoxicidade aguda ou crônica contra queratinócitos e células do epitélio bucal. Nanomicelas carregadas com α -tocoferol numa concentração de 50mg/ml apresentaram liberação controlada do fármaco, ao contrário do α -tocoferol puro e da formulação com 200mg/ml. Novas pesquisas são necessárias com o intuito de prover gelificação na temperatura corporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villa A, Sonis ST. Mucositis: Pathobiology and management. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(3):159–64.
2. Peterson DE, Bensadoun RJ, Roila F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22(SUPPL. 6):78–84.
3. Kwon Y. Mechanism-based management for mucositis: Option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2016;9:2007–16. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84962655820&doi=10.2147%2FOTT.S96899&partnerID=40&md5=bbd91f6db8b57f0392757ae04e24321c>
4. Ribeiro I LA, de Andrade Lima Neto E, Valença AM. Chemotherapy in Pediatric Oncology Patients and the Occurrence of Oral Mucositis. *Int J Clin Pediatr Dent* [Internet]. 2019;12(4):261–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31866707>
5. Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer* [Internet]. 2013 Jul 21;21(7):2075–83. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00520-013-1810-y>
6. L Parkhill A. Oral Mucositis and Stomatitis Associated with Conventional and Targeted Anticancer Therapy. *J Pharmacovigil* [Internet]. 2013;01(03):4–7. Available from: <http://www.esciencecentral.org/journals/oral-mucositis-and-stomatitis-associated-with-conventional-and-targeted-anticancer-therapy-2329-6887.1000112.php?aid=20597>
7. Ribeiro SB, De Araújo AA, De Araújo Júnior RF, De Castro Brito GA, Leitão RC, Barbosa MM, et al. Protective effect of dexamethasone on 5-FUinduced oral mucositis in hamsters. *PLoS One*. 2017;12(10):1–17.
8. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla R V., Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med*. 2017;6(12):2918–31.
9. Saito H, Watanabe Y, Sato K, Ikawa H, Yoshida Y, Katakura A, et al. Effects of professional oral health care on reducing the risk of chemotherapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2014;22(11):2935–40.
10. Lalla R V, Choquette LE, Curley KF, Dowsett RJ, Feinn RS, Hegde UP, et al. Randomized Double-blind Placebo-controlled Trial of Celecoxib for Oral Mucositis in Patients Receiving Radiation Therapy for Head and Neck Cancer HHS Public Access. *Oral Oncol*. 2014;50(11):1098–103.
11. Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int J Cancer* [Internet]. 2008

- Sep 15;123(6):1227–39. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23754>
12. Sonis ST, Villa A. Phase II investigational oral drugs for the treatment of radio/chemotherapy induced oral mucositis. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2018 Feb 17;27(2):147–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12781>
 13. Bhorl M, Singh K, Marar T, Chilakapati MK. Exploring the effect of vitamin E in cancer chemotherapy-A biochemical and biophysical insight. *J Biophotonics* [Internet]. 2018 Sep;11(9):e201800104. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201800104>
 14. Sigurdsson HH, Kirch J, Lehr CM. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int J Pharm* [Internet]. 2013;453(1):56–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.040>
 15. Saez V, Souza IDL, Mansur CRE. Lipid nanoparticles (SLN & NLC) for delivery of vitamin E: a comprehensive review. *Int J Cosmet Sci* [Internet]. 2018;0–1. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12452>
 16. Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MGMGG, Fanotto V, et al. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017;8(JUN):1–16. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85020765770&doi=10.3389%2Ffphar.2017.00354&partnerID=40&md5=8ce1c5039e918137a037dce4c7169f58>
 17. HUGHES G, MURPHY MP, LEDGERWOOD EC. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor κ B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J* [Internet]. 2005 Jul 1;389(1):83–9. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20050078>
 18. Wang H, Cho CH. Effect of NF- κ B signaling on apoptosis in chronic inflammation-associated carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(6):593–9.
 19. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* [Internet]. 1996 Nov 1;274(5288):782–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864118>
 20. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* (80-) [Internet]. 1996;274(5288):787–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864120>
 21. Nakaizumi A, Horie T, Kida T, Kurimoto T, Sugiyama T, Ikeda T, et al. Nitric oxide potentiates TNF- α -induced neurotoxicity through suppression of NF- κ B. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32(1):95–106.
 22. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Jun 1;15(6):362–74. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3834>
 23. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Orlowski GM, Chan FKM. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015;6(2):e1636-11. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.16>
24. Chen S, Lv X, Hu B, Zhao L, Li S, Li Z, et al. Critical contribution of RIPK1 mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress to compression-induced rat nucleus pulposus cells necroptosis and apoptosis. *Apoptosis* [Internet]. 2018;23(5–6):299–313. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-018-1455-x>
 25. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, et al. P38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014;344(2):174–9.
 26. Magni M, Buscemi G, Zannini L. Cell cycle and apoptosis regulator 2 at the interface between DNA damage response and cell physiology. *Mutat Res* [Internet]. 2018 Apr;776:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.03.004>
 27. Oronsky B, Goyal S, Kim MM, Cabrales P, Lybeck M, Caroen S, et al. A Review of Clinical Radioprotection and Chemoprotection for Oral Mucositis. *Transl Oncol* [Internet]. 2018;11(3):771–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.03.014>
 28. Stokman MA, Spijkervet FKL, Boezen HM, Schouten JP, Roodenburg JLN, De Vries EGE. Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: Results of meta-analyses. *J Dent Res.* 2006;85(8):690–700.
 29. Alterio D, Jereczek-Fossa BABA, Fiore MR, Piperno G, Ansarin M, Orecchia R. Cancer treatment-induced oral mucositis. *Anticancer Res* [Internet]. 2007 Feb;27(2):1105–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0901502711014664>
 30. Sio TT, Le-Rademacher JG, Leenstra JL, Loprinzi CL, Rine G, Curtis A, et al. Effect of Doxepin Mouthwash or Diphenhydramine-Lidocaine-Antacid Mouthwash vs Placebo on Radiotherapy-Related Oral Mucositis Pain. *JAMA* [Internet]. 2019 Apr 16;321(15):1481. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2019.3504>
 31. Elad S, Yarom N. The Search for an Effective Therapy and Pain Relief for Oral Mucositis. *JAMA* [Internet]. 2019 Apr 16;321(15):1459. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30990535>
 32. Lucchese A, Matarese G, Ghislanzoni LH, Gastaldi G, Manuelli M, Gherlone E. Efficacy and effects of palifermin for the treatment of oral mucositis in patients affected by acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2016 Apr 2;57(4):820–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428194.2015.1081192>
 33. Stempniewicz A, Ceranowicz P, Warzecha Z. Potential Therapeutic Effects of Gut Hormones, Ghrelin and Obestatin in Oral Mucositis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Mar 27;20(7):1534. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1534>
 34. Elting LS, Shih Y-CTCT, Stiff PJ, Bensinger W, Cantor SB, Cooksley C, et al. Economic Impact of Palifermin on the Costs of Hospitalization for Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplant: Analysis of Phase 3 Trial Results. *Biol*

- Blood Marrow Transplant [Internet]. 2007 Jul;13(7):806–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879107001966>
35. Rezazadeh M, Jafari N, Akbari V, Amirian M, Tabbakhian M, Minaiyan M, et al. A mucoadhesive thermosensitive hydrogel containing erythropoietin as a potential treatment in oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *Drug Deliv Transl Res*. 2018 Oct;8(5):1226–37.
 36. Normando AGC, de Menêses AG, de Toledo IP, Borges GÁ, de Lima CL, dos Reis PED, et al. Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review. *Phyther Res*. 2019;33(5):1318–29.
 37. Yang C, Gong G, Jin E, Han X, Zhuo Y, Yang S, et al. Topical application of honey in the management of chemo/radiotherapy-induced oral mucositis: A systematic review and network meta-analysis. *Int J Nurs Stud* [Internet]. 2019;89:80–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2018.08.007>
 38. Kuo C-C, Wang R-H, Wang H-H, Li C-H. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of propolis mouthwash in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support care cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer*. 2018 Dec;26(12):4001–9.
 39. Piredda M, Facchinetti G, Biagioli V, Giannarelli D, Armento G, Tonini G, et al. Propolis in the prevention of oral mucositis in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: A pilot randomised controlled trial. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Nov;26(6).
 40. Ruggiero T, Pol R, Camisassa D, Simiele S, Giaccone L, Carossa S. Treatment of symptomatic oral mucositis with sodium hyaluronate and synthetic amino acid precursors of collagen in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018;32(3):737–43.
 41. Sharifi H, Heydari A, Salek R, Emami Zeydi A. Oral cryotherapy for preventing chemotherapy-induced oral mucositis: An effective but yet neglected strategy. Vol. 13, *Journal of cancer research and therapeutics*. India; 2017. p. 386–7.
 42. Ariyawardana A, Cheng KKF, Kandwal A, Tilly V, Al-Azri AR, Galiti D, et al. Systematic review of anti-inflammatory agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer* [Internet]. 2019 Oct 8;27(10):3985–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00520-019-04888-w>
 43. Chaitanya B, Pai KM, Yathiraj PH, Fernandes D, Chhaparwal Y. Rebamipide gargle in preventive management of chemo-radiotherapy induced oral mucositis. *Oral Oncol*. 2017 Sep;72:179–82.
 44. Yokota T, Ogawa T, Takahashi S, Okami K, Fujii T, Tanaka K, et al. Efficacy and safety of rebamipide liquid for chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase II study. *BMC Cancer*. 2017 May;17(1):314.
 45. Treister N, Nieder M, Baggott C, Olson E, Chen L, Dang H, et al. Caphosol for prevention of oral mucositis in pediatric myeloablative haematopoietic cell transplantation. *Br J Cancer*. 2017 Jan;116(1):21–7.

46. Kim J-W, Kim MG, Lee HJ, Koh Y, Kwon J-H, Kim I, et al. Topical Recombinant Human Epidermal Growth Factor for Oral Mucositis Induced by Intensive Chemotherapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Final Analysis of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168854.
47. Konuk Sener D, Aydin M, Cangur S, Guven E. The Effect of Oral Care with Chlorhexidine, Vitamin E and Honey on Mucositis in Pediatric Intensive Care Patients: A Randomized Controlled Trial. *J Pediatr Nurs* [Internet]. 2019;45:e95–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pedn.2019.02.001>
48. Dobrovolny J, Smrcka M, Bienertova-Vasku J. Therapeutic potential of vitamin E and its derivatives in traumatic brain injury-associated dementia. *Neurol Sci*. 2018;39(6):989–98.
49. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, et al. Vitamin E. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2000 May 15;80(7):913–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SIC1%291097-0010%2820000515%2980%3A7%3C913%3A%3AAID-JSFA600%3E3.0.CO%3B2-3>
50. Cachia O, El J, Pedruzzi E, Descomps B, Leger C. Tocopherol Inhibits the Respiratory Burst in Human Monocytes. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32801–5.
51. Tan PH, Sagoo P, Chan C, Yates JB, Campbell J, Beutelspacher SC, et al. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J Immunol*. 2005;174(12):7633–44.
52. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Nuclear factor-kB, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: Effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1511–20.
53. Ekstrand-Hammarström B, Österlund C, Lilliehöök B, Bucht A. Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kB and inflammatory responses in lung epithelial cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2006;147(2):359–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2006.03285.x>
54. Sapmaz-Metin M, Topcu-Tarlacalisir Y, Uz YH, Inan M, Omurlu IK, Cerkezkayabekir A, et al. Vitamin E modulates apoptosis and c-jun N-terminal kinase activation in ovarian torsion-detorsion injury. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2013;95(2):213–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.07.007>
55. Takano H, Momota Y, Kani K, Aota K, Yamamura Y, Yamanoi T, et al. γ-tocotrienol prevents 5-FU-induced reactive oxygen species production in human oral keratinocytes through the stabilization of 5-FU-induced activation of Nrf2. *Int J Oncol*. 2015 Apr;46(4):1453–60.
56. Lee GY, Han SN. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*. 2018 Nov;10(11).
57. Bendich A, Machlin LJ. Safety of oral intake of vitamin E. *Am J Clin Nutr*

- [Internet]. 1988 Sep;48(3):612–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3046299>
58. Erhardt JGJG, Mack H, Sobeck U, Biesalski HK. beta-Carotene and alpha-tocopherol concentration and antioxidant status in buccal mucosal cells and plasma after oral supplementation. *Br J Nutr.* 2002 May;87(5):471–5.
 59. Khurana H, Pandey RK, Saksena AK, Kumar A. An evaluation of vitamin E and pycnogenol in children suffering from oral mucositis during cancer chemotherapy. *Oral Dis.* 2013;19(5):456–64.
 60. Chaitanya NC. Role of Vitamin E and Vitamin A in Oral Mucositis Induced by Cancer Chemo/Radiotherapy- A Meta-analysis. *J Clin DIAGNOSTIC Res* [Internet]. 2017;11(5):9–12. Available from: http://jcd.r.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2017&volume=11&issue=5&page=ZE06&issn=0973-709x&id=9905
 61. El-Housseiny AAA, Saleh SMSM, El-Masry AAAA, Allam AA. The effectiveness of vitamin “E” in the treatment of oral mucositis in children receiving chemotherapy. *J Clin Pediatr Dent* [Internet]. 2007;31(3):167–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550040>
 62. Olguín-Martínez M, Hernández-Espinosa DR, Hernández-Muñoz R. High α -tocopherol dosing increases lipid metabolism by changing redox state in damaged rat gastric mucosa and liver after ethanol treatment. *Clin Sci.* 2018;132(12):1281–96.
 63. Torshabi M, Rezaei Esfahrood Z, Jamshidi M, Mansuri Torshizi A, Sotoudeh S. Efficacy of vitamins E and C for reversing the cytotoxic effects of nicotine and cotinine. *Eur J Oral Sci.* 2017 Dec;125(6):426–37.
 64. Testa D, Marcuccio G, Panin G, Bianco A, Tafuri D, Thyron FZ, et al. Nasal mucosa healing after endoscopic sinus surgery in chronic rhinosinusitis of elderly patients: role of topic alpha-tocopherol acetate. *Aging Clin Exp Res.* 2017 Feb;29(Suppl 1):191–5.
 65. Tanaydin V, Conings J, Malyar M, van der Hulst R, van der Lei B. The Role of Topical Vitamin E in Scar Management: A Systematic Review. *Aesthetic Surg J.* 2016 Sep;36(8):959–65.
 66. Schempp CM, Meinke MC, Lademann J, Ferrari Y, Brecht T, Gehring W. Topical antioxidants protect the skin from chemical-induced irritation in the repetitive washing test: a placebo-controlled, double-blind study. *Contact Dermatitis.* 2012 Oct;67(4):234–7.
 67. Foote JA, Ranger-Moore JR, Einspahr JG, Saboda K, Kenyon J, Warneke J, et al. Chemoprevention of human actinic keratoses by topical DL-alpha-tocopherol. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009 Apr;2(4):394–400.
 68. Murray JC, Burch JA, Streilein RD, Iannacchione MA, Hall RP, Pinnell SR. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Sep;59(3):418–25.
 69. Polat S, Ozturk O, Uneri C, Yuksel M, Haklar G, Bozkurt S, et al. Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes: effect of

- vitamin e treatment. *Laryngoscope*. 2004 Apr;114(4):720–5.
70. Jiang Q. Natural Forms of Vitamin E as Effective Agents for Cancer Prevention and Therapy. *Adv Nutr*. 2017 Nov;8(6):850–67.
 71. Pal A, Alam S, Singhal J, Kumar R, Ansari KM, Das M. Protective effect of topical application of alpha-tocopherol and/or N-acetyl cysteine on argemone oil/alkaloid-induced skin tumorigenesis in mice. *Nutr Cancer*. 2013;65 Suppl 1:78–87.
 72. Zigoneanu IG, Astete CE, Sabliov CM. Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release. *Nanotechnology* [Internet]. 2008 Mar 12;19(10):105606. Available from: <http://stacks.iop.org/0957-4484/19/i=10/a=105606?key=crossref.3ffcca389ec8e657f6a195a4e051423d>
 73. Luo Y, Zhang B, Whent M, Yu LL, Wang Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2011 Jul;85(2):145–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.020>
 74. Caddeo C, Manca ML, Peris JE, Usach I, Diez-Sales O, Matos M, et al. Tocopherol-loaded transfersomes: In vitro antioxidant activity and efficacy in skin regeneration. *Int J Pharm* [Internet]. 2018 Nov;551(1–2):34–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517318306604>
 75. Bonferoni MCC, Riva F, Invernizzi A, Dellera E, Sandri G, Rossi S, et al. Alpha tocopherol loaded chitosan oleate nanoemulsions for wound healing. Evaluation on cell lines and ex vivo human biopsies, and stabilization in spray dried Trojan microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018 Feb;123:31–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.11.008>
 76. Bodratti A, Alexandridis P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J Funct Biomater* [Internet]. 2018 Jan 18;9(1):11. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4983/9/1/11>
 77. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709–28.
 78. Wanka G, Hoffmann H, Ulbricht W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules* [Internet]. 1994 Jul;27(15):4145–59. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00093a016>
 79. Barba AA, D'Amore M, Grassi M, Chirico S, Lamberti G, Titomanlio G. Investigation of Pluronic® F127-Water solutions phase transitions by DSC and dielectric spectroscopy. *J Appl Polym Sci* [Internet]. 2009 Oct 15;114(2):688–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.30586>
 80. Fakhari A, Corcoran M, Schwarz A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon* [Internet]. 2017;3(8):e00390. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00390>
 81. Sultan AA, El-Gizawy SA, Osman MA, El Maghraby GM. Self dispersing mixed

- micelles forming systems for enhanced dissolution and intestinal permeability of hydrochlorothiazide [Internet]. Vol. 149, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Netherlands: Elsevier B.V.; 2017. 206–216 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.028>
82. Alexander S, Cosgrove T, Castle TC, Grillo I, Prescott SW. Effect of Temperature, Cosolvent, and Added Drug on Pluronic–Flurbiprofen Micellization. *J Phys Chem B* [Internet]. 2012 Sep 20;116(37):11545–51. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp303185m>
 83. Basak R, Bandyopadhyay R. Encapsulation of hydrophobic drugs in pluronic F127 micelles: Effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. *Langmuir*. 2013 Apr;29(13):4350–6.
 84. Arranja A, Schroder APAP, Schmutz M, Waton G, Schosseler FF, Mendes E. Cytotoxicity and internalization of Pluronic micelles stabilized by core cross-linking. *J Control Release* [Internet]. 2014 Dec;196:87–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.001>
 85. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2011;36(8):981–1014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
 86. Saikia C, Gogoi P. Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. *J Mol Genet Med* [Internet]. 2015;s4:1–10. Available from: <https://www.omicsonline.com/open-access/chitosan-a-promising-biopolymer-in-drug-delivery-applications-1747-0862-S4-006.php?aid=64159>
 87. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy V V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 2008;9(7):1837–42.
 88. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;50(SUPPL. 1):91–101.
 89. Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Pirkić B, Filipović-Grcić J. A Nonionic Surfactant/Chitosan Micelle System in an Innovative Eye Drop Formulation. *J Pharm Sci* [Internet]. 2010 Oct;99(10):4317–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915324473>
 90. Kesavan K, Kant S, Singh PN, Pandit JK. Mucoadhesive Chitosan-Coated Cationic Microemulsion of Dexamethasone for Ocular Delivery: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Curr Eye Res* [Internet]. 2013 Mar 7;38(3):342–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02713683.2012.745879>
 91. Singh PK, Pawar VK, Jaiswal AK, Singh Y, Srikanth CH, Chaurasia M, et al. Chitosan coated PluronicF127 micelles for effective delivery of Amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017 Dec;105:1220–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.161>
 92. Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmiento VH, de Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2010 Jun;75(2):186–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.02.011>
 93. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic

- chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* [Internet]. 1997 Jan 3;63(1):125–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4628%2819970103%2963%3A1%3C125%3A%3AAID-APP13%3E3.0.CO%3B2-4>
94. Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R, Ostad SN. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2012 Apr;7:1851–63. Available from: <http://www.dovepress.com/chitosanndashpluronic-nanoparticles-as-oral-delivery-of-anticancer-gem-peer-reviewed-article-IJN>
 95. Varga N, Turcsányi Á, Hornok V, Csapó E. Vitamin E-Loaded PLA- and PLGA-Based Core-Shell Nanoparticles: Synthesis, Structure Optimization and Controlled Drug Release. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Jul 22;11(7):357. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/7/357>
 96. Varga N, Turcsányi Á, Hornok VV, Csapó E, Turcsanyi A, Hornok VV, et al. Vitamin E-Loaded PLA- and PLGA-Based Core-Shell Nanoparticles: Synthesis, Structure Optimization and Controlled Drug Release. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Jul 22;11(7):357. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/7/357>
 97. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):469–71.
 98. Selvaag E, Petersen AB, Gniadecki R, Thorn T, Wulf HC. Phototoxicity to diuretics and antidiabetics in the cultured keratinocyte cell line HaCaT: Evaluation by clonogenic assay and single cell gel electrophoresis (Comet assay). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2002;18(2):90–5.
 99. Leyva-Gómez G, Santillan-Reyes E, Lima E, Madrid-Martínez A, Krötzsch E, Quintanar-Guerrero D, et al. A novel hydrogel of poloxamer 407 and chitosan obtained by gamma irradiation exhibits physicochemical properties for wound management. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;74:36–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.127>
 100. Giuliano E, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: An overview. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):1–26.