

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIANA PARENTE MENEZES RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO HIDROXITIROSO

PONTA GROSSA

2020

JULIANA PARENTE MENEZES RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO HIDROXITIROSO

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Prof^a Dr^a Andressa Novatski

PONTA GROSSA

2020

R484

Ribeiro, Juliana Parente Menezes

Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da eficiência de encapsulação de nanocápsulas poliméricas contendo hidroxitirosol. Ponta Grossa, 2020.

75f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Área de concentração – Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Profa. Dra. Andressa Novatski

1. Antioxidante. 2. Poli(ϵ -caprolactona). 3. Nanoencapsulação 4. Hidroxitirosol. 5. Oleuropeína. 6. Polifenol. I. Farago, Paulo Vitor. II. Novatski, Andressa. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa – Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

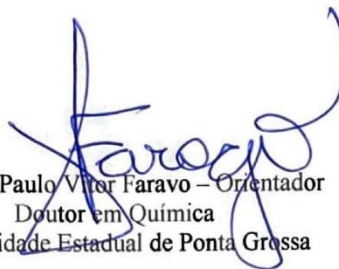
CDD: 615

JULIANA PARENTE MENEZES RIBEIRO


**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO HIDROXITIROSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

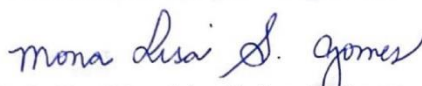
Ponta Grossa, 16 de dezembro de 2020.



Prof. Dr. Paulo Victor Faravo – Orientador
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Maria Dagmar da Rocha Gaspar
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Mona Lisa Simionatto Gomes
Doutora em Ciências Farmacêuticas
UNICESUMAR

Dedico este trabalho a toda a Humanidade, e aqueles que necessitem, possa usufruí-lo para o Bem da Ciência.

AGRADECIMENTOS

A Grande força Universal que me nutri e sustenta.

Aos meus pais Cezar e Flávia, a minha irmã Fernanda e família, ao meu marido Amaury e a meus cães companheiros de jornada, ao meu lado sempre, os aprecio.

A Equipe Eficácia Brasil, que aguentou por longos tempos minha ausência bravamente.

Aos professores, quanta alegria e aprendizado, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, a coorientadora Prof. Dra. Andressa Novatski que me proporcionaram vivenciar tudo isto e me receberam de braços abertos.

As aulas praticamente VIP sobre plantas medicinais com a queridíssima professora Dra. Jane Manfron, saudades...

A querida e estimada professora Dra. Jessica B. Mendes Nadal, muito me orientou e auxiliou sempre quando necessitei, que os céus te reverenciem em dobro.

A simpatia e presteza da Amanda Lyra, que foi fundamental, gratidão.

Ao primoroso e admirável amigo Guilherme dos Anjos Camargo, realmente foi um verdadeiro “anjo” nesta longa jornada, saiba que seu auxílio foi mais que essencial, sinto-me eternamente grata.

Aos técnicos de laboratório da UEPG, todos vocês cada qual doando seu melhor, foram únicos, um enorme abraço Miriam, Elizabeth, Virgínia, Ivelise, Plínio, Cristiane, Vanessa, Edelor...

Ao aprendizado por todos que direta ou indiretamente me proporcionaram, saibam que estou saindo muito melhor do que entrei. É impossível ser feliz sozinho...

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Hidroxitirosol (HT) é um fitoquímico fenólico de ocorrência natural no azeite de oliva extra virgem, e nas folhas das oliveiras. Possui potencial antioxidante, antiinflamatório e preventivo do câncer. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar nanopartículas poliméricas contendo HT, empregando o polímero poli(ϵ -caprolactona) – PCL – pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, variando a concentração do fármaco em 2 mg/mL (NC-2) e 5 mg/mL (NC-5), além do controle negativo (NC-0). Foram realizadas a validação do método analítico por UHPLC-PDA, caracterização dos sistemas contendo HT (métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos) e avaliação da estabilidade físico-química. Os resultados da validação do método analítico conforme o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *The International Conference on Harmonization*, obtiveram resultados satisfatórios, com capacidade de quantificar o HT incorporado nas nanocápsulas com eficiência de encapsulação acima de 99,52%. Foi verificado na avaliação morfológica de superfície dos materiais de partida e das nanocápsulas, a inexistência do fármaco na parte externa, indicando a eficácia em sua encapsulação. O HT puro, os polímeros, a Mistura Física e as nanocápsulas poliméricas foram examinadas por difração de raios X, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e foi comprovada a viabilidade da nanoencapsulação do HT. No estudo de estabilidade físico-química, as formulações foram monitoradas durante 120 dias de armazenamento, em triplicata, verificando mensalmente o pH, tamanho de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta. No tamanho de partícula, houve diferença significativa para a NC-2. O Índice de Polidispersão (IPD) teve alteração para a NC-0 e NC-5 a partir de 90 dias e para NC-2 acima de 30 dias, porém os valores permaneceram aceitáveis abaixo de 0,3, satisfatório para uso farmacêutico. No potencial zeta houve alteração de todas as formulações a partir de 60 dias, e acentuada em NC-0 e NC-2, em 90 dias. Houve alterações de pH acima de 60 dias em todas as amostras, exceto a NC-2 que foi a partir de 90 dias. Durante o estudo, todas as formulações, mantiveram-se com o mesmo aspecto leitoso inicial, indicando boa estabilidade físico-química. As nanocápsulas poliméricas de HT mostram-se como uma nova forma farmacêutica eficaz, para garantir o total potencial do fármaco, favorável ao tratamento de diversas doenças.

Palavras-chave: Antioxidante. Poli(ϵ -caprolactona). Nanoencapsulação. Hidroxitirosol. Oleuropeína. Polifenol.

ABSTRACT

Hydroxytyrosol (HT) is a naturally occurring phenolic phytochemical in extra virgin olive oil, and in the leaves of olive trees. It has antioxidant, anti-inflammatory and cancer-preventing potential. The objective of this work was to develop and evaluate polymeric nanoparticles containing HT, using the poly (ϵ -caprolactone) polymer - PCL - by the interfacial deposition method of the preformed polymer, varying the drug concentration in 2 mg / mL (NC-2) and 5 mg / mL (NC-5), in addition to the negative control (NC-0). Validation of the analytical method by UHPLC-PDA, characterization of systems containing HT (morphological, spectroscopic, and thermal methods) and evaluation of physical-chemical stability. The results of the validation of the analytical method as recommended by the National Health Surveillance Agency and The International Conference on Harmonization, obtained satisfactory results, with the ability to quantify the HT incorporated in the nanocapsules with efficiency encapsulation above 99.52%. No drug was observed in the surface morphological evaluation. Pure HT, polymers, physical mixture and polymeric nanocapsules were examined by X-ray diffraction, Fourier transform infrared (FTIR) and the viability of nanoencapsulation of HT was proven. In the study of physical-chemical stability, the formulations were monitored during 120 days of storage, in triplicate, monthly checking the pH, particle size, size distribution and zeta potential. In particle size, there was a significant difference for NC-2. The Polydispersity index (PDI) changed to NC-0 and NC-5 after 90 days and to NC-2 over 30 days, but the values remained acceptable below 0.3, satisfactory for pharmaceutical use. In the zeta potential, there was a change in all formulations after 60 days and accentuated in NC-0 and NC-2, in 90 days. The pH changes over 60 days in all samples, except for NC-2, which was after 90 days. During the study, all formulations remained with the same milky appearance, indicating good physical-chemical stability. The polymeric nanocapsules of HT are shown as a new effective pharmaceutical form, to guarantee the full potential of the drug, favorable to the treatment of several diseases.

Keywords: Antioxidant. Poly (ϵ -caprolactone). Nanoencapsulation. Hydroxytyrosol. Oleuropein. Polyphenol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO LITERATURA	13
3.1 OLIVEIRA (<i>Olea europaea</i> L.).....	13
3.2 HIDROXITIRO SOL (HT).....	17
3.2.1 Formação do HT pela Degradação da Oleuropeína.....	17
3.2.2 Aspectos Biofarmacêuticos do Hidroxitiro sol (HT)	19
3.2.3 Hidroxitiro sol (HT) no Mercado Brasileiro	22
3.3 NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE	26
3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	28
3.4.1 Poli-ε-caprolactona (PCL).....	30
3.4.2 Nanocápsulas de PCL e Hidroxitiro sol (HT)	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 EQUIPAMENTOS	34
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	34
4.2.1 Fármaco	34
4.2.2 Polímero	35
4.2.3 Água Purificada	35
4.2.4 Solventes e Demais Reagentes	35
4.2.5 Materiais.....	35
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
4.4 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO HIDROXITIRO SOL (HT).....	36
4.4.1 Mistura Física	38
4.5 DETERMINAÇÃO DO HIDROXITIRO SOL (HT) INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS	39

4.5.1 Validação do Método Analítico para Quantificação do Hidroxitirosol	40
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	
POLIMÉRICAS.....	42
4.6.1 Determinação do pH	42
4.6.2 Análises Morfológicas e de Superfície.....	42
4.6.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta	42
4.6.2.2 Análise da morfologia e superfície	42
4.6.3 Análise Estrutural	43
4.6.3.1 Análise por difração de raios X.....	43
4.6.3.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho	43
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO	
HIDROXITIRO SOL.....	44
5.2 DETERMINAÇÃO DO HIDROXITIRO SOL INCORPORADO NAS	
NANOCÁPSULAS	44
5.2.1 Desenvolvimento e Otimização do Método Analítico	44
5.2.2 Validação do Método Analítico para a Quantificação do Hidroxitirosol	45
5.2.3 Eficiência de Encapsulação.....	49
5.3 DETERMINAÇÃO DO pH.....	50
5.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE	51
5.4.1 Análise da Morfologia e Superfície	51
5.4.2 Determinação do Diâmetro Médio e do Potencial Zeta	53
5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL	54
5.5.1 Análise por Difração de Raios X.....	54
5.5.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho	55
5.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA	58
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a ciência da saúde visa estudar novos compostos com propriedades antioxidantes e antineoplásicas, agregados a materiais e dispositivos poderosos, eficientes e versáteis. O foco é a otimização de tratamentos mais eficazes, específicos e flexíveis. (COIMBRA, 2013; DENG *et al.*; 2020; MIR *et al.*, 2017; ABDEL-MOTTALEB *et al.*, 2014).

O presente trabalho estuda uma substância chamada Hidroxitirosol (HT), encontrada em grande parte nas folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) que contém além de fenóis simples, incluindo o HT, flavonoides, ácidos fenólicos e seus derivados, secoiridoide e seus derivados (LORINI, 2018; RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2017).

O HT é um líquido claro incolor, fotossensível, irritante à pele e mucosa, e inflamável. Possui baixa solubilidade em água: 5g/100mL (25°C). Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como tirosóis, membro da classe dos catecóis e um álcool primário. Isolado de *Olea europaea*, é encontrado nas folhas da oliveira após a hidrólise da oleuropeína que é degradada por via enzimática e/ou química e tem como propriedades gerais ação antioxidante, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antitrombótica e antineoplásica, considerada uma substância promissora para contínua pesquisa. Além da folha da oliveira, o HT pode ser encontrado em uma série de alimentos, como a azeitona e seu óleo, cravo e vinho de uva. (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010; PASTOR *et al.*, 2016; PERSIN *et al.* 2017; PUBCHEM, 2020; SALEM *et al.*, 2014; SUN; ZHOU; SHAHIDI, 2018; TAKEDA *et al.*, 2014; TAKEDA *et al.*, 2013).

A capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC) desse fenol, o HT, índice de atividade antioxidante, é duas vezes maior que a observada para oleuropeína (o secoiridoide contendo em sua estrutura o próprio HT), duas vezes maior que a da Coenzima Q10, e três e dez vezes mais para que a epicatequina (polifenol do chá verde) e ácido ascórbico, respectivamente. Depois do ácido gálico, acredita-se que o HT seja um dos antioxidantes mais poderosos. Sua capacidade de absorção de radicais de oxigênio é de 40.000 $\mu\text{molTE/g}$ (THE ANTIMICROBIAL INDEX, 2020). Em modelos *in vitro* e *ex vivo*, o HT apresenta propriedades antioxidantes superiores à vitamina E sobre a oxidação de lipídios e DNA, além de amplo espectro de efeitos bioativos. Em modelos animais, HT exibe atividades semelhantes e retarda a progressão da aterosclerose (CATALÁN *et al.*, 2018;

GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010; NOUSIS *et al.*, 2005; PASTOR *et al.*, 2016; RIETJENS *et al.*, 2007).

As propriedades bioativas do HT são realizadas por meio de vários mecanismos bioquímicos envolvendo a regulação das vias xenobióticas, interleucinas, prostaglandinas, fatores de transcrição e enzimas antioxidantes: SOD, catalase, glutathione peroxidase (BERTELI *et al.*, 2020; MARKOVIC *et al.*, 2019; PERSIN *et al.* 2017; WANI *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2018).

Há diversos fornecedores no Brasil, credenciados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que comercializam extratos secos padronizados de oliveira, com teores de HT que variam entre 3 a 20%.

Praticamente não há estudos referenciando nanocápsulas poliméricas de PCL com HT isolado. Artigos recentes mostraram, o HT presente no extrato da folha de oliveira, incorporado em bio nanofibra (esteiras de nanofibra de polissacarídeos) feito por eletrofiação (PERSIN *et al.*, 2017); HT em nanopartícula de quitosana poliméricas com hidrocortisona (SIDDIQUE *et al.*, 2019); HT em nanocápsulas de PCL agregados em nanoargilas (Cloisite 30B – C30B) caracterizados como nanobiocompostos (BELTRAN *et al.*, 2014); HT em ciclodextrinas (b-ciclodextrina e hidroxipropil-b-ciclodextrina) publicada por LÓPEZ-GARCIA *et al.* (2010).

Pelas nanocápsulas de PCL possuem características especiais, como alta permeabilidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, demonstram ser estruturas ideais para a incorporação do HT isolado, e poderão facilmente penetrar por meio das barreiras vitais no corpo humano por estarem em nanoescala (ABAMOR, *et al.*, 2018; BELTRAN *et al.*, 2014; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019).

Portanto, é uma alternativa interessante a obtenção da nanoencapsulação de PCL do HT, já que é um ativo de caráter oleoso, com baixa solubilidade em água, palatabilidade amarga, instável no meio ambiente externo (é altamente oxidável e fotossensível). Esta tecnologia garante a proteção do HT, mantém sua eficácia terapêutica com liberação controlada nas células, tecidos e/ou órgãos-alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, quantificar, caracterizar e avaliar a estabilidade físico-química dos sistemas poliméricos para a liberação modificada do hidroxitirosol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanocápsulas poliméricas a partir do poliéster biodegradável PCL contendo o HT, segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente;
- Determinar quantitativamente o HT incorporado nas nanocápsulas pelo método de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Efetuar a caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo HT por meio de análises morfológicas e espectroscópicas;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

A cultura da oliveira é uma das mais importantes atividades agrícolas nos países mediterrâneos, onde são cerca de 8 milhões de hectares de oliveiras cultivadas. Estima-se que as oliveiras mais antigas podem ter cerca de 2500 anos, presentes em Israel, mas começou a ser cultivada no Oriente médio há cerca de 6000 anos. A árvore da oliveira pode chegar, dependendo da variedade até 20m de altura, e sua raiz subterrânea e fasciculada até 6 m de profundidade. Seu fruto é a azeitona do qual se extrai o azeite, Figura 1. (BRAHMI *et al.*, 2012; GUINDA *et al.*, 2015; JILANI *et al.*, 2016; OTERO, 2014).

FIGURA 1 – *Olea europaea* L. (A = ramo de azeitonas maduras; B= ramo da Flor de Oliveira; C = flor de oliveira)



A



B



C

Fonte: Adaptado de Khan, Y. et al. *Olea europaea*: A Phyto-Pharmacological Review. **Pharmacognosy Reviews**. v.1, p. 114-118, 2007.

Classificação da planta, segundo SALEM *et al.* (2014):

- a. Reino: Plantae
- b. Divisão: Angiospermas
- c. Aula: Eudicots
- d. Pedido: Lamiales
- e. Família: Oleaceae
- f. Gênero: *Olea*
- g. Espécie: *europaea*

Há várias subespécies de oliveira espalhadas pelo mundo (KOSTELENOS; KIRITSAKIS, 2017; OTERO, 2014):

- *Olea europaea europaea* e *Olea europaea guanchica*: originária das Canárias.
- *Olea europaea africana*: presente na África, Madagascar, Arábia, Índia e China.
- *Olea europaea cerasiformis*: originária da Madeira, ocorrendo também nas Canárias.
- *Olea europaea cuspidata*: difundida pela África e pela Ásia.
- *Olea europaea laperrinei*: originária da Argélia, do Sudão e do Níger.
- *Olea europaea maroccana*: originária de Marrocos.
- *Olea europaea sylvestris*: Madeira, Perú, Chile, Argentina, Califórnia, África, Austrália, Brasil.

A oliveira é bioquimicamente caracterizada pela presença de secoiridoides, carboidratos, álcoois de açúcar e terpenoides (GUINDA *et al.*, 2015; OTERO, 2014).

Na farmacopeia brasileira, 6ª. Edição, volume II, 2019, consta na página 729, sob referência PM147-00, a padronização do controle de qualidade e caracteres bioquímicos do óleo de oliva virgem (*Olivae oleum virginum*).

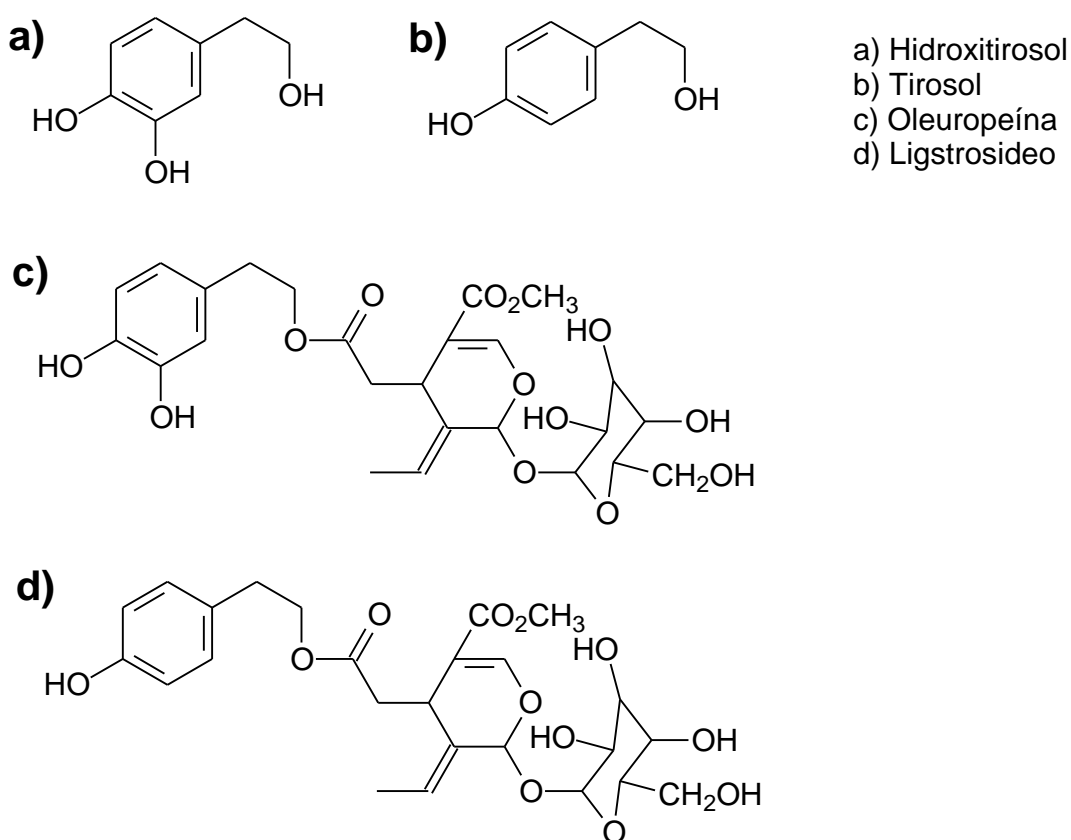
Na segunda edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, na página 122, há a padronização tecnocientífico da manipulação e produção de medicamentos fitoterápicos a partir da *Olea europaea* (Oliveira) (ANVISA, 2018).

Segundo Lorini (2018), as azeitonas e o azeite de mesa, obtiveram uma produção mundial estimada em 2017 de 2,95 milhões e 2,89 milhões de toneladas respectivamente. Os subprodutos, como a “torta” da azeitona e as folhas de oliveira, são utilizadas para a fabricação da ração animal, nas indústrias cosméticas, farmacêutica e alimentícia.

As azeitonas fazem parte integrante da dieta mediterrânea e são considerados contribuintes para a ingestão de antioxidantes nutricionais, uma vez que contêm uma variedade de fitoquímicos polifenólicos, dentre eles o hidroxitirosol (HT), e em maior concentração no fruto, o ácido cafeico e a luteína (GUINDA *et al.*, 2015; OTERO, 2014; XIE *et al.* 2015).

Nas folhas destacam-se diversos compostos fenólicos, em ordem decrescente de concentração, a oleuropeína, seguido do HT, tirosol e ligstrosídeo (Figura 2), os quais mostraram-se eficazes no controle do estresse oxidativo dos agentes oxidantes e radicais livres, além de propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais e outras terapêuticas. (GUINDA *et al.*, 2015; JILANI *et al.*, 2016; SALEM *et al.*, 2014; TALHAOUI, 2016; TRUCILLO *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2015).

FIGURA 2 – Estruturas químicas dos componentes da folha de oliveira



Fonte: A autora, 2020.

Os compostos bioativos da folha de oliveira são apresentados na Tabela 1 (GUINDA *et al.*, 2015; JILANI *et al.*, 2016; SALEM *et al.*, 2014; TALHAOUI, 2016; TRUCILLO *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2015).

TABELA 1 – Compostos bioativos da folha de Oliveira

Família de compostos	Compostos
Flavonoides	Catequina, rutina, luteolina, taxifolina, diosmina, diosmetina, cirstimaritin, apigenina, quercetina, eriodictiol, leteolina-7-licosideo, apigenina-7-glicosideo, luteolina diglicosideo, luteoolina-7-rutinosideo, apigenina-7-rutinosideo
Fenóis simples	HT, tirosol, HT hexosídeo, HT acetato, tirosol glicosídeo, vanilina
Ácidos fenólicos e derivados	Ácido cafeico, ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido ferrulico, ácido clorogenico, ácido caftárico, ácido quínico
Secoiridoides e seus derivados	Secologanosídeo, oleosídeo, oleuropeína, siringaresinol, lucidomosídeo D, dimetiloleuropeína, oleuropeina aglicona, oleosídeo metil éster, oleuropeina diglicosideo, hidroxi oleuropeina, ligstrosideo, ácido elenólico

Fonte: Adaptado de LORINI, 2018; RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. *et al.* Composition and analysis of functional components of olive leaves. In: KIRITSAKIS, A.; SHAHIDI, F. (Ed.) **Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing**. John Wiley & Sons, p. 383-399, 2017.

Vários estudos destacaram a oleuropeína (de 6% a 14% da matéria seca nas folhas) como o fenol mais abundante na oliveira, com uma ampla gama de propriedades farmacológicas, como antiarrítmico, espasmolítico, imunoestimulante, cardioprotetor, hipotensor, antioxidantes e anti-inflamatório. (GUINDA *et al.*, 2015; LORINI, 2018; TRUCILLO *et al.*, 2018).

O segundo composto fenólico mais abundante é o HT e varia, nas folhas, de 0,53% a 1,12 %, já os verbascosides possuem concentração média de 0,40% a 0,78% (LORINI, 2018; SALEM *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2015).

Estudos citam os diversos benefícios presentes na planta, como no caso, o azeite de oliva, misturado ao limão, trata cálculos biliares, nefrite associada por intoxicação de chumbo, além de atuar como laxante. É também indicado, aplicar todas as noites no couro cabeludo como profilático da queda capilar (GILANI *et al.* 2005; SALEM, 2014; ZARGARI, 1992).

A infusão das folhas, via oral, é utilizada contra desordens estomacais, intestinais, infecções respiratórias e do trato urinário, como diurético, anti-inflamatório, febrífugo, para tratar hipertensão, diabetes, asma brônquica, incluindo a indicação de bochechos para limpeza bucal (AL-KHALIL, 1995; DE LA RIBEIRO *et al.*, 1986; GASTALDO, 1974; GILANI *et al.* 2005; KHAN *et al.* 2007; LAWRENDIADIS, 1961; PIERONI *et al.*,1996; SALEM, 2014; SHETH, 2005; VARDANIAN, 1978; ZARGARI, 1992).

Publicações relatam, através de experimentos com o extrato das folhas de oliveira, dada a importância sinérgica da oleuropeína e HT, inúmeras comprovações (FREDRICKSON, 2000; HIRSCHAMAN, 1972; JEMAI *et al.* ,2009; RENIS, 1969; SAIJA; UCCELLA, 2001; SALEM *et al.*, 2014; VISIOLI *et al.*, 1994):

- Atividade antioxidante: por ter mostrado uma taxa significativamente maior de catalase (enzima responsável por decompor peróxido de hidrogênio em oxigênio e água) e reduzido as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- Resultados histológicos: destacou claramente as aberrações da arquitetura hepática com preservação de estrutura do parênquima;
- Hipoglicêmico e hipocolesterolêmico: corrigiu hipercolesterolemia e hiperglicemia significativamente em ratos diabéticos induzidos pela aloxana;
- Outras atividades: propriedades antitrombóticas e fotoprotetoras da pele; atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de uma grande variedade de bactérias, fungos e vírus (atividades contra herpes, mononucleose, vírus da hepatite, rotavírus, bovino rinovírus, parvovírus canino e vírus da leucemia felina); prevenção de doenças cardiovasculares.

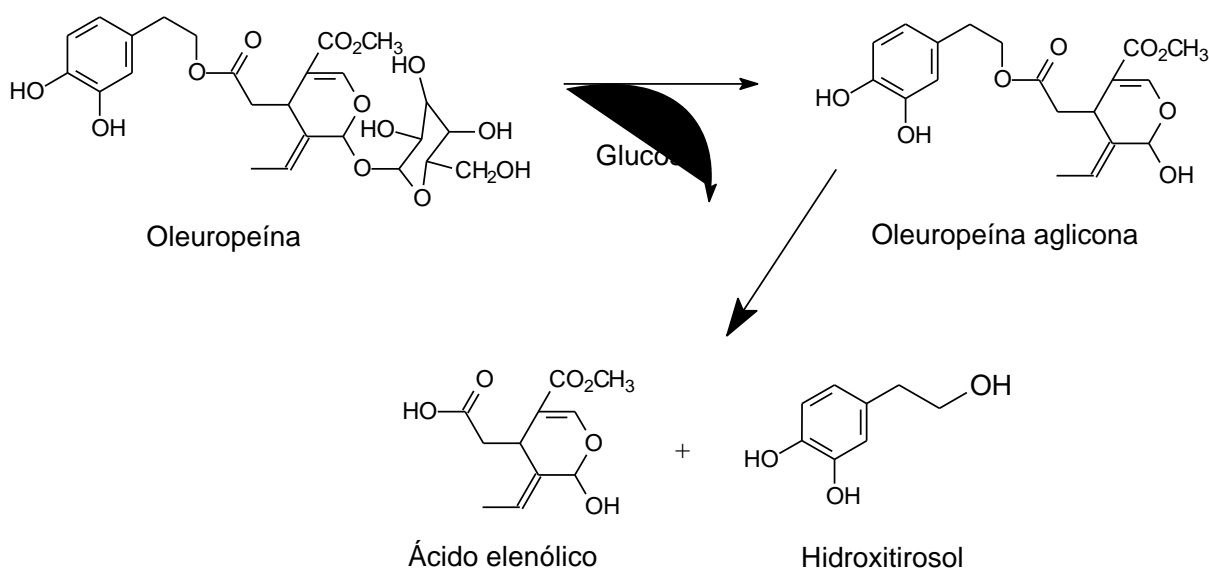
3.2 HIDROXITIROSOLO (HT)

3.2.1 Formação do HT pela Degradação da Oleuropeína

Hidroxitirosol e tirosol são dois dos muitos compostos fenólicos nas oliveiras que contribuem para seu sabor amargo, adstringência e resistência à oxidação. O HT é encontrado principalmente nas folhas da oliveira após a hidrólise da oleuropeína, Figura 3. (PERSIN *et al.* 2017; SUN; ZHOU; SHAHIDI, 2018; TAKEDA *et al.*, 2013).

Estudos recentes relatam que durante a maturação das azeitonas de muitos cultivares de oliveiras, a oleuropeína é degradada por via enzimática e/ou química, e leva a formação de compostos como HT, ácido elenólico e dimetil oleuropeína, este último, resultante da desmetilação da oleuropeína (ALAGNA *et al.*, 2012; BRIANTE *et al.*, 2001; PERSIN *et al.* 2017; SERVILI *et al.*, 2004; YORULMAZ *et al.*, 2013).

FIGURA 3 – Formação do HT a partir da molécula de oleuropeína



Fonte: A autora, 2020.

De Leonardis *et al.* (2015) revelou quais enzimas são envolvidas na degradação da oleuropeína endógena em folhas de oliveira. Experimentos *in vitro*, determinados por HPLC e espectroscopia UV-Visível, comprovaram a presença da polifenoloxidasas (PPO) exercendo atividade sob a enzima β -glucosidase. Concomitante a isto, a presença de oleuropeína e HT na planta, faz com que o HT iniba a ação das PPO's, impedindo sua própria degradação (Figura 4).

Na fisiologia da oliveira, a biotransformação enzimática da oleuropeína está relacionada com a maturação do fruto e com o mecanismo de defesa específico garantido pelos derivados da oleuropeína que possuem atividades antimicrobianas. Um *pool* endógeno enzimático, composto pela β -glucosidase, esterases e oxidoredutases, controlam a hidrólise e a oxidação de oleuropeína (DE LEONARDIS *et al.*, 2015; KONNO; HIRAYAMA; YASUI; NAKAMURA, 1999).

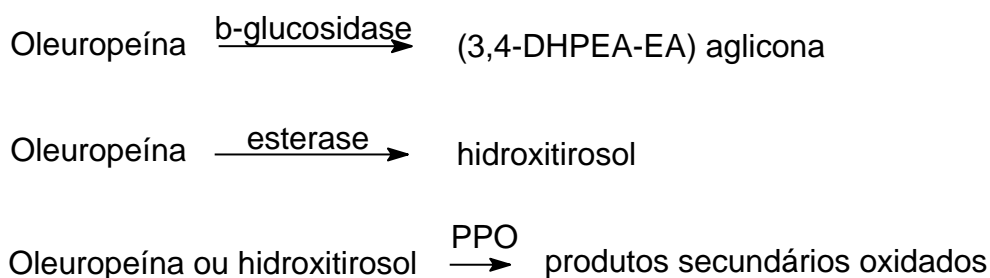
Diferentes produtos podem ser derivados da oleuropeína de acordo com o tipo de enzima. A β -glucosidase libera glicose formando principalmente a forma aldeídica

de oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) e a forma dialdeídica de descarboximetil oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EDA), enquanto as esterases hidrolisam as ligações éster da oleuropeína, produzindo derivados de glucosil, hidroxitirosol (3,4-DHPEA) e ácido elenólico (BRIANTE; PATUMI; FEBBRAIO; NUCCI, 2004; DE LEONARDIS *et al.*, 2015; MAZZUCA *et al.*, 2006; WANG; LI; HU, 2009).

Entre as enzimas oxidorreduções, as mais relevantes são certamente peroxidase e a PPO que é conhecida por catalisar a oxidação de o-dihidroxifenóis para o-quinonas que se condensam sucessivamente para formar os pigmentos escuros típico do escurecimento enzimático. (DE LEONARDIS *et al.*, 2015).

Resumidamente, os compostos considerados para a reação enzimática são relatados nas seguintes equações (Figura 4):

FIGURA 4 – Enzimas envolvidas na degradação da Oleuropeína

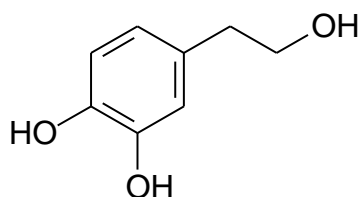


Fonte: A autora, 2020.

3.2.2 Aspectos Biofarmacêuticos do Hidroxitirosol (HT)

O HT possui fórmula molecular $C_8H_{10}O_3$ (Figura 6), peso molecular 154,16 g/mol, sob nome IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) 4-(2-hydroxyethyl)benzene-1,2-diol e CAS n.º 10597-60-1. Apresenta-se como um líquido claro incolor, com baixa solubilidade em água: 5g/100mL (25°C). Considerado um líquido irritante e inflamável com ponto de fulgor em 15°C (PubChem, 2020).

FIGURA 6 – Estrutura plana molecular HT



Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como tirosóis, membro da classe dos catecóis e um álcool primário. É derivado de um 2- (4-hidroxifenil) etanol. Estes são compostos orgânicos aromáticos contendo uma porção de álcool fenetílico que carrega um grupo hidroxila na posição 4 do grupo benzeno. O HT é pouco solúvel em água e considerado um ácido muito fraco (com base em seu pKa). Pode ser biossintetizado a partir de 2- (4-hidroxifenil) etanol, é encontrado em uma série de alimentos, como cravo, azeitona, vinho de uva, inclusive é um biomarcador potencial para o consumo desses produtos alimentícios (PubChem, 2020).

As propriedades bioativas do HT são realizadas por meio de vários mecanismos bioquímicos envolvendo a regulação das vias xenobióticas, interleucinas, prostaglandinas, fatores de transcrição e antioxidantes (BERTELLI *et al.*, 2020; MARKOVIC *et al.*, 2019; PERSIN *et al.* 2017; WANI *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2018).

Foram verificadas as seguintes atividades:

- O HT possui potencial antioxidante, anti-inflamatório e preventivo do câncer. Controle sobre radicais livres e evita o dano oxidativo ao DNA. Isso induz a apoptose e inibe a proliferação em células cancerosas suscetíveis (MARKOVIC *et al.*, 2019; PUBCHEM, 2020);
- No extrato de oliveira, o HT foi eficaz no tratamento de hiperpigmentações cutâneas, pela inibição significativa da enzima tirosinase. Além disso, diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) no combate aos radicais livres e na proteção aos danos celulares (cromossomos e mitocôndrias), ainda, estimulou a síntese de novos fibroblastos, aumentou a síntese de colágeno e elastina, através da diminuição da expressão de MMPs, metaloproteinases (MMP-1 e MMP-3) (HU *et al.*, 2014; JEON; CHOI, 2018; UCHIDA; ISHIKAWA; TOMODA, 2014);

- Conferiu atividade antitrombótica (D'ANGELO *et al.*, 2001; GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010; PASTOR *et al.*, 2016; TAKEDA *et al.*, 2014);
- Efeitos cardioprotetores, antiaterogênicos, antivirais (anti-HIV), antibacterianos, anticarcinogênicos, neuroprotetores, antidiabético e antiobesidade. Previne artrite, colite, por meio de seus efeitos nutrigenômicos e imunomoduladores. Mostra resultados promissores, contra diabetes, distúrbios nervosos, angiogênese, previne toxicidade de metais pesados, hemólise, oxidação de LDL, dano muscular e nefrotoxicidade. (BERTELI *et al.*, 2020; MARKOVIC *et al.*, 2019; PERSIN *et al.* 2017; WANI *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2018);
- Foi capaz de inibir a agregação plaquetária e a resistência à oxidação das lipoproteínas (VLDL e LDL), diminuindo o risco de desenvolvimento de ateroma. Diminuiu a atividade da lactase intestinal, lipase, maltase e sacarase e aumentou a atividade do Superóxido Dismutase (SOD), Catalase, e Glutathione Peroxidase. (HAMDEN *et al.*, 2010; HU; HE; JIANG; XU, 2014);
- Previu eventos inflamatórios precoces responsáveis pelo aparecimento de resistência insulínica e esteatose, reduzindo a inflamação hepática e o estresse nitrosativo e oxidativo restaurando a homeostase da glicose (PIROZZI *et al.*, 2016);
- O HT apresentou eficácia anti-inflamatória superior à prednisolona na redução dos escores clínicos da artrite (KAWAGUCHI; MATSUMOTO; KUMAZAWA, 2011);
- Apresentou atividades neuroprotetoras por formação de complexos não covalentes com o peptídeo beta amiloide, que é o principal componente proteico das placas senis formadas em várias doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson e Alzheimer (SCHAFFER *et al.*, 2016).

Estudos promissores:

- De Las Hazas *et al.* (2018), confirmaram que houve acúmulo de HT no cérebro de ratos, após uma dieta rica em HT e seus precursores, cujo

fato, demonstrou eficácia na proteção contra o estresse oxidativo principalmente em neurônios dopaminérgicos em células LUHMES, revelando um possível papel protetor nas doenças neurodegenerativas onde o estresse oxidativo é um marcador patológico. A degeneração de neurônios dopaminérgicos é particularmente relevante em Mal de Parkinson. Destacando o HT como um potencial composto dietético neuroativo para a doença de Parkinson.

- Elfiky (2020) comprovou mais uma propriedade inédita do hidroxitirosol presente no azeite de oliva, contra o SARS-CoV-2, vírus RNA. O HT tem moderada atividade na ligação de HSPA5 (proteína de choque térmico A5) presente na célula do hospedeiro. Desta forma, o HT interfere por competição, na eficácia da ligação do SARS-CoV-2 a estas proteínas específicas das células invadidas. Foi analisado como uma possibilidade de sucesso como agente anti-COVID-19 para pessoas com alto risco de estresse celular.

3.2.3 Hidroxitirosol (HT) no Mercado Brasileiro

Há diversos fornecedores no Brasil, credenciados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que comercializam extratos secos padronizados de Oliveira, com teores de HT que variam entre 3 a 20%.

A distribuidora brasileira de insumos farmacêuticos, LEMMA, traz a proposta do extrato seco de oliveira padronizado em 10% de HT, com nome comercial de Active Olea® (Figura 7). Dosagem usual: 300mg/dia (LEMMA, 2020).

FIGURA 7 – Lâmina técnica do fornecedor LEMMA

The image is a technical leaflet for 'Active Olea®' by LEMMA. It features a woman's face on the left, looking down at a splash of white liquid with golden olive branches. The LEMMA logo is in the top right. The text is in Portuguese, describing the product's benefits for skin health.

Active Olea®
Padronizado em 10% de hidroxitirosol
Polifenol da oliva com múltiplos
benefícios à saúde

Active Olea® é obtido através do fruto da oliveira padronizado em 10% de Hidroxitirosol. O Hidroxitirosol, composto fenólico da oliva, devido a sua ação no sistema antioxidante das células, contribui positivamente para a saúde cutânea, proporcionando aumento da hidratação, melhora da textura e uniformização do tom de pele. A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é amplamente conhecida, assim como os benefícios relacionados à saúde e bem-estar como um todo.

Fonte: Adaptado da LEMMA. Disponível em: <https://www.lemma.com.br/pt-br/produto/active-olea-hidroxitirosol>. Acesso: 03 set. 2020.

A empresa Biodiversité, trouxe ao Brasil o Bioblanc (Figura 8), extraídas das oliveiras do sul da França, contém os polifenóis como HT, Oleuropeína, Tirosol e Verbascoside. O teor de HT, no Bioblanc, é de 6,5%. Concentração usual para uso oral de 150mg a 1g e para uso tópico de 0,5% - 2% em sérums, cremes, loções e géis (BIODIVERSITÉ, 2018).

FIGURA 8 – Lâmina técnica da Biodiversité

...BIODIVERSITÉ
de A a Z...

BIODIVERSITÉ

COSMOS ORGANIC VEGAN CRUELTY FREE FARM TO FACE

BIOBLANC
IN&OUT

INCI name: *Olea Europea (olive) fruit extract*

As oliveiras cultivadas para a fabricação do **BioBlanc®** crescem em meio às plantações de lavanda (*Lavandula officinalis*) no Sul da França, o que as tornam ainda mais especiais por florescerem em um jardim aromatizado e rico em princípios ativos, 100% natural com certificação **Cosmos Ecocert**.

PRINCIPAIS PROPRIEDADES

- Ativa os proteassomos (atua na eliminação das células mortas);
- Combate e previne os danos causados pela radiação;
- Antioxidante;
- Inibe a tirosinase, enzima responsável pela síntese de melanina;
- Potente clareador;
- Potencializa a lipólise em adipócitos humanos;
- Protege e repara o DNA celular;
- Antiinflamatório, antimicrobiano e cicatrizante;
- Pode ser utilizado por gestantes;

CONCENTRAÇÃO USUAL

- USO IN: 150mg - 1g
- USO OUT: 0,5% - 2%

BIOBLANC
INDUSTY



Fonte: Adaptado de BIODIVERSITÉ. Disponível em: <https://business.google.com/website/biodiversite>. Acesso em: 03 set. 2020.

A Galena trouxe ao mercado brasileiro dois tipos de extratos de oliveira padronizados em HT: o Oli Olá™ (Figura 9) para uso oral, do fabricante francês Nerixa, com certificação Ecocert-Cosmos, com teor de HT em 3% e dosagem máxima recomendada diária de 300mg. E para uso tópico, o Hydrolive + (Figura 10), importado do fabricante espanhol Cobiosa, que contém 20% de HT. Concentração de uso (tópico): 0,2% a 1,0% (GALENA, 2020).

FIGURA 9 – Lâmina técnica cedido pela empresa Galena

Oli-Ola™
O Autêntico *Peeling* em Cápsulas

Ativo natural e orgânico, que contribui para o clareamento, renovação celular e produção de colágeno e elastina da pele

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é amplamente conhecida, assim como os benefícios relacionados à saúde e bem-estar. Especificamente nos derivados de oliva, a atividade antioxidante do hidroxitirosol é uma das mais altas entre os polifenóis, superando até mesmo os efeitos das vitaminas C e E.

Oli-Ola™ é um extrato 100% natural, extraído exclusivamente do fruto da oliveira, padronizado em 3% hidroxitirosol e certificado pelo Ecocert.

Sua produção ocorre na Tunísia, região sul do Mediterrâneo e a composição quantitativa de hidroxitirosol na oliva é resultado de uma complexa interação entre diversos fatores, como o clima, grau de maturação do fruto, cultivo e secagem da planta. O processo de obtenção e extração do Oli-Ola™ realizado pela Nexira é essencial para garantir que o produto final tenha 3% de hidroxitirosol.

Nome Científico
Olea Europaea Fruit Extract

Dose usual

- Ação *Peeling*: 300mg/dia
- Associado a outros ativos: 150 a 300mg/dia

Atributos do produto

- Ativo natural certificado pela Ecocert
- Promove ação mimética ao *peeling* tradicional, sem causar desconfortos e irritação cutânea

Fonte: Adaptado de GALENA. <https://www.galena.com.br/hubfs/L%C3%A2mina%20-%20Oli%20Ola.pdf?hsLang=pt-br> Acesso: 04 set. 2020.

FIGURA 10 – Lâmina técnica cedida pela empresa Galena

Galena®
HydrOlive+
O “plus” do *peeling* em cápsulas®
Uso *out* para potencializar a ação uniformizante e anti-inflamatória do Oli-Ola™

HydrOlive+ é um extrato natural da oliva de origem mediterrânica, composto por uma alta concentração de hidroxitirosol (20%), tirosol e outros polifenóis. Esta combinação produz efeitos sinérgicos, potencializando as propriedades antioxidantes.

HydrOlive+ possui potente ação clareadora, antioxidante e calmante comparado com a Vitamina E e Coenzima Q10, consequentemente promove maior efeito contra o eritema provocado pela exposição UV.

EFICÁCIA DO HYDROLIVE+

INCI Name
Olea Europaea (Olive) Fruit Extract, Glycerin, Water

Concentração de Uso
0,2% a 1,0%

pH de estabilidade
4 a 8

Fonte: Adaptado de GALENA. Disponível em: <https://www.galena.com.br/hubfs/Material%20T%C3%A9cnico/L%C3%A2mina/L%C3%A2mina%20-%20Hydrolive.pdf?hsLang=pt-br> Acesso: 04 set. 2020

3.3 NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE

O crescente interesse em pesquisas relacionadas à nanociência e nanotecnologia torna esta área, há décadas, um novo patamar do conhecimento com imensos impactos científicos e econômicos.

As nanociências e nanotecnologias constituem abordagens à investigação e desenvolvimento que se referem ao estudo dos fenômenos e manipulação de materiais às escalas atômica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente das de grande escala. É considerada uma área multidisciplinar de ciências aplicadas, cujo objetivo é a otimização de tratamentos no intuito de serem mais eficazes, específicos, flexíveis e de baixo custo (COIMBRA, 2013; DENG *et al.*; 2020; MIR *et al.*, 2017; MOTTALEB *et al.*, 2014).

Relacionada à saúde, a nanotecnologia é uma ciência promissora, e a maioria dos estudos sob investigação, estão focados no desenvolvimento de formulações destinadas ao tratamento de diversas doenças como câncer, cardiovasculares, neurológicas, ao combate do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) e entre outras ocorrências na medicina. (BOHOLM; LARSSON, 2019; BUSATTO *et al.*, 2019; DENG *et al.*, 2020)

Baseada no desenvolvimento de fármacos e medicamentos, surgem os “nanofármacos” que designa produtos farmacêuticos desenhados, com recurso à nanotecnologia e inclui a descoberta, desenvolvimento e administração do fármaco. Além disso, há pesquisas constantes em busca de inovações em matérias-primas e materiais dentro da ciência de nanomateriais. A *Nanotechnology Initiative* (NNI), criada no ano 2000 nos Estados Unidos (EUA), declarou que a nanotecnologia está ajudando a melhorar consideravelmente, até mesmo revolucionar, muitos setores de tecnologia e indústria: tecnologia da informação, energia, ciência ambiental, medicina, segurança nacional, segurança alimentar e transporte, entre muitos outros (BOHOLM; LARSSON, 2019; BUSATTO *et al.*, 2019; COIMBRA, 2013; DENG *et al.*, 2020; DIMER *et al.* 2013; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2019; MIR *et al.*, 2017).

A *European Medicines Agency* define a nanotecnologia como o uso de pequenas estruturas menores de 1.000 nanômetros de diâmetro, e seus benefícios são devido à gama de propriedades e interações que são exclusivas desta estrutura em nanoescala, como as nanopartículas entre 10 nm e 1.000 nm de diâmetro que possuem as características desejadas para um sistema de entrega bem-sucedido.

Devido ao seu tamanho de partícula, as nanopartículas podem se mover livremente no corpo por meio dos menores vasos capilares, células e lacunas de tecido para atingir seus órgãos-alvo. Os medicamentos nanotecnológicos oferecem comodidade e maior eficiência terapêutica para os pacientes. E, para as empresas, são capazes de estender a rentabilidade econômica dos medicamentos patenteados e criar uma fonte de receita extra (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; COIMBRA, 2013; DIMER *et al.*, 2013; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2019; WATKINS *et al.* 2015).

Os materiais utilizados na obtenção de formulações nanotecnológicas são selecionados de acordo com suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento. Os fármacos podem ser encapsulados por diferentes mecanismos, que incluem solubilização ou retenção na nanopartícula, conjugação ou adsorção. (DIMER *et al.* 2013; PERSIN *et al.*, 2017; WATKINS *et al.* 2015).

Nanoestruturas são ainda classificados em estruturas poliméricas e não poliméricas, incluindo nanopartículas, micelas, dendrímeros, fármacos, conjugados, nanopartículas metálicas e pontos quânticos. Com base em suas dimensões, os nanomateriais são classificados em quatro grupos, ou seja, materiais zero, um, dois e três nanodimensionais. Cada uma dessas nanopartículas tem suas próprias vantagens e desvantagens como veículo de liberação de medicamento. Por sua vez, os nanocristais representam uma estratégia de nanomização de fármacos pouco solúveis em água, de forma a aumentar a biodisponibilidade e propiciar vias de administração injetáveis. A quantidade e taxa no qual um medicamento é liberado de uma nanoformulação depende de uma infinidade de fatores, incluindo partículas tipo e tamanho, quantidade de medicamento encapsulado, composto natural usado e o microambiente, tais como temperatura, pH, osmolaridade ou via atividade enzimática (DIMER *et al.*, 2013; MITCHELL, 2018, MIR *et al.*, 2017; MOTTALEB *et al.*, 2014, WATKINS *et al.* 2015).

Os principais objetivos da liberação controlada do fármaco são: nanopartículas atuando como nanocarreadores, garantindo o aumento da biodisponibilidade, com capacidade de transportar o fármaco para um local de destino específico (receptor, sítio ativo) com maior segurança para exercer a sua atividade terapêutica e a diminuição dos efeitos colaterais se comparado as terapias convencionais; redução de forma significativa da concentração do fármaco no

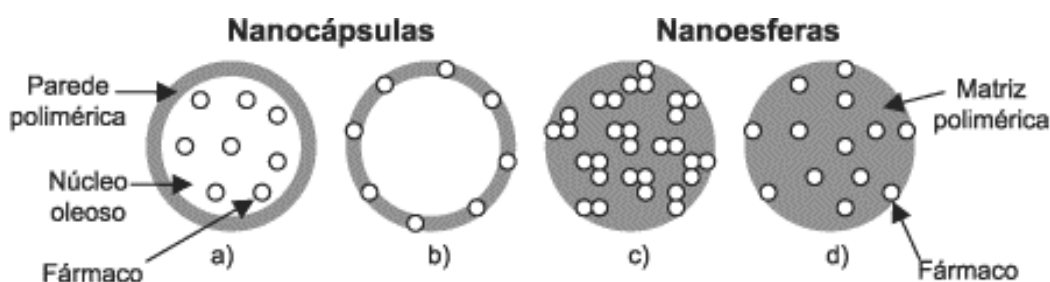
organismo; melhoria dos perfis farmacocinético e farmacodinâmico; na administração intravenosa de alguns fármacos, permitir o aumento de sua solubilidade; melhoria na estabilidade evitando a degradação do fármaco (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018; BUSATTO *et al.*, 2019; COIMBRA, 2013; DIMER *et al.* 2013; WATKINS *et al.* 2015).

Contudo, a formulação de nanoproductos, para uso farmacêutico, é muito mais desafiadora, pois um pré-requisito essencial no intuito de evitar qualquer instabilidade, na utilização dos materiais que se deseja formular, é saber se atingirão as necessidades terapêuticas, tais como ampliar a penetração na pele, prolongar seus efeitos, biocompatibilidade, e para isto, devem ser muito bem testados e analisados com testes laboratoriais (MOTTALEB *et al.*, 2014).

3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas representam uma alternativa tecnológica com excelente biocompatibilidade, não imunogênica, não tóxica e biodegradável. Estes sistemas são transportadores coloidais compostos de polímeros sintéticos ou naturais e são uma classe ampla de nanocarreadores. A mais importante classificação dessas nanopartículas consiste em separá-las em dois grandes grupos: os sistemas vesiculares (nanocápsulas) e os matriciais (nanoesferas) (Figura 11). As nanocápsulas contêm um núcleo cheio de fármaco, que é cercado por uma membrana de polímero. As nanoesferas são porosas e o fármaco é uniformemente distribuída entre os poros (BUSATTO *et al.*, 2019; DIMER *et al.*, 2013; WATKINS *et al.* 2015).

FIGURA 11 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

Nanocápsulas fornecem uma nanoestrutura única, consistindo em um núcleo líquido/sólido com uma “casca” polimérica. Isso é de interesse crescente na liberação controlada de medicamentos. O núcleo das nanocápsulas pode ser oco ou consistir em uma fase líquida ou sólida, tornando-o capaz de transportar fármacos diferentes. As nanocápsulas podem apresentar um núcleo oleico altamente adequado para a encapsulação de moléculas. Em relação ao núcleo oleoso, a fase oleica de composição ideal para a obtenção de nanocápsulas, são os óleos vegetais (como óleo de soja, óleo de palma etc.) ou ácidos graxos (como triglicerídeos de cadeia média), devido à capacidade de dissolver as drogas lipofílicas. O óleo, além de ser meio de dissolução de drogas, pode fornecer simultaneamente uma funcionalidade terapêutica (DENG, 2020).

Os poliésteres alifáticos e copolímeros relativos são polímeros sintéticos muito comuns e têm sido profundamente estudados e desenvolvidos como sistemas de liberação de fármacos, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo derivados dos ácidos acrílico e metacrílico ou derivados de cianoacrilato de alquila. Os poliésteres mais comuns incluem poli (ácido láctico) (PLA), poli (láctico-co-glicólico ácido) (PLGA) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL). Comparado com os copolímeros PLA e PLGA, os PCLs podem fornecer um período de degradação muito mais longo. Portanto, os PCLs são mais adequados para medicamentos de longo prazo com sistema de liberação controlada e/ou aplicações médicas. Além disso, os PCLs têm um custo menor do que os PLAs e PLGAs, o que é uma vantagem, e podem ser conjugados com os diversos polímeros naturais como gelatina, alginato, quitosana e albumina que também são utilizados para preparar as nanopartículas, no entanto, com desvantagens, como a difícil reprodutibilidade lote a lote. (DENG, 2020; DIMER *et al.*, 2013; ZHANG; CAMPAGNE; SALAÜN, 2019)

As nanopartículas poliméricas mais testadas, em combinação com produtos naturais, foram a Poli (láctico-co-glicólico ácido) (PLGA), polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), ácido poli-L-láctico (PLA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), e quitosana. São combinações mais comuns devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e o fato de serem fáceis de funcionalizar, se destacam, ainda, devido a sua alta eficiência na encapsulação de drogas lipofílicas, proteção contra a degradação do medicamento e baixa irritação devido ao seu polímero de revestimento. Entre esses polímeros, o PCL tem sido amplamente utilizado para obter a liberação controlada de fármacos, para controle no crescimento bacteriano de veículos farmacêuticos e de

embalagens, bem como na biomedicina para o tratamento de várias doenças. A nanopartícula de PCL inclusive, pode ser utilizada para administração intravenosa (ABRIATA *et al.*, 2019; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2019; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WATKINS *et al.* 2015).

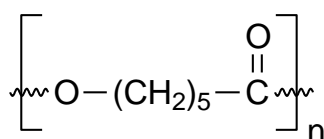
O fármaco, na nanopartícula, pode ser encontrado dissolvido, retido ou adsorvido na matriz polimérica. As principais técnicas de preparação das nanopartículas poliméricas são: polimerização *in situ*, polimerização interfacial, nanoprecipitação, deposição interfacial de polímero, emulsificação-difusão, emulsificação-evaporação de solvente, *salting out*, e ainda coacervação complexa. As propriedades dos polímeros exercem influência significativa na estabilidade, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e biodistribuição da nanocápsula como sistema de liberação de fármacos (DENG, 2020; DIMER *et al.*, 2013; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2019; WATKINS *et al.* 2015; ZHANG; CAMPAGNE; SALAÜN, 2019).

3.4.1 Poli-ε-caprolactona (PCL)

Poli-ε-caprolactona (PCL) é um polímero hidrofóbico que é composto por um éster polar e cinco grupos metileno não polares. É um polímero biocompatível, biodisponível e não tóxico. (ABAMOR *et al.*, 2018; BELTRAN *et al.*, 2014)

A Figura 12 representa a estrutura química do PCL.

FIGURA 12 – Estrutura química PCL



A escolha do material polimérico é uma questão de grande importância para obtenção de nanopartículas devido à variedade de polímeros existentes e suas influências no perfil de liberação, o tamanho da partícula e o potencial zeta do nanomaterial. Os poliésteres como PCL são materiais muito convenientes para a preparação de nanopartículas com aplicações médicas potenciais. Estes polímeros são frequentemente hidrofóbicos e são adequados para uso a longo prazo e fornece

estabilidade a fármacos insolúveis em água (DOS ANJOS CAMARGO *et al.*, 2020; ZHANG; CAMPAGNE; SALAÜN, 2019).

Nanopartículas de PCL também possuem estas características especiais, como alta permeabilidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, que as tornam estruturas ideais para a administração de fármacos que podem facilmente penetrarem através de barreiras vitais no corpo humano em nanoescalas e liberarem o fármaco, em um sistema sustentável e controlável para as células, tecidos e/ou órgãos-alvo. Além disso, uma vez que é aprovado pela *United States Food and Drug Administration (FDA US)*, a aplicação clínica de nanopartículas de PCL atraiu bastante o interesse dos pesquisadores (ABAMOR *et al.*, 2018; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; BELTRAN *et al.*, 2014).

Em particular, a hidrólise de ligações éster dentro do corpo humano favorece a degradação do polímero e uma liberação controlada dos fármacos, portanto, as nanopartículas de PCL, têm sido usadas como sistema de liberação de fármacos em regiões desejadas do corpo sendo útil no combate de várias doenças, além deste sistema de liberação prevenir a degradação do fármaco, por enzimas durante seu transporte dentro da corrente sanguínea (ABAMOR, *et al.*, 2018; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; BELTRAN *et al.*, 2014).

Entre os polímeros sintéticos biodegradáveis, o PCL tem sido amplamente utilizado além da liberação controlada de fármacos, no controle de crescimento bacteriano em veículos farmacêuticos e de embalagens, bem como na biomedicina para o tratamento de várias doenças, inclusive, para administração intravenosa (ABRIATA *et al.*, 2019; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2019; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WATKINS *et al.* 2015)

Polímeros biodegradáveis e/ou de base biológica mostram uma série de propriedades adequadas a diferentes aplicações, incluindo alimentos embalagens, automotivo e campos biomédicos (BELTRAN *et al.*, 2014; GARCÍA *et al.*, 2020).

Literaturas citam várias técnicas relatadas a fabricação de partículas ou cápsulas de PCL em micro ou nanoescala com estrutura e morfologia versáteis. Os métodos convencionais incluem emulsificação, secagem por pulverização, dispersão de solução aprimorada, separação de fases, evaporação de solvente e técnicas de fusão a quente (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; ZHANG; CAMPAGNE; SALAÜN, 2019).

Quando comparado a outros polímeros, a biodegradação do PCL é lenta; no entanto, poderá ser largamente utilizada com objetivo de sistema de liberação controlada pois a temperatura de transição vítrea (T_g) é de -60°C com baixo ponto de fusão ($59-64^\circ\text{C}$). A compatibilidade da mistura com outros polímeros facilita a adaptação das propriedades desejadas, como cinética de degradação, hidrofiliabilidade e mucoadesão (AJIBOYE A L; TRIVEDI V; MITCHELL J C, 2018).

Se comparado a outros, os polímeros de PCL mostraram-se úteis, em condições variadas, na liberação controlada de peptídeos e proteínas. Como exemplo, durante o desenvolvimento de microesferas de PCL para liberação controlada em diversas vacinas, comprovaram boa permeabilidade a proteínas, ao contrário do PLA e do PGA. Como o PCL degrada muito lentamente, ele não origina um ambiente ácido, que poderia afetar negativamente a antigenicidade das vacinas, portanto, poderá ser usado com alta efetividade. Ainda, o sistema de liberação de PCL não são afetados pelo fluido gástrico simulado, o qual confere proteção ao peptídeo encapsulado, evitando a destruição proteolítica no estômago, e permite que os fármacos aprisionados passem ilesos em direção ao intestino (AJIBOYE A L; TRIVEDI V; MITCHELL J C, 2018; ZHANG S; CAMPAGNE C; SALAÜN F, 2019).

3.4.2 Nanocápsulas de PCL e Hidroxitirosol (HT)

As nanopartículas podem ampliar a eficácia de muitos ativos e fármacos no tratamento e prevenção de doenças, aumentando sua biodisponibilidade. Muitos dos compostos naturais estudados, como a curcumina, resveratrol e epigallocatequina galato (EGCG), são altamente lipofílicos e substâncias com este perfil, não possuem uma liberação muito eficaz pois não há uma alta dissolução na corrente sanguínea, portanto, possuem baixa biodisponibilidade, levando a administração de grandes quantidades a fim de atingir a terapêutica desejada, o que aumenta a probabilidade de acarretar toxicidade aguda ou baixa adesão do paciente. O HT, por ser um ativo oleoso, se inclui nestas características. Uma solução interessante seria nanoencapsular o HT no intuito de melhorar sua solubilidade nos fluidos corporais e eficiência. (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; WATKINS *et al.* 2015).

O uso de materiais poliméricos para encapsular fármacos ou outras substâncias ativas é uma abordagem importante para mascarar as características físico-químicas inadequadas de várias substâncias (hidrofílicas ou lipofílicas medicamentos de alto peso molecular, palatabilidade, estabilidade e biodisponibilidade), facilitando sua penetração na pele e favorecendo a liberação controlada de bioativos compostos. Seu uso para aplicações biomédicas tem aumentado nas últimas décadas devido à sua biocompatibilidade e efeitos colaterais mínimos (BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY, 2019; MOTTALEB *et al.*, 2014).

O HT possui características que o torna viável para a nanoencapsulação, por ser um ativo oleoso, portanto, baixa solubilidade em água, palatabilidade amarga e instável no meio ambiente externo (altamente oxidável e fotossensível).

Publicações recentes mostraram:

- HT presente no extrato da folha de oliveira, incorporado em bio nanofibra (esteiras de nanofibra de polissacarídeos) feito por eletrofiação, com o objetivo de avaliar a liberação dos componentes fenólicos ativos no extrato, de forma prolongada, ao longo de 24 horas (PERSIN *et al.*, 2017);
- HT em nanopartícula polimérica de quitosana com hidrocortisona, mostrou-se seguro, bem tolerado e atóxico, sendo útil no tratamento de dermatite atópica (SIDDIQUE *et al.*, 2019);
- HT em nanocápsulas de PCL agregados em nanoargilas (Cloisite 30B – C30B) caracterizados como nanobiocompostos. Foi comprovado que a presença da nanoargila produziu uma diminuição na liberação de HT dos filmes de embalagens testados, devido a interação entre HT e C30B. Os resultados provaram que esses nanobiocompósitos poderão ser interessantes ambientalmente, por serem uma alternativa amigável para aplicações de embalagens alimentícias com performance antioxidante (BELTRAN *et al.*, 2014);
- HT em ciclodextrinas (β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina) foi publicada por LÓPEZ-GARCIA *et al.* (2010) com relevante ação fotoprotetora a irradiação UV ($1\frac{1}{4}254$ nm).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (Celtac, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a detector de fotodiodos (Shimadzu, modelo Nexera X2 System®, Quioto, Japão);
- Destilador de água (Fanem Ltda, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difrátmetro de raios X (Shimadzu, modelo XRD-6000, Quioto, Japão);
- Equipamento DSC/TG (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Evaporador rotatório (Fisatom, modelo 801, Diadema, Brasil);
- Metalizador (Shimadzu, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (Tescan, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- pHmetro digital (Hanna, HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (Fisatom, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Ultrafreezer (Revco, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos);
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Nano ZS 90, Malvern Reino Unido).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Hidroxitirosol – HT (fabricação: 28/03/2019, CAS: 10597-60-1, 98,99% (m/m) de pureza, Abacipharm Corporation, Columbia, USA).

4.2.2 Polímero

- Poli(ϵ -caprolactona) (\overline{M}_w 14.000 g/mol, Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil).

4.2.3 Água Purificada

- Água purificada pelo processo de destilação (H₂O destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Água ultrapurificada pelo sistema de ultrapurificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

4.2.4 Solventes e Demais Reagentes

- Acetona ((CH₃)₂CO) (Synth, Diadema, Brasil);
- Ácido Fórmico (CH₂O₂) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Acetonitrila (C₂H₃N) grau HPLC (Hexis Científica, Phillispsburg, Estados Unidos);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Metanol (CH₃OH) grau HPLC (Hexis Científica, Phillispsburg, Estados Unidos);
- Monooleato de sorbitano etoxilado 80 (polissorbatato 80, Tween[®] 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®], OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

4.2.5 Materiais

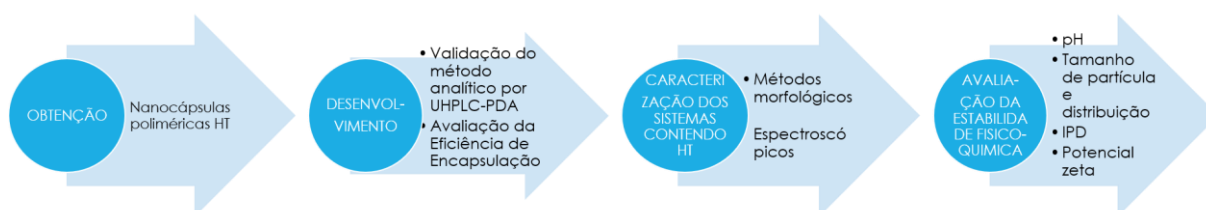
- Amicon[®] Ultra – 0,5mL, dispositivo de ultrafiltração com membrana de celulose regenerada 10000 Da, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda;

- Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,20 μm de abertura dos poros, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente trabalho teve início com o desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas. Consequente, houve a quantificação do fármaco incorporado nas partículas realizado por meio da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector de fotodiodos (UHPLC-PDA), validado de acordo com a Resolução 166, de 24 de julho de 2017, avaliando, assim, a eficiência de encapsulação do HT. As formulações foram caracterizadas por métodos morfológicos e espectroscópicos, e foi investigada a estabilidade físico-química. As etapas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 13.

FIGURA 13 – Fluxograma das etapas da pesquisa



Fonte: A autora, 2020.

4.4 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO HIDROXITIROSOLO (HT)

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir do polímero PCL contendo HT foram preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por Fessi, *et al.* (1989) e Dos Anjos Camargo, *et al.* (2020), cuja formulação encontra-se na Tabela 2.

TABELA 2 – Formulações das nanocápsulas poliméricas contendo HT, obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado

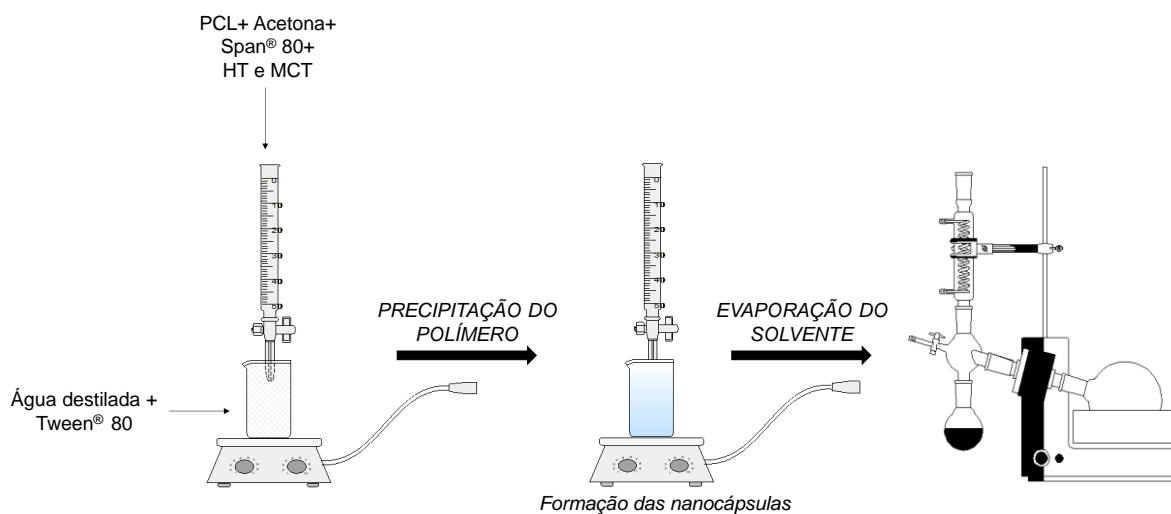
Composição	Formulação		
	NC-0	NC-2	NC-5
	(0 mg/mL)	(2 mg/mL)	(5 mg/mL)
Fase aquosa			
Tween 80® (g)	0,077	0,077	0,077
Água ultrapura (mL)	53	53	53
Fase orgânica			
HT (g)	–	0,02	0,05
PCL (g)	0,1	0,1	0,1
Span 80® (g)	0,077	0,077	0,077
MTC* (g)	0,3	0,3	0,3
Acetona (mL)	27	27	27

*MTC: Triglicerídeos de cadeia média

Fonte: A autora, 2020.

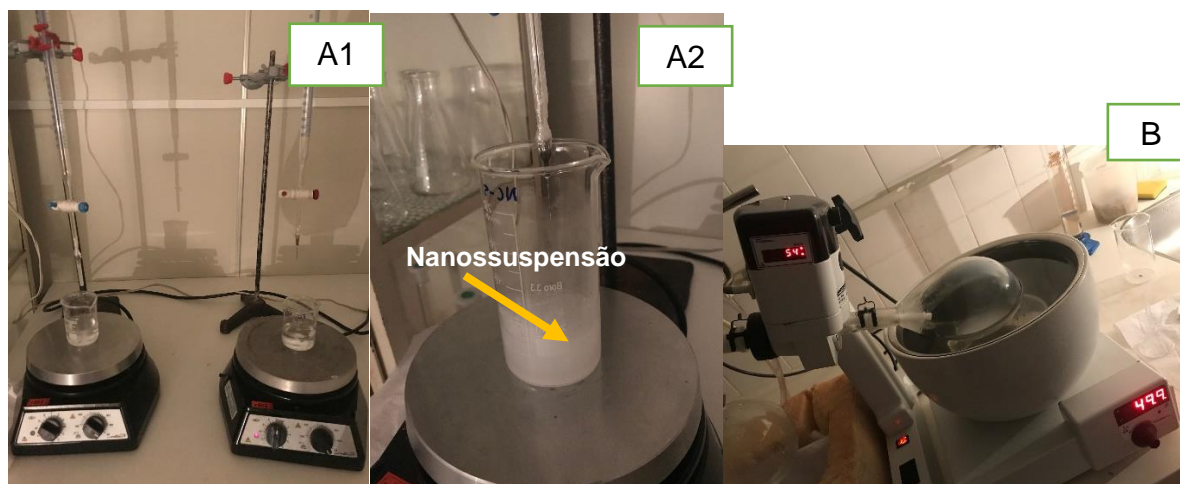
Constituindo a fase orgânica, o polímero foi solubilizado em acetona na presença de Span® 80, HT e MTC. Para a fase aquosa, foi adicionado o Tween® 80 e agitado magneticamente para incorporação do tensoativo. A fase orgânica após alguns minutos em agitação moderada foi adicionada na fase aquosa sob gotejamento e agitação vigorosa. Ao final, a suspensão foi mantida em agitação por mais 10 minutos e o solvente orgânico eliminado em rotaevaporador atingindo um volume final de 10 mL e concentração de HT de 2 mg/mL (NC-2) e 5 mg/mL (NC-5), além do controle (NC-0). As Figuras 14 e 15 demonstram o esquema do método de obtenção das nanocápsulas.

FIGURA 14 – Esquema do método de obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo HT preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado



Fonte: A autora, 2020.

FIGURA 15 – Método para obtenção das nanocápsulas poliméricas contendo HT preparadas pela deposição interfacial do polímero pré-formado. (A1 e 2) Nanoprecipitação, (B) Evaporação do solvente por evaporador rotatório



Fonte: A autora, 2020.

4.4.1 Mistura Física

A mistura física (MF) na proporção, em massa, de 1:1 (HT:PCL) (50% m/m) foi preparada para uma caracterização comparativa.

4.5 DETERMINAÇÃO DO HIDROXITIRO SOL (HT) INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS

A concentração do HT encapsulado nas nanocápsulas poliméricas (mg/mL) foi determinada a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC), em equipamento Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Quioto, Japão), com bomba (LC-30AD), desgaseificador (DGU-20A5RA), autosampler (SIL-30 AC), forno (CTO-20A), módulo integrador (CMB-20^a) e um detector DAD (SPD-M20A), conforme parâmetros estabelecidos na Tabela 3.

TABELA 3 – Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do Hidroxitiro sol por UHPLC

Parâmetro	Descrição
Coluna	Shim-pack XR-ODS III, 200 mm x 2 mm, 2,2 µm, acoplada à pré-coluna C18
Fase móvel	Metanol+acetonitrila (1:1):Água acidificada com 0,01% de ácido fórmico (20:80, v/v)
Fluxo	0,45 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Detector PDA UV-Vis	λ 280 nm
Temperatura do amostrador	8 °C
Temperatura da coluna	35 °C
Tempo de corrida	2,5 min
Tempo de retenção	2,0 min

Fonte: A autora, 2020.

Previamente, o método analítico foi validado conforme descrito a seguir. A aquisição e processamento dos dados foram obtidos com o software LabSolutions® versão 5.73. A solução mãe e as diluições foram preparadas em metanol:água (50:50, v/v).

4.5.1 Validação do Método Analítico para Quantificação do Hidroxitirosol

A validação do método analítico foi desenvolvida conforme o preconizado na Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e com as recomendações da *The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005).

Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, análise de resíduos, limite de detecção, limite de quantificação, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Após, executado a eficiência da encapsulação.

A seletividade foi determinada pela análise do cromatograma das nanocápsulas preparadas sem fármaco (NC-0) em comparação com o cromatograma do HT numa concentração de 55 µg/mL com a intenção de confirmar que a formulação e o processo de preparo das nanocápsulas não interferem na quantificação do fármaco.

Para o estudo de linearidade foram elaboradas três curvas analíticas com sete pontos de concentrações diferentes (10, 25, 40, 55, 70, 85 e 100 µg/mL), como preconizados na RDC 166/17, utilizando a fase móvel (20:80 metanol:acetonitrila (1:1): água acidificada com 0,1% de ácido fórmico) como solvente. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos. A análise de regressão linear ocorreu pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por Análise de Variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados, por meio da relação entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (σ) e a média dos coeficientes angulares das curvas (IC), utilizando fatores multiplicadores sugeridos pela ICH (2005), conforme as Equações 1 e 2.

$$LD = \left(\frac{3,3\sigma}{IC} \right) \quad (1)$$

$$LQ = \left(\frac{10\sigma}{IC} \right) \quad (2)$$

A repetibilidade foi avaliada por meio da análise de seis réplicas de mesma concentração (55 µg/mL) e três concentrações diferentes (20, 50 e 80 µg/mL),

totalizando nove determinações em diferentes períodos de um mesmo dia (manhã, tarde e noite), pelo mesmo analista, utilizando um mesmo instrumento.

A precisão intermediária foi determinada pela análise nas mesmas concentrações utilizadas para a repetitividade, porém as medidas foram realizadas em dias diferentes, com analistas diferentes, ainda empregando o mesmo instrumento. Os resultados destas análises foram expressos na forma de Desvio Padrão Relativo (DPR), de acordo com a equação abaixo (3), onde DP é o desvio padrão da série de medições e CMD a concentração média determinada. A análise estatística dos resultados foi realizada por Teste-t com $p < 0,05$.

$$CV = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (3)$$

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade conhecida de hidroxitirosol (5,0 µg) às soluções de 30,0; 60,0 e 80,0 µg/mL, resultando nas concentrações teóricas finais de 35,0; 65,0 e 85,0 µg/mL, respectivamente. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de recuperação, a partir da Equação 4, onde CME é a concentração média experimental e CT a concentração teórica.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CME}{CT} \times 100 \quad (4)$$

Na avaliação da robustez, soluções de HT a 55 µg/mL foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna analítica e variação da composição da fase móvel. O fluxo foi modificado de 0,45 mL/min para 0,445 mL/min e 0,455 mL/min. A temperatura da coluna analítica foi alterada de 35 °C para 33 °C e 37 °C. A variação da composição da fase móvel variou de 20:80 para 19:81 (metanol+acetonitrila:água acidificada) e 21:79 (metanol+acetonitrila:água acidificada). Os resultados dos parâmetros foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos em condições padrão. A significância dos resultados foi verificada por teste Tukey com $p < 0,05$.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

4.6.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média da amostra em triplicata.

4.6.2 Análises Morfológicas e de Superfície

4.6.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O tamanho médio de partícula, o índice de polidispersão (IPD) (distribuição do tamanho de partícula) e o potencial zeta foram medidos em triplicata ($n=3$), após a diluição de uma alíquota conhecida da suspensão de nanocápsulas em água ultrapurificada (1:500) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). Para verificar a diferença estatística entre os diâmetros médios, foi realizado teste ANOVA entre os valores da média dos resultados.

4.6.2.2 Análise da morfologia e superfície

A avaliação morfológica e da superfície dos materiais de partida e das nanocápsulas preparadas foi realizada em microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM) (Tescan, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em um metalizador IC-50 Ion Coater (Shimadzu, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 8 a 10 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.6.3 Análise Estrutural

4.6.3.1 Análise por difração de raios X

O HT puro, os polímeros, a MF e as nanocápsulas poliméricas foram examinadas por difração de raios X em difratômetro Shimadzu XRD-6000, *scan* de 2 °/min e 2θ de 3° a 80°, radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.6.3.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

As formulações foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu, Quioto, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 64 scan/min. Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco (HT) puro, polímero (PCL), MF e da formulação sem a adição do HT (NC-0).

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

As suspensões foram armazenadas em geladeira ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e protegidas da luz em frascos de vidro âmbar. As formulações foram monitoradas durante 120 dias de armazenamento, verificando mensalmente o pH, tamanho de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

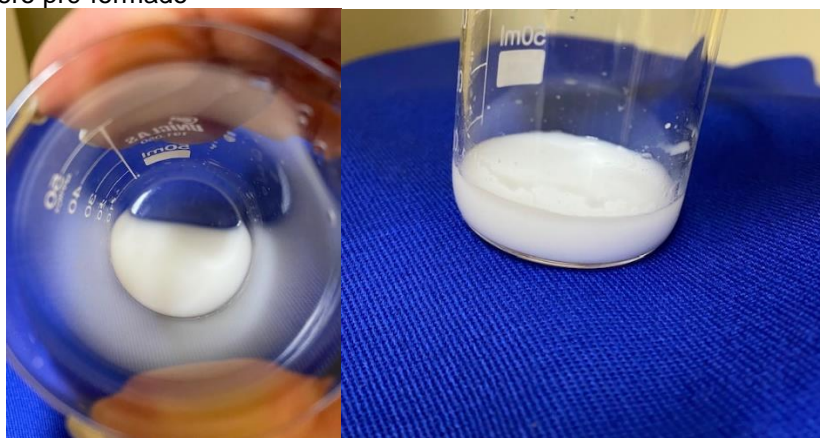
Todos os dados resultantes da estabilidade foram avaliados pelo programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A ANOVA com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student foi usada para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO HIDROXITIRO SOL

As nanocápsulas de PCL contendo HT (NC-2 e NC-5) e as nanocápsulas controle negativo (NC-0) foram obtidas com sucesso pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Todas as formulações apresentaram visivelmente o aspecto leitoso ao final do preparo (Figura 16). As concentrações utilizadas de HT (2 e 5 mg/mL) para as formulações foram escolhidas pela referência da dosagem usual preconizada em artigos citados no FDA (2020), Pubchem (2020), e nos materiais técnico-científicos de fornecedores brasileiros legalizados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), como Biodiversité (2020), Galena (2020), Lemma (2020).

FIGURA 16 – Nanossuspensão de PCL contendo HT obtidas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado



Fonte: A autora, 2020.

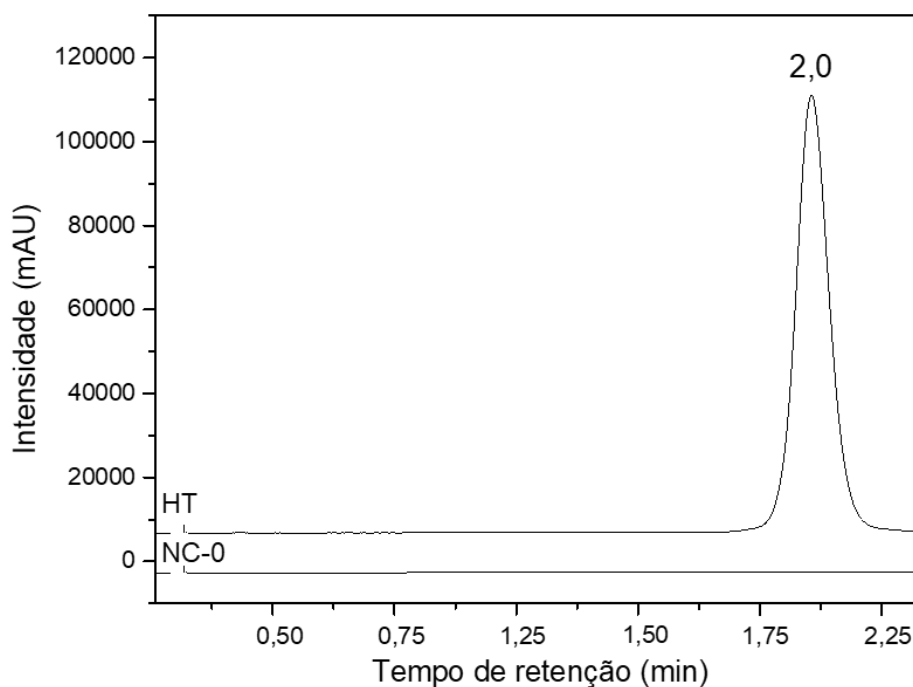
5.2 DETERMINAÇÃO DO HIDROXITIRO SOL INCORPORADO NAS NANOCÁPSULAS

5.2.1 Desenvolvimento e Otimização do Método Analítico

As condições cromatográficas mais adequadas para otimização, validação do método e quantificação do HT incorporado nas nanocápsulas foram a fase móvel metanol+acetonitrila (1:1) : água acidificada com 0,01% de ácido fórmico (20:80, v/v),

temperatura da coluna de (35 ± 2 °C), volume de injeção da amostra de 10 µL, fluxo isocrático de 0,45 mL/min, detector ajustado a 280 nm e tempo de análise de 2,5 min. A Figura 17 demonstra o cromatograma do método desenvolvido.

FIGURA 17 – Cromatograma de UHPLC correspondente ao padrão de Hidroxitirosol (55 µg/mL). Fase móvel: metanol+acetonitrila (1:1): água acidificada com 0,01% de ácido fórmico (20:80, v/v); Fluxo: 0,45 mL/min; Comprimento de onda de detecção: 280 nm; Temperatura da coluna: (35 ± 2 °C) e volume de injeção: 10 µL e cromatograma da nanocápsula preparada sem o fármaco: NC-0 em comparação com o do HT



Fonte: A autora, 2020.

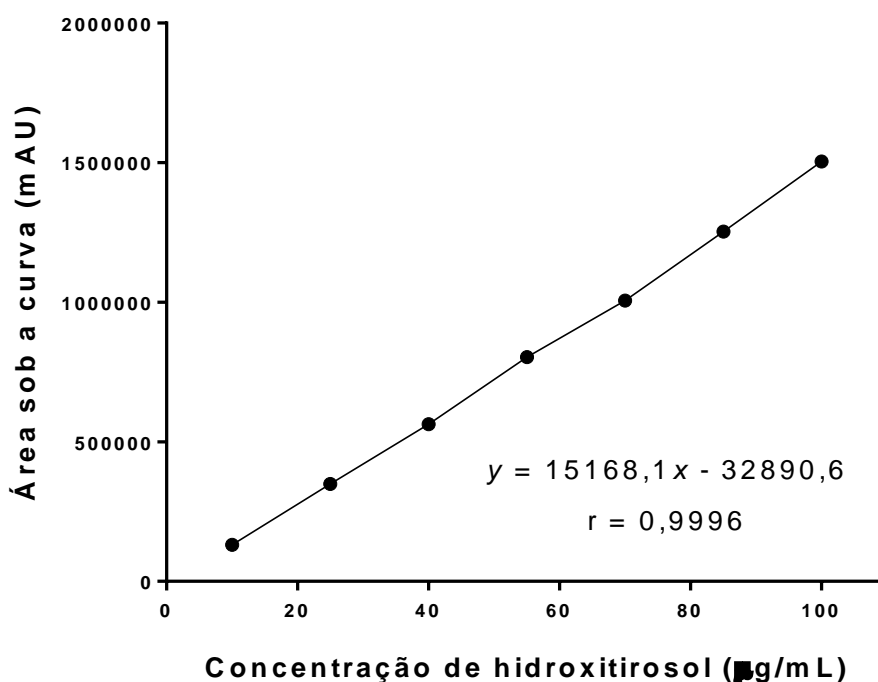
5.2.2 Validação do Método Analítico para a Quantificação do Hidroxitirosol

O método foi validado conforme o preconizado na RDC 166, de 24 de julho de 2017 e com as recomendações da ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de quantificação e detecção, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

O método desenvolvido para quantificação do HT mostrou-se seletivo e o detector indicou que o pico cromatográfico do fármaco não apresentou interferentes, já que não houve sobreposição de leitura da formulação NC-0 no tempo de retenção do HT (Figura 18), indicando que nenhum componente da formulação apresentou absorção neste comprimento de onda.

A linearidade assegurou que o método foi capaz de obter resultados proporcionais de concentração de analito, dentro de uma faixa de trabalho previamente definido. Para isso, o teste foi realizado em sete concentrações diferentes do analito. A curva analítica média obtida foi representada na Figura 18.

FIGURA 18 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação do HT obtida por UHPLC na faixa de concentração de 10 a 100 µg/mL (n = 3)



Fonte: A autora, 2020.

Por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de coeficiente angular (inclinação da reta), coeficiente linear (intercepto com o eixo y) e coeficiente de correlação (r) e quanto este for mais próximo de 1,00 menor é a dispersão entre os pontos e maior a segurança dos resultados (BRASIL, 2017; DE LEONARDIS *et al.*, 2015; PAULO; SANTOS, 2020; PIÑERO *et al.*, 2011; RIBANI *et al.*, 2004; TSIMIDOU *et al.*, 2019). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4, o qual a equação obtida pelo método foi $y = 15168,1x - 32890,6$, sendo y, a área do pico e x, a concentração da solução padrão em µg/mL (Tabela 4).

Os valores de LD e LQ encontrados foram, respectivamente, 1,09 e 3,31 µg/mL, assegurando a viabilidade de aplicação do método dentro da faixa de trabalho definida.

TABELA 4 – Dados obtidos por meio da análise da regressão linear

Linearidade	
Faixa linear	10 – 100 µg/mL
Limite de Detecção	1,09 µg/mL
Limite de Quantificação	3,31 µg/mL
Dados de regressão	
<i>N</i>	3
Inclinação (α)	15168
Desvio Padrão da Inclinação	267
Desvio Padrão Relativo da Inclinação (%)	1,76
Intercepto (<i>b</i>)	-32890,33
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,9996

* $y = ax + b$, onde x é a concentração do composto e y é a área sob a curva
 Fonte: A autora, 2020.

A Tabela 5 demonstra a análise dos resíduos. Foi possível observar que os resíduos são independentes e homogeneamente distribuídos, justamente porque o F do modelo ficou maior que o F_{tab} indicando que a linearidade está de acordo com o esperado, além de o F da falta de ajuste ser menor que o F_{tab} confirmando que o erro ocorrido não foi por falta de ajuste e sim por erro puro. Com isso, os resultados de linearidade são confiáveis e verdadeiros.

TABELA 5 – Análise dos resíduos dos dados

	SS	DF	MS	F	F_{tab}
Modelo	4.348351E+12	1	4.348351E+12	8274.273	2,990
Resíduo	9.985007E+09	19	5.255267E+08	Linear	
Falta de ajuste	3.742601E+09	5	748520108	1,678725	2,307
Erro puro	6.242406E+09	14	445886164	Não há falta de ajuste	

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado

Fonte: A autora, 2020.

A repetitividade expressa a precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo e a precisão intermediária, expressa como variação intradia, interdía e com diferentes analistas. Os valores de DPR (Tabela 6) obtidos foram inferiores a 5,0%, e a análise estatística ($p < 0,05$) mostrou que os resultados não possuem diferença significativa, indicando, portanto, que o método foi considerado preciso.

TABELA 6 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária

	Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$, Média \pm DP*)	DPR** (%)
Repetitividade			
n = 6	55	55,07 \pm 0,34	0,61
n = 3	20	20,55 \pm 0,25	1,24
n = 3	50	49,05 \pm 0,16	0,32
n = 3	80	79,90 \pm 1,13	1,42
Precisão intermediária			
Intradia			
n = 6	55	54,87 \pm 0,40	0,74
n = 3	20	20,41 \pm 0,27	1,34
n = 3	50	48,80 \pm 0,33	0,67
n = 3	80	79,56 \pm 1,03	1,29
Interdia			
n = 6	55	55,34 \pm 0,49	0,89
n = 3	20	20,55 \pm 0,23	1,10
n = 3	50	49,08 \pm 0,16	0,32
n = 3	80	79,90 \pm 0,99	1,24
Diferentes analistas			
n = 6	55	55,44 \pm 0,56	1,01
n = 3	20	20,46 \pm 0,26	1,29
n = 3	50	49,46 \pm 0,47	0,95
n = 3	80	79,60 \pm 1,02	1,28

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

Fonte: A autora, 2020.

Os resultados encontrados para a exatidão comprovaram a concordância entre os dados obtidos frente a um valor de referência real. A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade conhecida de HT (5 μg) às soluções de 30; 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$, resultando nas concentrações teóricas finais de 35; 65 e 85 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O valor de DPR também deve ser menor que 5% (Tabela 7).

TABELA 7 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de exatidão

Concentração teórica final ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (% \pm DP*)	DPR** (%)
35	91,10 \pm 3,17	3,48
65	102,31 \pm 4,80	4,69
85	97,14 \pm 2,10	2,16

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

Fonte: A autora, 2020

O método também foi avaliado quanto a habilidade de suportar pequenas variações nas condições de análise, sem comprometer a sua exatidão. A avaliação da robustez do método analítico foi baseada nos valores de DPR obtidos a partir da alteração dos parâmetros de análise, tais como a temperatura da coluna analítica (33 e 37 °C), o fluxo isocrático (0,445 e 0,455 mL/min), e composição da fase móvel (19:81 e 21:79 v/v) – Tabela 8.

TABELA 8 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de robustez

Parâmetros iniciais	Alteração	DPR* (%)
Fluxo	0,445	0,87
0,45 (mL/min)	0,455	1,09
Proporção da fase móvel	19:81	0,67
20:80 (V/V)	21:79	1,11
Temperatura	33	0,67
35 °C	37	1,15

* DPR: desvio padrão relativo

Fonte: A autora, 2020.

Avaliando os resultados obtidos o método foi considerado seletivo, linear, preciso, exato e robusto e, portanto, foi devidamente validado. Diante disso foi possível concluir que se trata de um método capaz de quantificar o HT incorporado nas nanopartículas fornecendo resultados confiáveis.

5.2.3 Eficiência de Encapsulação

O teor de fármaco e a eficiência de encapsulação (EE) do HT em nanocápsulas de PCL foram realizados pelo método indireto no UHPLC-PDA previamente validado e os resultados obtidos estão representados na Tabela 9. Altas concentrações do fármaco foram obtidas para nanocápsulas, o que levou a valores de EE mais elevados que 99,52%.

TABELA 9 – Teor de HT incorporado nas nanocápsulas de PCL (mg/mL) e eficiência de encapsulação (EE %)

Formulação	Concentração encapsulada ($\mu\text{g/mL}$; Média \pm DP)	Eficiência de encapsulação	
		% \pm DP	DPR
NC-2*	1904,51 \pm 0,81	99,52 \pm 0,00	0,01
NC-5**	4904,47 \pm 3,82	99,81 \pm 0,01	0,01

*Concentração teórica (2000 $\mu\text{g/mL}$); **Concentração teórica (5000 $\mu\text{g/mL}$); DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Fonte: A autora, 2020.

Os resultados atuais são melhores do que os relatados nos estudos encontrados na literatura. A encapsulação de HT em nanopartículas de ácido poli (lático) revestidas com polímero de β -ciclodextrina apresentou EE de 92,6% (SCOULLOS *et al.*, 2015). Lipossomas contendo HT solúvel em água, a EE foi de 45,08% (YUAN *et al.*, 2017). Em nanoestruturas de lipídios carregadas com azeite de oliva contendo HT, e outros fármacos, revelaram valores de EE entre 82% a 88% (GRAFU, BADEA, BALACI, 2015). Ainda, HT em nanopartículas de quitosana preparadas por reticulação iônica alcançaram valores de EE entre 33% a 63% (HUSSAIN *et al.*, 2013).

Portanto, o método validado foi aplicado com sucesso para a determinação do HT em nanocápsulas de PCL e pode ser considerado uma ferramenta importante para o controle de qualidade destas formulações.

5.3 DETERMINAÇÃO DO pH

A Tabela 10 mostra os valores adquiridos para do pH das nanossuspensões quando foram formuladas.

TABELA 10 – Valores obtidos de pH logo após a obtenção das suspensões de nanocápsulas

Formulações	Média	DP*
NC-0	6,10	\pm 0,35
NC-2	6,12	\pm 0,10
NC-5	5,99	\pm 0,02

*DP = desvio padrão (n = 3)

Fonte: A autora, 2020.

Como foi possível notar, as formulações apresentam um caráter ácido e isso é devido ao polímero PCL ser um poliéster alifático, que possui grupamentos carbonilas conferindo essa característica ao pH (DIMER *et al.*, 2013; MITCHELL, 2018, MIR *et al.*, 2017; MOTTALEB *et al.*, 2014; WATKINS *et al.*, 2015).

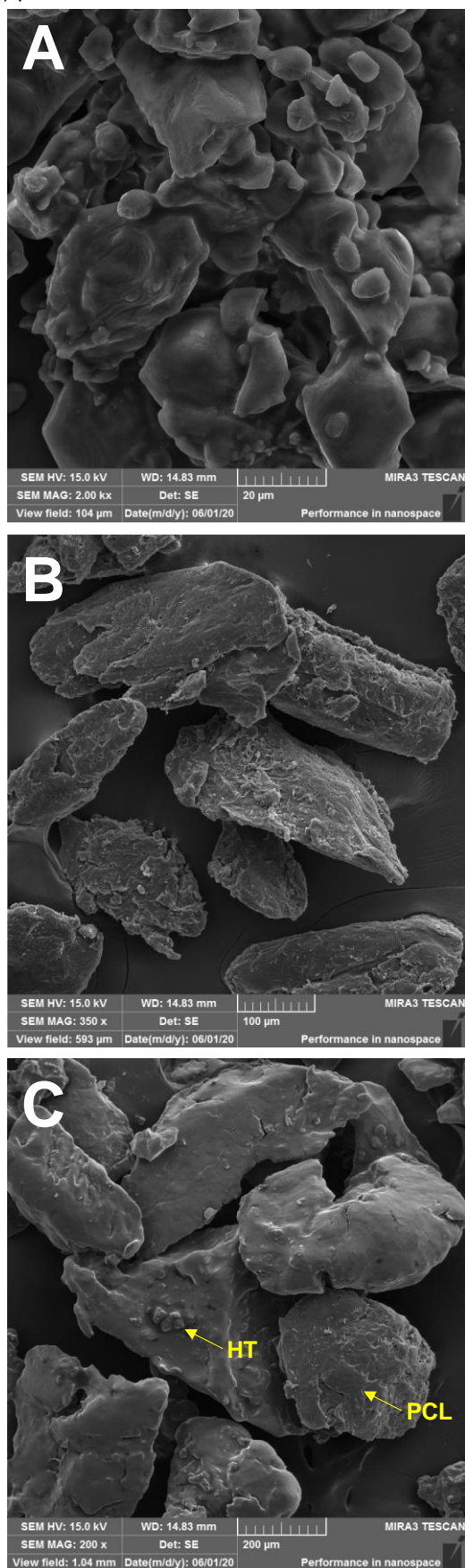
5.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA E SUPERFÍCIE

5.4.1 Análise da Morfologia e Superfície

Os resultados obtidos por FEG-SEM para o HT, PCL e MF estão indicados na Figura 18 e foi possível verificar que o fármaco (Figura 18 a) apresentou superfície cristalina e irregular. O PCL (Figura 18 b) mostrou-se com partículas de superfície levemente irregular, com aspecto visual quebradiço, enquanto na MF foi possível observar um emaranhado das duas substâncias (Figura 18 c).

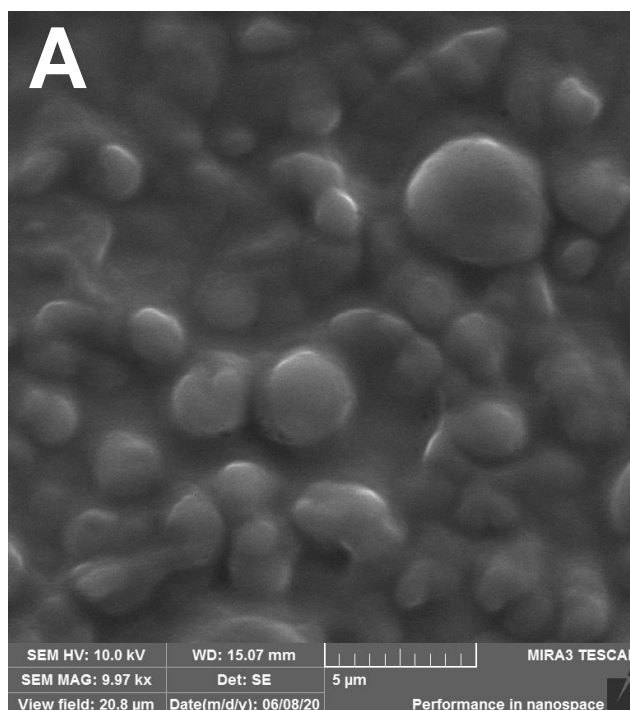
Para as nanocápsulas poliméricas, foi possível observar partículas com formato esférico levemente irregulares, superfície lisa e uniforme (Figura 19) e em nenhuma foi possível verificar a presença do fármaco na parte externa, indicando a sua encapsulação, condizente com o encontrado na literatura sobre nanopartículas (AJIBOYE *et al.* 2018; DENG *et al.*, 2020; FESSI *et al.*, 1989).

FIGURA 18 – Aspectos morfológicos do HT puro (a), do PCL triturado (b) e da mistura física PCL:HT(1:1) (c) por FEG-SEM



Fonte: A autora, 2020.

FIGURA 19 – Fotomicrografias das nanocápsulas poliméricas contendo HT



Fonte: A autora, 2020.

5.4.2 Determinação do Diâmetro Médio e do Potencial Zeta

Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanocápsulas poliméricas contendo HT estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 – Valores obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanocápsulas poliméricas contendo HT

Formulação	Diâmetro médio (nm)		Índice de Polidispersão		Potencial Zeta (mV)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
NC-0	271,17	± 1,07	0,20	± 0,01	-47,40	± 8,20
NC-2	279,80	± 3,46	0,22	± 0,00	-44,85	± 2,47
NC-5	267,50	± 3,77	0,19	± 0,03	-40,55	± 3,61

*Teste estatístico ANOVA 1 via. **DP = desvio padrão (n = 3).

Fonte: A autora, 2020.

Em todas as formulações foi possível encontrar a presença de nanocápsulas poliméricas com diâmetro médio entre 267,50 nm (formulação NC-5) e 279,80 nm (formulação NC-2). Segundo teste estatístico realizado, não há diferença significativa entre as formulações, indicando que todas possuem diâmetro médio similares.

Diversos trabalhos apontam que as nanopartículas poliméricas geralmente apresentam diâmetro entre 100 e 300 nm e isso acontece por causa da formulação, do método de preparo e da natureza do óleo utilizado no núcleo (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018; BATHIA, 2016; BHATTACHARYA; GHOSH; MUKHOPADHYAY; 2019; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2019; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Em relação ao IPD, todas as formulações revelaram valores inferiores a 0,3, o que indica distribuição homogênea do tamanho das nanocápsulas poliméricas.

O potencial zeta determinado nas nanocápsulas de PCL indica estabilidade eletrostática das partículas, já que ele reflete indiretamente o potencial de superfície das mesmas e o valor para isso deve ser maior que $|30 \text{ mV}|$. O valor negativo foi devido a natureza aniônica do polímero, portanto, as formulações apresentaram-se de acordo.

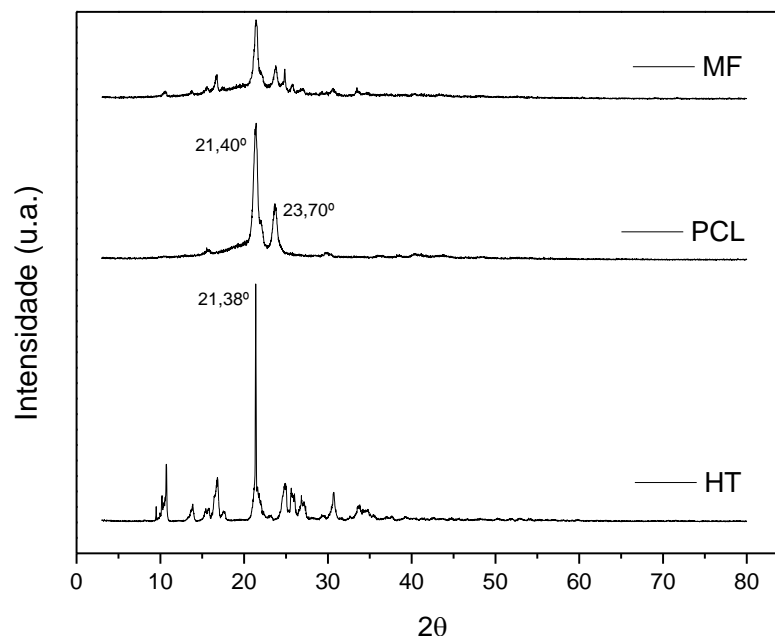
Os valores de tamanho de partícula e as propriedades da superfície podem desempenhar um papel importante na sua bioatividade, influenciando a liberação *in vitro* do fármaco, já que o menor tamanho da partícula leva a uma maior área superficial, o que resulta na rápida liberação do ativo. Em contrapartida, a característica negativa da superfície, promove o aumento de permanência no sangue. (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018; BATHIA, 2016; BUSATTO *et al.*, 2019; DIMER *et al.* 2013; PERSIN *et al.*, 2017; WANG; LI; HU, 2009; WATKINS *et al.* 2015).

5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL

5.5.1 Análise por Difração de Raios X

Na Figura 20 é possível verificar os difratogramas do HT, PCL e MF. Em relação ao fármaco puro, foi possível observar picos indicando cristalinidade entre 10 e 40°, com um proeminente em 21,38°, como encontrado na literatura (BELTRAN *et al.*, 2014; BONECHI *et al.* 2019; JUN-LING; JIAO-JIAO, 2018), enquanto o PCL possui os típicos dois picos cristalinos, indicando a sua semi-cristalinidade ($2\theta = 21,45$ e $23,73^\circ$) (BELTRAN *et al.*, 2014; DOS ANJOS CAMARGO, 2020). A MF demonstra uma sobreposição dos dois difratogramas isolados.

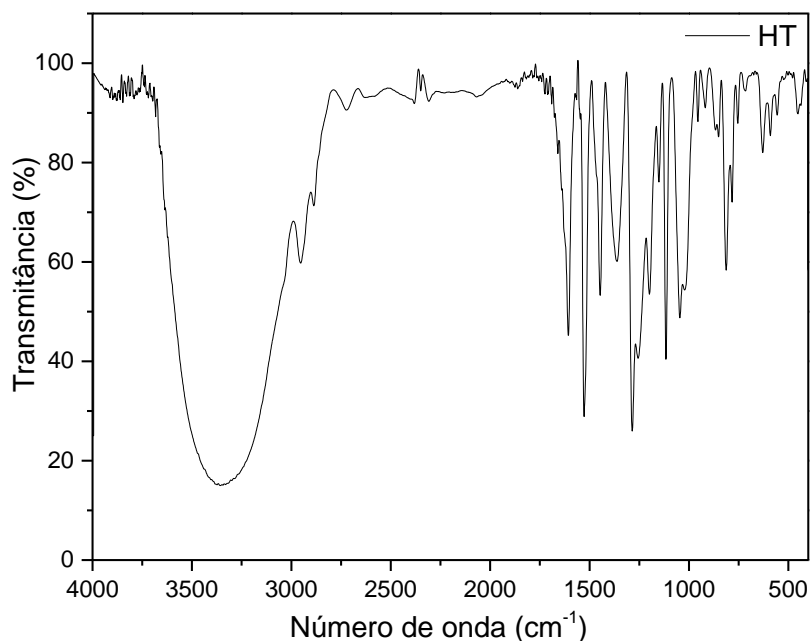
FIGURA 20- Difratoograma do HT, PCL e da MF



Fonte: A autora, 2020.

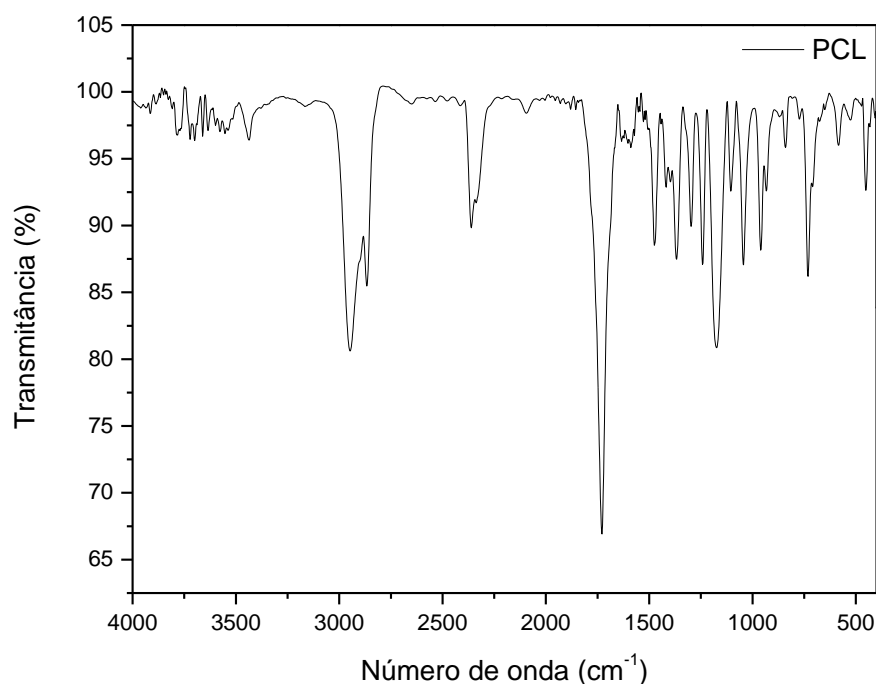
5.5.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 21 mostra o espectro de FTIR do HT puro, o qual mostrou OH em ligação de hidrogênio intermolecular (3357 cm^{-1}), vibrações de estiramento de carbono hibridizado sp^3 ($2953, 2880\text{ cm}^{-1}$), overtone 1,2,4-tri substituído em anel aromático entre 1727 e 1689 cm^{-1} , vibrações do esqueleto aromático (1610 e 1530 cm^{-1}), com resultados semelhantes citados por outros autores (BELTRAN *et al.*, 2014; BONECHI *et al.* 2019; JUN-LING; JIAO-JIAO, 2018).

FIGURA 21 – Espectro de FTIR do HT – (2 cm^{-1} , 64 scans, pastilha com KBr)

Fonte: A autora, 2020.

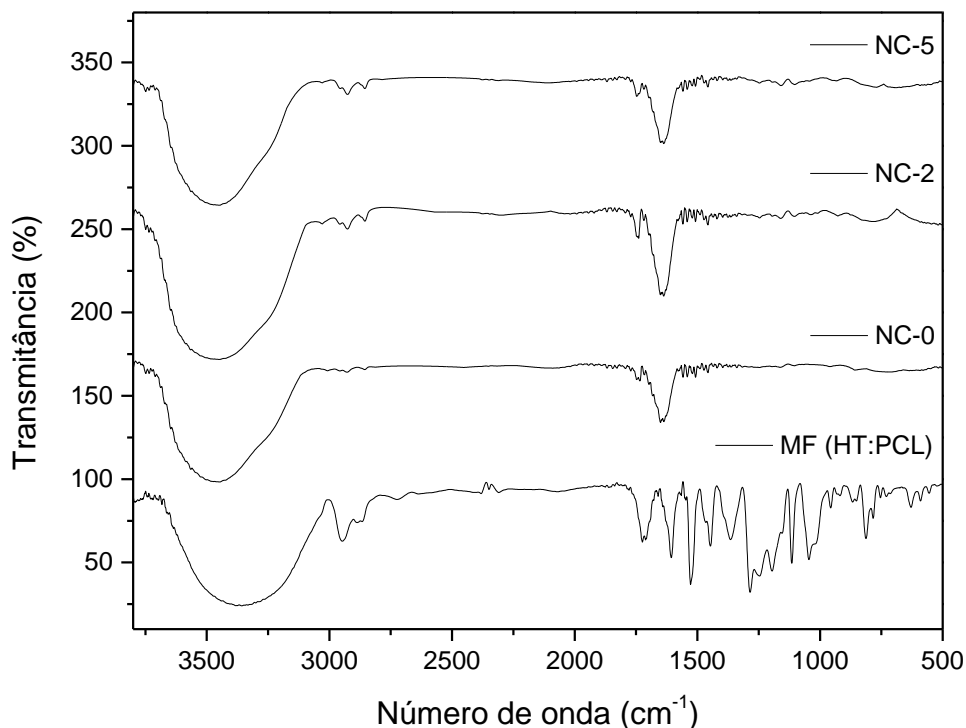
O espectro de FTIR do PCL (Figura 22) mostrou bandas de vibrações de estiramento de carbono hibridizado sp^3 (2948, 2899 e 2865 cm^{-1}), vibrações de estiramento C=O de éster (1729 cm^{-1}), vibrações angulares de carbono hibridizado sp^3 (1473 cm^{-1}), vibrações de estiramento simétrico C–O (1297 e 1241 cm^{-1}) e estiramento assimétrico (1175 cm^{-1}) e vibrações angulares de carbono hibridizado sp^3 (731 cm^{-1}) conforme achados nos trabalhos (BELTRAN *et al.*, 2014; DOS ANJOS CAMARGO, 2020).

FIGURA 22 – Espectros de FTIR do PCL – (2 cm^{-1} , 64 scans, pastilha com KBr)

Fonte: A autora, 2020

A Figura 23 apresenta o espectro FTIR da mistura física e das nanocápsulas, onde as bandas de absorção atribuídas a MF correspondem à sobreposição dos dois espectros de FTIR das substâncias isoladas (HT e PCL), principalmente por aparecer a banda da carbonila do PCL em 1722 cm^{-1} . Em relação ao FTIR das nanocápsulas, foi possível observar a existência majoritariamente da banda de vibração de estiramento da carbonila (C=O) do éster do PCL (1633 cm^{-1}), que apesar do deslocamento do número de onda quando comparado a substância isolada, não há surgimento de nenhuma outra banda relativa ao fármaco, indicando a sua encapsulação.

FIGURA 23 – Espectros de FTIR da MF e das nanocápsulas de PCL contendo ou não HT (NC-0, NC-2 e NC-5) – (2 cm^{-1} , 64 scans, pastilha com KBr)



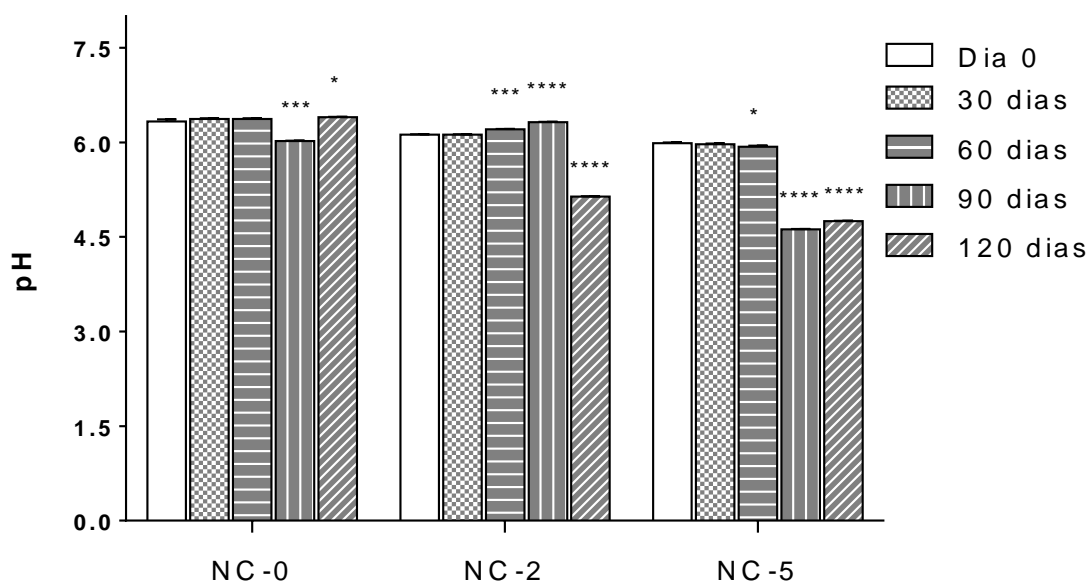
Fonte: A autora, 2020.

Assim, esses resultados indicam que o HT pode ser completamente encapsulado e o polímero está servindo apenas como carreador.

5.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

A Figura 24 mostra os gráficos das análises de pH realizadas nos 120 dias. Foi possível verificar a diferença significativa nas formulações acima de 60 dias da preparação, com exceção da NC-2 que apenas alterou consideravelmente acima de 90 dias. Isso provavelmente deva ocorrer pela hidrólise dos triglicerídeos de cadeia média do núcleo da nanocápsula, do Tween® 80 e do próprio PCL que liberam grupamentos carboxílicos que aumentam a degradação do polímero levando a maior acidificação do meio e consequente alteração do pH (DIMER *et al.*, 2013; DOS ANJOS CAMARGO, 2020; MIR *et al.*, 2017; MITCHELL, 2018; MOTTALEB *et al.*, 2014; WATKINS *et al.* 2015).

FIGURA 24 – Valores de pH, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias

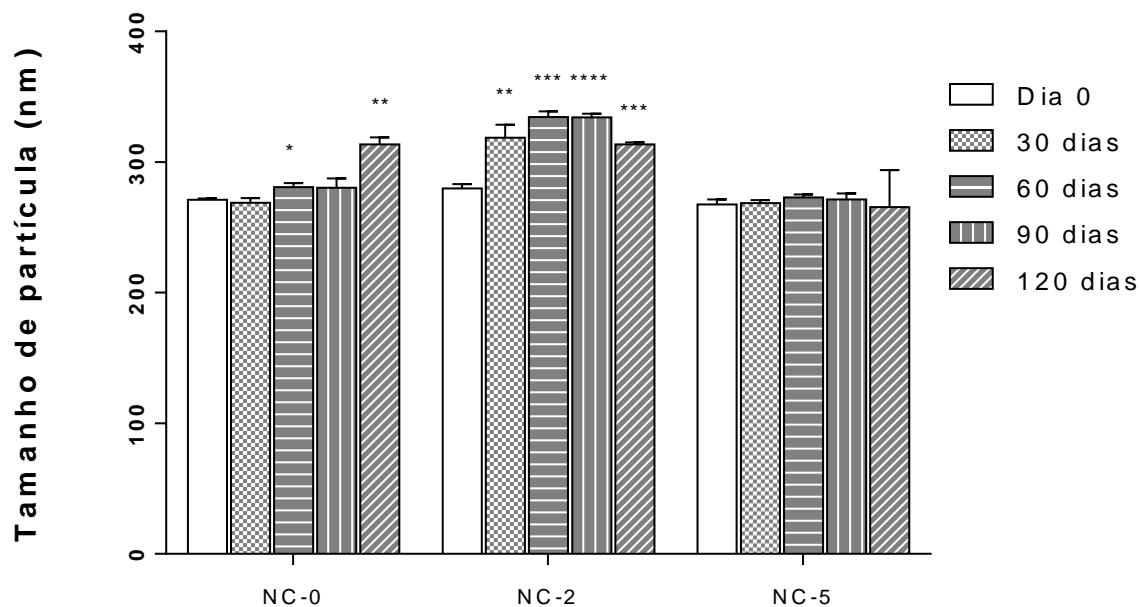


Nanocápsulas controle (NC-0); nanocápsulas de HT 2 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de HT 5 mg/mL (NC-5). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Fonte: A autora.

Em relação ao tamanho de partícula, a Figura 25 mostrou que houve diferença significativa principalmente para a NC-2 no pico de 30 dias, estabilizando seu tamanho a partir deste tempo e a NC-0 a partir de 120 dias, indicando que as nanocápsulas modificaram ao longo do tempo e isso provavelmente deve-se ao fato das mesmas se aglomerarem com o passar do tempo (PAULO; SANTOS, 2020; SCOULOS *et al.* 2015).

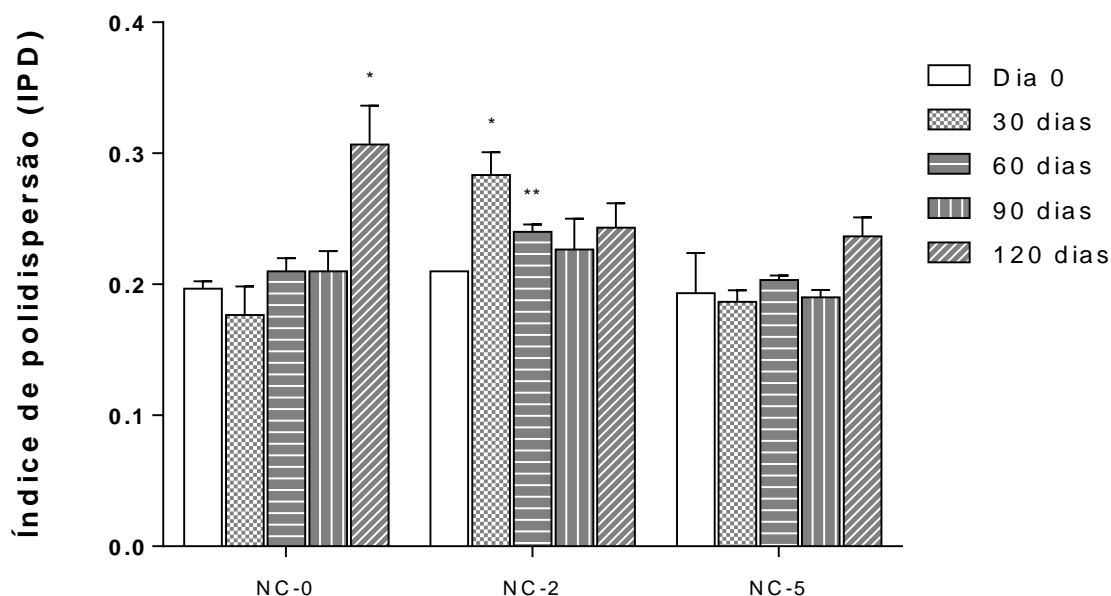
FIGURA 25 – Valores de tamanho de partícula, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias



Nanocápsulas controle (NC-0); nanocápsulas de HT 2 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de HT 5 mg/mL (NC-5). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$
 Fonte: A autora, 2020.

O IPD, Figura 26, teve alteração significativa para a NC-0 e NC-5 a partir de 90 dias e para NC-2 acima de 30 dias, porém os valores permaneceram aceitáveis abaixo de 0,3, satisfatório para uso farmacêutico (PAULO; SANTOS, 2020; SCULLOS *et al.* 2015).

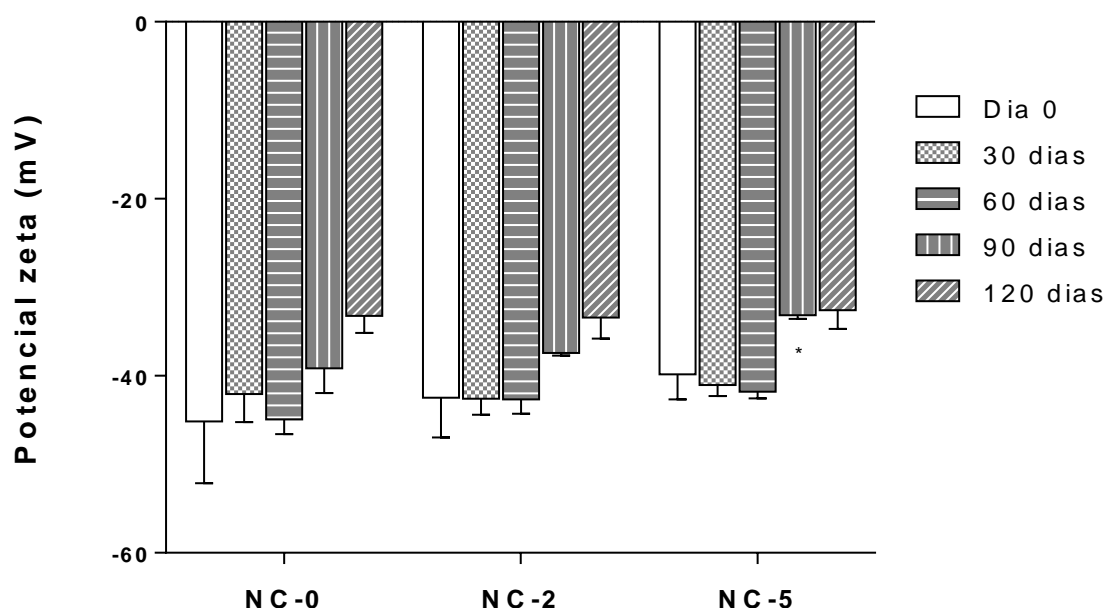
FIGURA 26 – Valores de índice de polidispersão, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias



Nanocápsulas controle (NC-0); nanocápsulas de HT 2 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de HT 5 mg/mL (NC-5). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$
 Fonte: A autora, 2020.

O potencial zeta sofreu mudança significativa em todas as amostras a partir de 60 dias (Figura 27), com acentuada alteração acima de 90 dias em NC-0 e NC-2, mesmo com estes resultados está assegurada a estabilidade elétrica das nanocápsulas ao longo dos tempos.

FIGURA 27 – Valores do potencial zeta, imediatamente à preparação e após 30, 60, 90 e 120 dias



Nanocápsulas controle (NC-0); nanocápsulas de HT 2 mg/mL (NC-2); nanocápsulas de HT 5 mg/mL (NC-5). Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tuckey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$
 Fonte: A autora, 2020.

Além disso, durante o período de estudo, as formulações mantiveram-se com o mesmo aspecto leitoso inicial, indicando boa estabilidade físico-química sem ocorrer cremagem, sedimentação ou floculação (ABRIATA *et al.*, 2019; AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018; CAMARGO *et al.*, 2020; MOTTALEB *et al.*, 2014, SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Pelos dos resultados obtidos do teste de estabilidade físico-química fica evidente que as formulações permanecem estáveis até 60 dias após o seu preparo, exceto a NC-2 com significativas alterações a partir de 30 dias, sendo esse o tempo máximo de utilização.

6 CONCLUSÕES

Foram obtidas com sucesso nanocápsulas de PCL contendo HT (NC-2 e NC-5) e as controle negativo (NC-0) pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

A validação método analítico foi realizada, com resultados dos parâmetros avaliados como seletividade, linearidade, análise de resíduos, limite de detecção, limite de quantificação, repetitividade, precisão intermediária, exatidão, robustez satisfatórios e alta eficiência de encapsulação, comprovando ser um método capaz de quantificar o HT incorporado nas nanopartículas e a eficácia em sua encapsulação.

A avaliação morfológica de superfície dos materiais de partida e das nanocápsulas, foram realizadas em microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM), no que tange somente às nanocápsulas, ficou comprovada a inexistência do fármaco na parte externa, apresentaram superfície lisa e homogeneidade na distribuição do tamanho.

O HT puro, os polímeros, a MF foram examinados por difração de raios X apresentando resultados satisfatórios, somados as nanocápsulas poliméricas, quando foram analisadas por FTIR, demonstraram que não ocorreram reações químicas entre o fármaco e o polímero durante o processo da nanoencapsulação.

No estudo de estabilidade físico-química, as formulações foram monitoradas durante 120 dias de armazenamento ($n = 3$), verificando mensalmente o pH, tamanho de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta. Em relação ao pH houve alterações nas formulações NC-0 e NC-5 a partir de 60 dias, exceto para a NC-2 que apresentou uma variação considerável a partir de 90 dias. O tamanho de partícula, mostrou que houve diferença significativa para a NC-2 após 30 dias, indicando que estas nanocápsulas modificaram-se ao longo do tempo, já as demais amostras mantiveram-se estáveis. O IPD teve alteração significativa para a NC-0 e NC-5 a partir de 90 dias e para NC-2 acima de 30 dias, porém os valores permaneceram aceitáveis abaixo de 0,3, satisfatório para uso farmacêutico. Já no potencial zeta, todas as amostras mostraram alterações a partir de 60 dias, e mais acentuadas em NC-0 e NC-2, em 90 dias. Analisando todos os resultados, conclui-se que as formulações permanecem estáveis por até 60 dias, exceto a NC-2 com significativas alterações a partir de 30 dias do seu preparo, sendo esse o tempo máximo de utilização.

Durante o estudo, todas as formulações mantiveram-se com o mesmo aspecto leitoso inicial, indicando boa estabilidade físico-química sem ocorrer cremagem, sedimentação ou floculação e quando recém preparadas, apresentaram parâmetros físico-químicos adequados.

As nanocápsulas obtidas são uma alternativa viável e promissora para o uso do HT na área da saúde.

REFERÊNCIAS

- ABAMOR, E. S.; TOSYALI, O. A.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. Nigella sativa oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. **IET Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1018-1026, 2018.
- ABDEL-MOTTALEB, M.M.; TRY, C.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Nanomedicine strategies for targeting skin inflammation. **Nanomedicine** (Lond), [s. l.], v. 9, n. 11, p.1727-1743, 2014.
- ABRIATA, J. P.; TURATTI, R. C.; LUIZ, M. T.; RASPANTINI, G. L.; TOFANI, L. B.; DO AMARAL, R. L. F.; SWIECH, K.; MARCATO, P. D.; MARCHETTI, J. M. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 96, p. 347–355, 2019.
- AJIBOYE, A.L.; TRIVEDI, V.; MITCHELL, J.C. Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions. **Drug Delivery and Translational Research**. [s. l.], v. 8, p.1790–1796, 2018.
- AL-KHALIL, S.A. Survey of plants used in Jordanian traditional medicine. **International Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 33, p. 317–323, 1995.
- ALAGNA, F.; MARIOTTI, R.; PANARA, F. *et al.* Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. **BMC plant biology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 162, 2012.
- BRASIL. Anvisa. **Consulta Pública Formulário Fitoterapia**, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4311647/CONSULTA+P%C3%9ABLICA+N+638+COFAR.pdf/e030ed18-1dd3-4836-8aab-357a55c6be23>. Acesso em: 03 set. 2020.
- BELTRÁN, A.; VALENTE, A.J.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M.C. Characterization of poly(ϵ -caprolactone) -based nanocomposites containing hydroxytyrosol for active food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s. l.], v. 62, n. 10, p. 2244-2252, 2014.
- BEN SALEM, M.; AFFES, H.; KSOUDA, K.; SAHNOUN, Z.; ZEGHAL, K. M.; HAMMAMI, S. Pharmacological Activities and *Olea europaea* Leaf. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 39, p. 3128-3136, 2015.
- BERTELLI, M.; KIANI, A.K.; PAOLACCI, S.; MANARA, E.; KURTI, D.; DHULI, K.; BUSHATI, V.; MIERTUS, J.; PANGALLO, D.; BAGLIVO, M.; BECCARI, T.; MICHELINI, S. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 309, p. 29-33, 2020.
- BHATTACHARYA, D.; GHOSH, B.; MUKHOPADHYAY, M. Development of nanotechnology for advancement and application in wound healing: A review. **IET Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 778–785, 2019.

BHATIA, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *In: NATURAL POLYMER DRUG DELIVERY SYSTEMS*. [s. l.], p.33-93, 2016.

BIODIVERSITÉ. **Bioblanc**, 2018. Disponível em: <https://business.google.com/website/biodiversite>. Acesso em: 03 set. 2020.

BOHOLM, Å.; LARSSON, S. What is the problem? A literature review on challenges facing the communication of nanotechnology to the public. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 21, n. 4, 2019.

BONECHI, C.; DONATI, A.; TAMASI, G.; PARDINI, A.; ROSTOM, H.; LEONE, G.; LAMPONI, S.; CONSUMI, M.; MAGNANI, A.; ROSSI, C. Chemical characterization of liposomes containing nutraceutical compounds: Tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 246, p. 25-34, 2019.

BRAHMI, F.; MECHRI, B.; DABBOU, S.; DHIBI, M.; HAMMAMI, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**. [s. l.], v. 38, p. 146– 152, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª. ed., v. 1 e 2, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 03 set. 2020.

BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Aprova o “**Critérios para a validação de métodos analíticos**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 11 jun. 2020.

BRIANTE, R.; LA CARA, F.; TONZIELLO, M.P.; FEBBRAIO, F.; NUCCI R. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropeína hydrolysis by hyperthermophilic β -glycosidase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3198-3203, 2001.

BRIANTE, R.; PATUMI, M.; FEBBRAIO, F.; NUCCI, R. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic beta-glycosidase. **Journal of Biotechnology**. [s. l.], v. 111, n. 1, p. 67–77, 2004.

BRIANTE, R.; PATUMI, M.; LIMONGELLI, S.; FEBBRAIO, F.; VACCARO, C.; DI SALLE, A.; LA CARA, F.; NUCCI, R. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. **Plant Science**. [s. l.], v. 162, n. 5, p. 791–798, 2002.

BRIANTE, R.; PATUMI, M.; TEREZIANI, S.; BISMUTO, E.; FEBBRAIO, F.; NUCCI, R. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s. l.], v. 50, n.17, p. 4934–4940, 2002.

BUSATTO, S.; PHAM, A.; SUH, A.; SHAPIRO, S.; WOLFRAM, J. Organotropic drug delivery: Synthetic nanoparticles and extracellular vesicles. **Biomedical Microdevices**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2019.

CATALÁN, U.; DE LAS HAZAS, M. C. L.; PIÑOL, C.; RUBIÓ, L.; MOTILVA, M. J.; FERNANDEZ-CASTILLEJO, S.; SOLÀ, R. Hydroxytyrosol and its main plasma circulating metabolites attenuate the initial steps of atherosclerosis through inhibition of the MAPK pathway. **Journal of Functional Foods**. [s. l.], v. 40, p. 280-291, 2018.

CHOI, M.J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN SANGGI; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of Eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. **Food Research International**. [s. l.], v. 42, n. 1, p. 148–156, 2009.

COIMBRA, A. B. **Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

D'ANGELO, S.; MANNA, C.; MIGLIARDI, V.; MAZZONI, O.; MORRICA, P.; CAPASSO, G.; PONTONI, G.; GALLETTI, P.; ZAPPIA, V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. **Drug Metabolism Disposition Journal**. [s. l.], v. 29, n. 11, p. 1492–1498, 2001.

DE LA RIBEIRO, R.; FIUZA DE MELO, F.; DE BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paolo. **Journal of Ethnopharmacology**. [s. l.], v. 15, p. 261–269, 1986.

DE LAS HAZAS, M.C. L.; GODINHO-PEREIRA, J.; MACIÀ, A.; ALMEIDA, A. F.; VENTURA, M. R.; MOTILVA, M. J.; SANTOS, C. N. Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. **Journal of Functional Foods**. [s. l.], v. 46, p. 110-117, 2018.

DE LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V.; CUOMO, F.; LOPEZ, F. Evidence Of Oleuropeína Degradation By Olive Leaf Protein Extract. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 175, p. 568-574, 2015.

DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M.R.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. **Nanomaterials (Basel)**. [s. l.], v. 10, n. 5, 2020.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Impactos da nanotecnologia na saúde: Produção de medicamentos. **Química Nova**. v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DOS ANJOS CAMARGO, G.; FILHA, A.R.C.C.; LYRA, A.; NOVATSKI, A; NADAL, J. M.; LARA, L.S.; DIAS, D. T.; NASCIMENTO, E. A.; SILVA, U. R.; JACINTO, C.; FARAGO, P. V. Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ϵ -caprolactone)

nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v.110, 2020.

DOS ANJOS CAMARGO, G. **Desenvolvimento, Caracterização físico-química e Avaliação da eficiência de encapsulação de Nanocápsulas Poliméricas contendo Tacrolimus**. 2020, 37-39 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil, 2020.

ELFIKY, A. A. Natural products may interfere with SARSCoV-2 attachment to the host cell. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020.

EPHREM, E., GREIGE-GERGES, H., FESSI, H., CHARCOSSET, C. Optimisation of Rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. **Journal of microencapsulation**. [s. l.], v. 31, n. 8, p. 746–753, 2014.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

FDA. **Guidance for industry: Considering Whether and FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**. Disponível em: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>. Acesso em: 11 set. 2020.

FREDRICKSON, W.R. Method and composition for antiviral therapy with olive leaves. **United States Patent**, [s. l.], v. 6, p. 117–844, 2000.

GABRIELIAN, L.; TRCHOUNIAN, A. Antibacterial activities of transient metals nanoparticles and membranous mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. [s. l.], v. 35, n. 10, 2019.

GALENA. **Hydrolive**, 2020. Disponível em: <https://www.galena.com.br/hubfs/Material%20T%C3%A9cnico/L%C3%A2mina/L%C3%A2mina%20-%20Hydrolive.pdf?hsLang=pt-br>. Acesso: 04 de setembro de 2020.

GALENA. **Oli Olá**, 2020. Disponível em: <https://www.galena.com.br/hubfs/L%C3%A2mina%20-20Oli%20Ola.pdf?hsLang=pt-br>. Acesso em: 04 set. 2020.

GARCÍA, V. A.; SERRANO N. J.; SANAHUJA A. B.; GARRIGÓS M.C. Novel Antioxidant Packaging Films Based on Poly(ϵ -Caprolactone) and Almond Skin Extract: Development and Effect on the Oxidative Stability of Fried Almonds. **Antioxidants (Basel)**. [s. l.], v. 9, n. 7, 2020.

GARCIA-RODRIGUEZ, R., ROMERO-SEGURA, C., SANZ, C., SANCHEZ-ORTIZ, A., PEREZ, A. G. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. **Food Research International**. [s. l.], v. 44, n. 2, p. 629–635, 2011.

GASTALDO, P. Official compendium of the Italian flora XVI. **Fitoterapia**. [s. l.], v. 45, p. 199–217, 1974.

GILANI, A.H.; KHAN, A.U.; SHAH, A.J.; CONNOR J.; JABEEN Q. Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. [s. l.], v.56, n 8, p. 613–620, 2005.

GONÇALVES, P. M. F. **Efeitos de metabolitos de fenóis do azeite no dano oxidativo em eritrócitos humanos**. 2013. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade do Porto, Portugal, 2013.

GRAFU, I.; BADEA, G.; BALACI, T. Synthesis of anticancer vegetable-based lipid nanocarriers. **U.P.B. Sci. Bull.**, Series B, [s. l.], v. 76, 2015.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J.L.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. **Nutrition Reviews**. [s. l.], v. 68. n.4, p. 191-206, 2010.

GUINDA, A.; CASTELLANO, J.; DELGADO-HERVÁS, T.; GUTIÉRREZ-ADÁNEZ, P.; RADA, M. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. **LWT - Food Science and Technology**. [s. l.], v. 64, 2015.

HAMDEN, K.; ALLOUCHE, N.; JOUADI, B. Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. **International Journal of Food Science and Biotechnology**. [s. l.], v. 19, p. 439–447, 2010.

HIRSCHAMAN, S.A. Inactivation of DNA polymerases of murine leukaemia viruses by calcium elenolate. **Nature New Biology**. [s. l.], v. 238, p. 277–279, 1972.

HU T.; HE X.W.; JIANG JG; XU XL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s. l.], v. 62, n. 7, p.1449-55, 2014.

HUSSAIN, Z.; KATAS, H.; MOHD, M.C.A.; KUMOLOSASI, E.; BUANG, F.; SAHUDIN, S. Self-assembled polymeric nanoparticles for percutaneous co-delivery of hydrocortisone/hydroxytyrosol: an ex vivo and in vivo study using an NC/Nga mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**. [s. l.], v 444, n. (1-2), p.109-19, 2013.

ICH. International Conference on the Harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline, **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Q2 (R1), v. 1, 2005.

JEMAI, H.; EL FEKI, A.; SAYADI, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. [s. l.], v. 6, p. 549–583, 2009.

JEON S., CHOI M. Anti-inflammatory and anti-aging effects of hydroxytyrosol on human dermal fibroblasts. **Biomedical Dermatology**. [s. l.], v. 2, n. 21. p. 1-8. 2018.

JILANI, H.; CILLA, A.; BARBERÁ, R.; HAMDÍ, M. Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**. [s. l.], v. 84, p. 131-138, 2016.

KAWAGUCHI K.; MATSUMOTO T.; KUMAZAWA Y. Effects of Antioxidant Polyphenols on TNF-Alpha-Related Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry Journal**, [s. l.], v. 11, n. 14, p. 1767-79, 2011.

KHAN, M.Y.; PANCHAL, S.; VYAS, N.; BUTANI, A.; KUMAR, V. *Olea europaea*: A phyto-pharmacological review. **Pharmacognosy Reviews**. [s. l.], v. 1, p. 112–118, 2007.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; YASUI, H.; NAKAMURA, M. Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 16, p. 9159–9164, 1999.

KOSTELENOS, G.; KIRITSAKIS, A. Olive tree history and evolution. In: KIRITSAKIS, A.; SHAHIDI, F. *Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing*. Editora: **John Wiley & Sons**. 2017, p. 1-12.

LAWRENDIADIS, G. Contribution to the knowledge of the medicinal plants of Greece. **Planta Med**. [s. l.], v. 9, p.164–174, 1961.

LEMMA. **Active Olea**, 2020. Disponível em: <https://www.lemma.com.br/pt-br/produto/active-olea-hidroxitirosol>. Acesso em: 03 set. 2020.

LÓPEZ-GARCÍA, M.; LÓPEZ, O.; MAYA, I.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. Complexation of hydroxytyrosol with β -cyclodextrins. An efficient photoprotection. **Tetrahedron**. [s. l.], v. 66., p. 8006-8011, 2010.

LORINI, A. **Perfil metabólico de folhas de cultivares de oliveiras nas diferentes estações do ano**. 2018, 11-19 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2018.

MARCHETTI, J. M.; SARAIVA, J. Sistemas de Liberação: Estratégias para Medicamentos Eficazes. In: MARCHETTI. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 72-95.

MARKOVIĆ, A. K.; TORIĆ, J.; BARBARIĆ, M.; JAKOBUŠIĆ, B. C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. **Molecules**, [s. l.], v. 10, n. 2001, 2019.

MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B. Análise Térmica - Termogravimetria. *In: TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS*. 1. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2003. p. 210-228.

MATOS, J. R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análise Térmica aplicada a Fármacos e Medicamentos. *In: BIOFARMACOTÉCNICA*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 32-65.

MAZZUCA, S.; SPADAFORA, A.; INNOCENTI, A. M. Cell and tissue localization of beta-glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. **Plant Science and Biotechnology**. [s. l.], v. 171, n. 6, p. 726–733, 2006.

MIR, M.; ISHTIAQ, S.; RABIA, S.; KHATOON, M.; ZEB, A.; KHAN, G. M.; UR REHMAN, A.; UD DIN, F. Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery. **Nanoscale research letters**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2017.

MORENO, J. A. O. **Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo (*Olea europaea* L.)**. 2017, 20-26 fls. Tese (Doctorado en Botânica, Ecología y Fisiología Vegetal) – Universidad de Córdoba, España, 2014.

NOUSIS L.; DOULIAS P. T.; ALIGIANNIS N.; BAZIOS D.; AGALIAS A.; GALARIS D.; MITAKOU S. DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. **Free Radical Research Journal**. [s. l.], v. 39, p. 787–795, 2005.

OTEROS, J.; GARCIA-MOZO, H.; VÁZQUEZ, L.; MESTRE, A.; DOMINGUEZ-VILCHES, E.; GALÁN, C. Modelling olive phenological response to weather and topography. **Agriculture Ecosystems & Environment**. [s. l.], v. 179, p. 62-68, 2013.

PASTOR, A.; RODRÍGUEZ-MORATÓ, J.; OLESTI, E.; PUJADAS, M.; PÉREZ-MAÑÁ, C.; KHYMENETS, O.; FITÓ, M.; COVAS, M. I.; SOLÁ, R.; MOTILVA, M. J.; FARRÉ, M.; DE LA TORRE, R. Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1437, p. 183-190, 2016.

PAULO, F.; SANTOS, L. Encapsulation of the Antioxidant Tyrosol and Characterization of Loaded Microparticles: an Integrative Approach on the Study of the Polymer-Carriers and Loading Contents. **Food and Bioprocess Technology**. [s. l.], v. 13, 2020.

PERŠIN, Z.; RAVBER, M.; KLEINSCHKE, K. S.; KNEZ, Ž.; ŠKERGET, M.; KUREČIČ, M. Bio-nanofibrous mats as potential delivering systems of natural substances. **Textile Research Journal**. [s. l.], v. 87, n. 4, p. 444-459, 2017.

PIERONI, A.; HEIMLER, D.; PIETERS, L.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A. J. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Pharmazie**. [s. l.], v. 51, n. 10, p. 765-8, 1996.

PIÑEIRO, Z.; CANTOS-VILLAR, E.; PALMA, M.; PUERTAS, B. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s. l.], v. 9, n. 59 (21), p. 11683-9, 2011.

PIROZZI C.; LAMA, A.; SIMEOLI, R.; PACIELLO, O.; PAGANO, T. B.; MOLLICA, M. P.; DI GUIDA, F.; RUSSO, R.; MAGLIOCCA, S.; CANANI, R. B.; RASO, G. M.; CALIGNANO, A.; MELI, R. Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. [s. l.], v. 30, p. 108-15, 2016.

PUBCHEM. **Compound summary Hydroxytyrosol**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxytyrosol>. Acesso em: 10 set. 2020.

QI, Y.; ZHU, N.; ZHAI, Y.; DING, Y. The mutually beneficial relationship of patents and scientific literature: topic evolution in nanoscience. **Scientometrics**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 893–911, 2018.

RENIS, H.E. Influenza virus infection of hamsters. A model for evaluating antiviral drugs. **Archives Virology**. [s. l.], v. 54, p.85–93, 1977.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIETJENS S. J.; BAST A.; HAENEN G. R. M. M. New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s. l.], v. 55, p. 7609–7614, 2007.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Composition and analysis of functional components of olive leaves. In: KIRITSAKIS, A.; SHAHIDI, F. (Ed.) Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing. **John Wiley & Sons**, p. 383-399, 2017.

ROMERO-SEGURA, C., SANZ, C., PEREZ, A. G. Purification and characterization of an olive fruit beta-glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 17, p. 7983–7988, 2009.

ROSATI, A.; CAFIERO, C.; PAOLETTI, A.; ALFEI, B.; CAPORALI, S.; CASCIANI, L.; VALENTINI, M. Effect of agronomical practices on carpology, fruit and oil composition, and oil sensory properties, in olive (*Olea europaea* L.). **Food Chemistry**. [s. l.], v.159, p. 236-243, 2014.

RUGINI, E.; CRISTOFORI, V.; SILVESTRI, C. Genetic improvement of olive (*Olea europaea* L.) by conventional and in vitro biotechnology methods. **Biotechnology Advances**. [s. l.], v. 34, 2016.

SAIJA, A.; UCCELLA, N. Olive biophenols: Functional effects on human well being. **Trends in Food Science and Technology**. [s. l.], v. 11, p. 357–363, 2001.

SALEM M. B.; AFFES H., KSOUDA K.; SAHNOUN K.; ZEGHAL K. M.; HAMMAMI S. Pharmacological activities of olea europaea leaves. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 39, p. 3128–3136, 2014.

SCHAFFAZICK, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHAFFER, S.; PODSTAWA, M.; VISIOLI, F.; BOGANI, P.; MÜLLER, W.E.; ECKERT, G.P. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s. l.], v. 55, n. 13, p. 5043–5049, 2007.

SCOULLOS, Z.; KAVVATHA, T.; ROUSSAKI, M.; KAVETSOU, E.; PAPASPYRIDES, C.; VOUYIOUKA, S.; ANASTASIA, D. Encapsulation of the natural product hydroxytyrosol in poly(lactic)acid nanoparticles coated with β -cyclodextrin polymer. **Anais da 10ª Conferência Científica Panhelênica de Engenharia Química, Patras, 4-6 de junho de 2015**, Grécia, 2015.

SERVILI, M.; SELVAGGINI, R.; ESPOSTO, S.; TATICCHI, A.; MONTEDORO, G. F.; MOROZZI, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, [s. l.], v. 1054, n. 1, p. 113-127, 2004.

SHETH, A. 2005. The Herbs of Ayurveda. **Jain Book Depot: Department of Pharmaceutical Sciences**, Saurashtra University, Rajkot, Gujarat, India, vol. 3, p. 820–830, 2005.

SHI, Y.; LAMMERS, T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. **Accounts of Chemical Research**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1543–1554, 2019.

SIDDIQUE, M.I.; KATAS, H.; JAMIL, A.; MOHD, A.M.C.I.; NG, S.F.; ZULFAKAR, M.H.; NADEEM, S.M. Potential treatment of atopic dermatitis: tolerability and safety of cream containing nanoparticles loaded with hydrocortisone and hydroxytyrosol in human subjects. **Drug Delivery and Translational Research**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 469-481, 2019.

SUN, Q.; BARZ, M.; DE GEEST, B. G.; DIKEN, M.; HENNINK, W. E.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T.; SHI, Y. Nanomedicine and macroscale materials in immunology. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 351–381, 2019.

SUN, Y.; ZHOU, D.; SHAHIDI, F. Antioxidant properties of tyrosol and hydroxytyrosol saturated fatty acid esters. **Food Chemistry**. [s. l.], v. 245, p.1262-1268, 2018.

TAKEDA, Y.; BUI, V.N.; IWASAKI, K.; KOBAYASHI, T.; OGAWA, H.; IMAI, K. Influence of olive-derived hydroxytyrosol on the toll-like receptor 4-dependent inflammatory response of mouse peritoneal macrophages.

Biochemical and Biophysical Research Communications. [s. l.], v. 446, n. 4, p.1225-30, 2014.

TAKEDA, R.; KOIKE, T.; TANIGUCHI, I.; TANAKA, K. Double-blind placebo-controlled trial of hydroxytyrosol of *Olea europaea* on pain in gonarthrosis. **Phytomedicine.** [s. l.], v. 20, n.10, p. 861-864, 2013.

THE ANTIMICROBIAL INDEX. **Knowledge base.** Disponível em: http://antibiotics.toku-e.com/Antimicrobial_detail_2706.html. Acesso em: 10 set. 2020.

THONGGOOM, O.; PUNRATTANASIN, N.; SRISAWANG, N.; PROMAWAN, N.; THONGGOOM, R. In vitro controlled release of clove essential oil in self-assembly of amphiphilic polyethylene glycol-block-polycaprolactone. **Journal of Microencapsulation.** [s. l.], v. 33, n. 3, p. 239– 248, 2016.

TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, M.; TABACCHI, G.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, S.; LA GUARDIA, M. The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. **Nutrition Research Reviews.** [s. l.], v. 18, p. 98–112, 2005.

TRUCILLO, P.; CAMPARDELLI, R.; ALIAKBARIAN, B.; PEREGO, P.; REVERCHON, E. Supercritical assisted process for the encapsulation of olive pomace extract into liposomes. **The Journal of Supercritical Fluids.** [s. l.], v. 135, p.152-159, 2018.

TRUJILLO M.; MATEOS R.; COLLANTES DE TERAN L.; ESPARTERO J. L.; CERT R.; JOVER M.; ALCUDIA F.; BAUTISTA J.; CERT A.; PARRADO J.; Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems, **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** [s. l.], v. 54, p. 3779–3785, 2006.

TSIMIDOU, M.Z.; SOTIROGLOU, M.; MASTRALEXI, A.; NENADIS, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, D.L.; GALLINA, T.T. House Validated UHPLC Protocol for the Determination of the Total Hydroxytyrosol and Tyrosol Content in Virgin Olive Oil Fit for the Purpose of the Health Claim Introduced by the EC Regulation 432/2012 for "Olive Oil Polyphenols". **Molecules.** [s. l.], v. 24. n. 6, 2019.

UCHIDA R.; ISHIKAWA S.; TOMODA H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. **Acta Pharmaceutica Sinica B.** [s. l.], v. 4, n. 2, p. 141–145, 2014.

TU, J.L.; YUAN, J.J. Thermal Decomposition Behavior of Hydroxytyrosol (HT) in Nitrogen Atmosphere Based on TG-FTIR Methods. **Molecules.** [s. l.], v. 23, n. 2, 2018.

VARDANIAN, S.A. Phytotherapy of bronchial asthma in medieval Armenian medicine. **Terapevticheskii arkhiv journal.** [s. l.], v. 50, p.133–136, 1978.

VISIOLI, F. GALLI, C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. **Life Science.** [s. l.], v. 55, n. 24, p.1965–1971, 1994.

- WAHLICH, J.; DESAI, A.; GRECO, F.; HILL, K.; JONES, A. T.; MRSNY, R. J.; PASUT, G.; PERRIE, Y.; SEIB, F. P.; SEYMOUR, L. W.; UCHEGBU, I. F. Nanomedicines for the delivery of biologics. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1–14, 2019.
- WANG, W., LI, C. Q., HU, X. L. Developmental expression of beta-glucosidase in olive leaves. **Biologia Plantarum**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 138–140, 2009.
- WANI, A. T.; MASOODI, F.A.; GANI, A.; BABA, W. N.; RAHMANIAN, N.; WANI, I. A.; AHMAD, M. Olive oil and its principals bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 77, 2018.
- WATKINS, R.; WU, L.; ZHANG, C.; DAVIS, R.M.; XU, B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**. [s. l.], v.28, n. 10, p. 6055-6074, 2015.
- XIE, P.J.; HUANG, L.X.; ZHANG, C.H.; ZHANG, Y.L. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v.16, p. 460-471, 2015.
- XIE, Y. D.; CHEN, Z. Z.; LI, N.; LU W. F.; XU, Y. H.; LIN, Y. Y.; SHAO, L. H.; WANG, Q. T.; GUO, L. Y.; GAO, Y. Q.; YANG, G. D.; LI, Y. P.; BIAN, Y. P. Hydroxytyrosol nicotinate, a new multifunctional hypolipidemic and hypoglycemic agent. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. [s. l.], v. 99, p. 715-724, 2018.
- YORULMAZ, A.; HAKAN, E.; TEKIN, A. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. [s. l.], v. 90, n. 5, p. 647- 658, 2013.
- YUAN, J.J.; QIN, F.G.; TU, J. L.; LI, B. Preparation, Characterization, and Antioxidant Activity Evaluation of Liposomes Containing Water-Soluble Hydroxytyrosol from Olive. **Molecules**. **2017**. [s. l.], v. 22, n. 870, 2017.
- ZAINAL-ABIDIN, M. H.; HAYYAN, M.; NGOH, G. C.; WONG, W. F. From nanoengineering to nanomedicine: A facile route to enhance biocompatibility of graphene as a potential nano-carrier for targeted drug delivery using natural deep eutectic solvents. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 195, p. 95–106, 2019.
- ZARGARI, A. Medicinal Plants. **Tehran University Publications: Tarhran**. [s. l.], v. 389, p. 889–903,1992.
- ZHANG, S.; CAMPAGNE, C.; SALAÜN, F. Influence of Solvent Selection in the Electrospraying Process of Polycaprolactone. **Applied Sciences**. [s. l.], v. 9, 2019.
- ZHIDEBEKKYZY, A.; KUPESHOVA, S.; YESMURZAYEVA, A. Project management in nanotechnology: A systematic literature review. **Montenegrin Journal of Economics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 227–244, 2019.