



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LUCÉLIA LUISA DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
SEMI-SÓLIDAS COM EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO (EGCG)**

Campinas
2024

LUCÉLIA LUISA DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES
SEMISSÓLIDAS COM EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO (EGCG)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa
COORIENTADORA: Profa. Dra. Iara Lúcia Tescarollo

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LUCÉLIA LUISA DA SILVA, ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA E COORIENTADA PELA PROF^a DR^a IARA LÚCIA TESCAROLLO.

Campinas
2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

Si38p Silva, Lucélia Luisa da, 1989-
Produção e caracterização de formulações semissólidas com epigallocatequina-3-galato (EGCG) / Lucélia Luisa da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Paulo César Pires Rosa.
Coorientador: Iara Lúcia Tescarollo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Géis. 2. Pomadas. 3. Validação. 4. Estabilidade. 5. Microscopia ótica. 6. Pele. 7. Antioxidante. I. Rosa, Paulo César Pires, 1976-. II. Tescarollo, Iara Lúcia. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Production and characterization of semi-solid formulations with epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

Palavras-chave em inglês:

Gels

Ointments

Validation

Stability

Microscopy

Skin

Antioxidants

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Paulo César Pires Rosa [Orientador]

Maria Helena de Melo Lima

Giovanna Barbarini Longato

Data de defesa: 23-05-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0007-1218-2365>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9350442656783749>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Autora Lucélia Luisa da Silva

Orientador Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa

Coorientadora Prof^{fa} Dr^a Iara Lúcia Tescarollo

Dissertação aprovada em 23 de maio de 2024

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa

Prof^{fa} Dr^a Maria Helena de Melo Lima

Prof^{fa} Dr^a Giovanna Barbarini Longato

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Campinas, 23 de maio de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente esse trabalho a Deus, que me capacitou e porque Dele e para Ele são todas as coisas.

As minhas avós, Maria e Eduvirgem, que não tiveram a oportunidade de estudar.

Aos meus pais, José e Luisa, que são minha fonte de vida, força e coragem. As minhas irmãs, Ana Letícia e Maria Luisa, que me ensinaram a compartilhar e deixaram minha vida mais feliz.

A todos os meus professores que acreditaram em mim e me incentivaram a progredir.

Ao meu marido, Guilherme, que cresce e melhora comigo todos os dias, me incentivando, apoiando, ensinando e se dedicando a nossos projetos conjuntos e individuais.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a Deus por me capacitar, me fortalecer e guiar durante todos os momentos desse projeto.

Obrigado aos meus pais e irmãs que torceram e se preocuparam comigo durante todo o processo. Vocês são minha base sólida, minha fonte, minha inspiração e felicidade.

Obrigado ao meu marido pela dedicação, ajuda incondicional e incentivo. Você é uma benção em minha vida, meu amigo, cúmplice, meu exemplo de obstinação. Juntos somos muito melhores.

Obrigado ao meu Orientador Dr. Paulo Rosa e Coorientadora Dra Iara Tescarollo pela paciência, sabedoria e perspicácia durante toda a condução do projeto.

Obrigada a Gabriela Trindade pela ajuda, apoio e amizade, sem você minha jornada teria sido bem mais difícil.

Obrigado a equipe do ICosmetologia Educacional, principalmente ao Samir Tannuri, pelo apoio na elaboração e produção das formulações.

Obrigado a todos da equipe do Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), principalmente a Kelly Palma e Adilson Brandão, que permitiram que eu pudesse me dedicar ao projeto e me apoiaram em todas as fases.

Obrigada a Professora Priscila Mazzola que nos ajudou com a estrutura do Laboratório de Farmacotécnica e Cuidado em Saúde (LaFateCS) na etapa de estabilidade e liberação *in vitro* das formulações, assim como suas alunas, principalmente a Ana Cláudia Fazanaro.

Obrigada a FAEPEX pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de etapas do projeto.

RESUMO

A EGCG possui um grande potencial terapêutico devido suas características antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, imunomoduladoras e anticarcinogênicas, podendo ser utilizada em formulações farmacêuticas e cosméticas como inibidora de tumores cutâneos, tratamento de queimaduras, queloides, alopecia, psoríase, cicatrização de feridas, para evitar o fotoenvelhecimento, entre outros. Todavia, há desafios no seu uso, uma vez que a molécula possui uma alta sensibilidade à luz e reatividade, sofrendo facilmente oxidação, hidrólise, epimerização e polimerização, além de ser extremamente sensível a altas temperaturas e pH. Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi desenvolver diferentes formulações semissólidas contendo EGCG e caracterizá-las de acordo com suas propriedades físico-químicas, liberação *in vitro* e principalmente estabilidade, visando aplicação tópica com ação cicatrizante e antioxidante. Para tal, preparou-se 5 formulações semissólidas com 1% (m/m) de EGCG, sendo 2 géis, 2 cremes e 1 pomada, caracterizou-se a densidade, pH, aspecto e teor de EGCG, sendo que para esse último, usou-se um método cromatográfico que foi validado, sendo avaliado os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez. O método se mostrou linear, com $r^2 = 0,9991$, específico para todas as formulações, preciso, exato e robusto. O pH obtido para as formulações ficou em torno de 4,6 a 5,4, o que está dentro do pH natural da pele. A densidade obtida variou de 0,86 a 1,01 g.mL⁻¹, sendo o menor valor correspondente a pomada e o maior correspondente aos géis. O teor das formulações no tempo inicial ficou de acordo com o esperado mostrando que a EGCG foi incorporada, exceto para o Gel 01 que já mostrou possível perda por degradação. Verificou-se na liberação *in vitro*, que a quantidade de EGCG liberada variou de acordo com o tipo de formulação, sendo que a cinética de liberação observada foi correspondente ao Modelo de Higuchi ($r^2 > 0,90$). Ao avaliar a morfologia das formulações usando-se microscopia ótica com luz polarizada, foi possível observar que a EGCG estava dissolvida nos géis e cremes e dispersa na pomada, o que se manteve após 6 meses do teste de Estabilidade Acelerada. Nesse teste, também houve pouca modificação no pH e densidade das formulações, sendo que em relação ao teor, somente a Pomada, Creme 02 e Gel 02 mantiveram com 98%, 76% e 58%, respectivamente, da concentração inicial de EGCG após 6 meses, o que

provavelmente foi consequência do estado físico da EGCG nas mesmas e da alta temperatura empregada. Dessa forma, foi possível desenvolver formulações contendo EGCG e caracterizá-las para aplicações tópicas visando a cicatrização de feridas e ação antioxidante, sendo o Creme 02 a formulação mais promissora para tal devido sua maior estabilidade e liberação com possível permeação no estrato córneo.

Palavras-chave: EGCG, formulações semissólidas, validação, estabilidade, teste de liberação *in vitro*, microscopia.

ABSTRACT

EGCG has great therapeutic potential due to its antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, immunomodulatory and anticarcinogenic characteristics, and it can be used in pharmaceutical and cosmetic formulations as an inhibitor of skin tumors, treatment of burns, keloids, alopecia, psoriasis, wound healing, to prevent photoaging, among others. However, there are challenges in its use, since the molecule has a high sensitivity to light and reactivity, easily undergoing oxidation, hydrolysis, epimerization and polymerization, in addition to being extremely sensitive to high temperatures and pH. Therefore, the general objective of this work was to develop different semi-solid formulations containing EGCG and characterize them according to their physicochemical properties, *in vitro* release test and mainly stability, aiming for topical application with healing and antioxidant action. To this, 5 semi-solid formulations were prepared with 1% (w/w) EGCG: 2 gels, 2 creams and 1 ointment. The density, pH, appearance and EGCG content were characterized. For content a chromatographic method was used and validated, linearity, specificity, precision, accuracy and robustness are evaluated. The method proved to be linear, with $r^2 = 0.9991$, specific for all formulations, precise, accurate and robust. The pH obtained for the formulations was around 4.6 to 5.4, which is within the skin's natural pH. The density obtained varied from 0.86 to 1.01 g.mL⁻¹, with the lowest value corresponding to ointment and the highest corresponding to gels. The content of the formulations at the initial time was in accordance with expectations showing that EGCG was incorporated, except for Gel 01 which already showed possible loss due to degradation. It was verified in the *in vitro* release test that the amount of EGCG released varied according to the type of formulation, with the release kinetics corresponding to the Higuchi Model ($r^2 > 0.90$). When evaluating the morphology of the formulations using optical microscopy with polarized light, it was possible to observe that EGCG was dissolved in the gels and creams and dispersed in the ointment, which was maintained after 6 months of the Accelerated Stability test. In this test, there was little change in pH and density for the formulations, and in relation to the content, only the Ointment, Cream 02 and Gel 02 maintained 98%, 76% and 58%, respectively, of the initial concentration of EGCG after 6 months, which was probably a consequence of the physical state of the EGCG in them and the high temperature used. In this way, it was possible to develop

formulations containing EGCG and characterize them for topical applications aiming at wound healing and antioxidant action, with Cream 02 being the most promising formulation for this due to its greater stability and release with possible permeation in the stratum corneum.

Keywords: *EGCG, semi-solid formulations, validation, stability, in vitro release test, microscopy.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Resumo das definições de cada formulação semissólida (Adaptado de BUHSE et al., 2005).....	22
Figura 2: Componentes comuns em formulações semissólidas.	24
Figura 3: Representação das camadas da pele (Adaptado usando Servier Medical Art (http://smart.servier.com/ acessado em 1 de março de 2024).....	28
Figura 4: Representação da Epiderme (Adaptado usando Servier Medical Art (http://smart.servier.com/ acessado em 1 de março de 2024).....	29
Figura 5: Vias de permeação do princípio ativo na pele (Adaptado usando Servier Medical Art (http://smart.servier.com/ acessado em 1 de março de 2024).....	32
Figura 6: Estrutura química da EGCG com destaque para a estrutura trihidroxila no anel galato (BIANCHI et al., 2011).....	33
Figura 7: Esquema de uma célula de difusão do tipo Franz (Adaptado de DAL'BELO, 2008).	45
Figura 8: Curva Analítica para a EGCG.....	56
Figura 9: Gráfico para avaliação da Normalidade dos resíduos.....	56
Figura 10: Gráfico para avaliação da Independência dos resíduos.....	57
Figura 11: Gráfico para avaliação da variação dos resíduos.....	57
Figura 12: Gráfico para avaliação dos resíduos padronizados.....	58
Figura 13: Cromatograma do Padrão de EGCG com 0,10 mg.mL ⁻¹	58
Figura 14: Cromatogramas obtidos em triplicata dos brancos (placebos) das formulações de Géis.	59
Figura 15: Cromatogramas obtidos em triplicata dos brancos (placebos) da formulação Pomada.	59
Figura 16: Cromatogramas obtidos em triplicata dos brancos (placebos) das formulações de Cremes.....	60
Figura 17: Fatores avaliados na robustez para tempo de retenção no Padrão 0,10 mg.mL ⁻¹	62
Figura 18: Superfície de resposta para o tempo de retenção no Creme 02.....	62
Figura 19: Fatores avaliados na robustez para área no Padrão 0,10 mg.mL ⁻¹	63

Figura 20: Variação na área observada com mudanças na vazão da fase móvel no Creme 02.	63
Figura 21: Perfil de liberação <i>in vitro</i> obtido para solução de EGCG $\geq 90\%$ e Gel 02, com barra de erros correspondente ao DP.	65
Figura 22: Perfil de liberação <i>in vitro</i> obtido para o Creme 02 e Pomada, com barra de erros correspondente ao DP.	66
Figura 23: Perfil de liberação <i>in vitro</i> obtido para solução de EGCG $\geq 90\%$ para avaliação da membrana, com barra de erros correspondente ao DP.	66
Figura 24: Suor humano artificial com EGCG dissolvida no tempo inicial (esquerda) e após 8 dias (direita).....	67
Figura 25: Amostras das formulações após 1 mês do teste de Estabilidade Acelerada, sendo, da esquerda para a direita, Gel 01, Gel 02, Creme 01, Creme 02 e Pomada.	68
Figura 26: Densidade das formulações ao longo do tempo do teste de Estabilidade Acelerada (40 °C e 75% de umidade), com barra de erros correspondente ao DP...	69
Figura 27: pH das formulações ao longo do tempo do teste de Estabilidade Acelerada (40 °C e 75% de umidade), com barra de erros correspondente ao DP...	70
Figura 28: Teor de EGCG ao longo do tempo do teste de Estabilidade Acelerada (n=3), com barra de erros correspondente ao DP.	71
Figura 29: Estrutura química da (a) Vitamina E e do (b) Acetato de tocoferol (SILVA et al., 2019).....	73
Figura 30: Produtos gerados pela oxidação e epimerização da EGCG (Adaptado de ALVES, 2013 e KRUPKOVA et al., 2016).	85
Figura 31: Formulações Gel 01, Gel 02, Creme 01, Creme 02 e Pomada (da esquerda para a direita), (a) no tempo zero, (b) após 3 meses e (c) após 6 meses de Teste de Estabilidade.....	100
Figura 32: EGCG $\geq 90\%$ dispersa em óleo mineral com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	102
Figura 33: EGCG $\geq 90\%$ dispersa em óleo mineral com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	102
Figura 34: Branco Gel 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.	102
Figura 35: Branco Gel 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.	102
Figura 36: Formulação Gel 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	102

Figura 37: Formulação Gel 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	102
Figura 38: Formulação Gel 01 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	103
Figura 39: Formulação Gel 01 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	103
Figura 40: Branco Gel 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.	103
Figura 41: Branco Gel 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.	103
Figura 42: Formulação Gel 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	103
Figura 43: Formulação Gel 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	103
Figura 44: Formulação Gel 02 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	104
Figura 45: Formulação Gel 02 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	104
Figura 46: Branco Creme 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.	104
Figura 47: Branco Creme 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.	104
Figura 48: Formulação Creme 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada...	104
Figura 49: Formulação Creme 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada...	104
Figura 50: Formulação Creme 01 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	105
Figura 51: Formulação Creme 01 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	105
Figura 52: Branco Creme 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.	105
Figura 53: Branco Creme 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.	105
Figura 54: Formulação Creme 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada...	105
Figura 55: Formulação Creme 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada...	105
Figura 56: Formulação Creme 02 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	106
Figura 57: Formulação Creme 02 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	106
Figura 58: Branco Pomada com ampliação de 200x – sem luz polarizada.	106
Figura 59: Branco Pomada com ampliação de 200x – com luz polarizada.	106
Figura 60: Formulação Pomada com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	106

Figura 61: Formulação Pomada com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	106
Figura 62: Formulação Pomada após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.....	107
Figura 63: Formulação Pomada após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.....	107
Figura 64: Cromatograma do Gel 01 no tempo zero.....	108
Figura 65: Cromatograma do Gel 01 após 6 meses.....	108
Figura 66: Cromatograma do Gel 02 no tempo zero.....	108
Figura 67: Cromatograma do Gel 02 após 6 meses.....	108
Figura 68: Cromatograma do Creme 01 no tempo zero.....	108
Figura 69: Cromatograma do Creme 01 após 6 meses.....	108
Figura 70: Cromatograma do Creme 02 no tempo zero.....	108
Figura 71: Cromatograma do Creme 02 após 6 meses.....	108
Figura 72: Cromatograma da Pomada no tempo zero.....	109
Figura 73: Cromatograma do Pomada após 6 meses.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição e proporção (%) dos componentes das formulações semissólidas	50
Tabela 2: Parâmetros modificados para avaliação da robustez	53
Tabela 3: Composição suor humano artificial (ALVES, 2013).	54
Tabela 4: Pureza de pico obtida para o Padrão e Gel 01 calculada pelo software. ...	60
Tabela 5: Valores obtidos para a precisão (repetibilidade), n = 6.....	61
Tabela 6: Valores obtidos para a exatidão (n = 3).....	61
Tabela 7: Valores de recuperação para o tempo de retenção e área obtidas para avaliar robustez.....	64
Tabela 8: Valores de teor (% m/m) para as formulações e EGCG $\geq 90\%$ no tempo zero.	64
Tabela 9: Avaliação da cinética de liberação da EGCG.....	67
Tabela 10: Densidade média das formulações a 25 °C com 0, 3 e 6 meses (n = 3).68	
Tabela 11: Valores de pH médios obtidos com 0, 3 e 6 meses (n = 3).	69
Tabela 12: Valores de teor (% m/m) para as formulações com 0, 1, 3 e 6 meses (n = 3).	70
Tabela 13: Desvios Padrões e Coeficientes de Variação obtidos para densidade das formulações a 25 °C com 0, 3 e 6 meses (n = 3).....	101
Tabela 14: Desvios Padrões e Coeficientes de Variação obtidos para pH das formulações com 0, 3 e 6 meses (n = 3).	101
Tabela 15: Desvios Padrões e Coeficientes de Variação obtidos para o teor de EGCG obtido para cada formulação após 1, 3 e 6 meses (n = 3).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coeficiente linear da curva analítica
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Coeficiente angular da curva analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de fotodiodo
DP	Desvio padrão
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
GCG	Galato de galocatequina
Guia nº 20/2019	Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos
m/m	Massa-massa
mL	Mililitros
mm	Milímetros
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
r	Coeficiente de correlação de Pearson
r²	Coeficiente de determinação
RDC 166/2017	Resolução da Diretoria Colegiada nº 166 de 24 de julho de 2017, referente a Validação de métodos analíticos
RDC 318/2019	Resolução da Diretoria Colegiada nº 318 de 06 de novembro de 2019, referente a Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
pH	Potencial Hidrogeniônico
%	Percentual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Formulações Semissólidas	21
1.1.1. Gel	21
1.1.2. Creme	22
1.1.3. Pomada	23
1.1.4. Componentes do veículo	24
1.2. A Pele	27
1.2.1. Estrutura da Pele	27
• Hipoderme	28
• Derme	28
• Epiderme	29
1.2.2. A Pele como via de administração	31
1.3. A EGCG e suas ações terapêuticas	33
1.3.1. Ação antioxidante	34
1.3.2. Ação anti-inflamatória	34
1.3.3. Ação antimicrobiana	35
1.3.4. Ação imunomoduladora e anticarcinogênica	36
1.4. EGCG e suas aplicações tópicas	36
1.4.1. Câncer de pele e danos UV	36
1.4.2. Queimaduras	37
1.4.3. Queloides	37
1.4.4. Alopecia	38
1.4.5. Psoríase	38
1.4.6. Cicatrização de feridas	39
1.4.7. Aplicações cosméticas	39
1.5. EGCG e seus desafios	40
1.6. Caracterizações de Formulações Semissólidas	41
1.6.1. Validação Analítica	41
1.6.2. Liberação <i>in vitro</i>	44
1.6.3. Estabilidade	45

2. OBJETIVOS	47
2.1. Objetivo Geral	47
2.2. Objetivos Específicos.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. Equipamentos	48
3.2. Reagentes.....	48
3.3. Preparo das formulações	49
3.4. Caracterização das formulações.....	49
3.5. Verificação do teor de EGCG e validação do método CLAE	51
3.5.1. Método de extração da EGCG das formulações	51
3.5.2. Método cromatográfico	51
• Linearidade e Intervalo	51
• Seletividade	52
• Precisão	52
• Exatidão	52
• Robustez.....	52
3.6. Avaliação morfológica.....	53
3.7. Liberação <i>in vitro</i>	53
3.8. Estabilidade das formulações.....	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Preparo e caracterização das formulações.....	55
4.2. Validação do método CLAE para verificação do teor de EGCG	55
4.2.1. Linearidade	55
4.2.2. Seletividade	58
4.2.3. Precisão.....	61
4.2.4. Exatidão.....	61
4.2.5. Robustez	61
4.3. Avaliação do teor de EGCG nas formulações	64
4.4. Morfologia das formulações.....	64
4.5. Liberação <i>in vitro</i>	65
4.6. Estabilidade das formulações.....	67
5. DISCUSSÃO	72

5.1. Preparo das formulações	72
5.2. Caracterização das propriedades gerais	75
5.3. Validação do método CLAE para verificação do teor de EGCG	76
5.4. Avaliação do teor de EGCG nas formulações	78
5.5. Morfologia das formulações.....	78
5.6. Liberação <i>in vitro</i>	80
5.7. Estabilidade das formulações.....	81
6. CONCLUSÃO.....	87
7. REFERÊNCIAS	88
8. APÊNDICES.....	100
Apêndice A: Formulações no tempo zero e após 3 e 6 meses de Teste de Estabilidade.....	100
Apêndice B: Dados complementares de densidade e pH das formulações.	101
Apêndice C: Imagens obtidas por Microscopia Ótica	102
Apêndice D: Cromatogramas das formulações no tempo zero e após Teste de Estabilidade Acelerada (6 meses).	108
9. ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. Formulações Semissólidas

Uma formulação semissólida é uma forma farmacêutica para uso tópico ou em certas mucosas com o intuito de promover ação local (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2021). Ao contrário de um líquido que escoar e se deforma com facilidade, um semissólido possui menor fluidez, não podendo ser derramado ou não se adaptando facilmente a um recipiente em temperatura ambiente (OSBORNE, 2008).

As formulações semissólidas possuem aplicações para fins cosméticos e farmacêuticos, sendo que além de serem usadas com o objetivo de liberação do princípio ativo diretamente no local do tratamento, fornecendo contato prolongado, também são uma maneira viável de administrar princípios ativos que são sensíveis às transformações metabólicas, o que diminui a necessidade de administrar grandes quantidades do mesmo e como tal, proporcionar menos reações adversas (LOURENÇO, 2013).

Como exemplos de formulações semissólidas temos os géis, cremes e pomadas, sendo que na **Figura 1** pode ser visualizado um esquema que resume as definições de cada uma delas.

1.1.1. Gel

O gel é uma formulação semissólida composta por mais de 50% de água e voláteis e por um agente gelificante, o qual dá firmeza a uma solução ou dispersão coloidal (partículas de 1 nm a 1 mm) de um ou mais princípios ativos (BARNES et al., 2021; BRASIL, 2019b).

Pode ser hidrofílico, ou seja, formado pela adição de agente gelificante à água, glicerol ou propilenoglicol, ou hidrofóbico, sendo formado por uma base gordurosa que consiste, usualmente, de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco (BRASIL, 2019b).

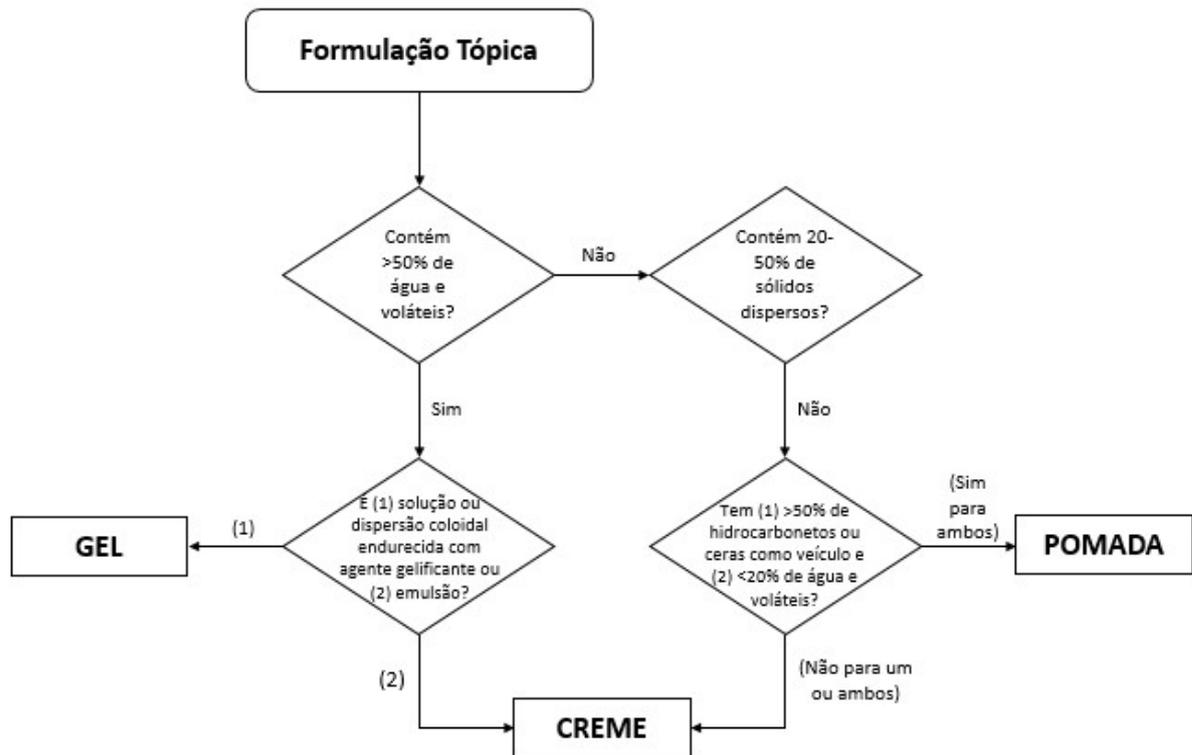


Figura 1: Resumo das definições de cada formulação semissólida (Adaptado de BUHSE et al., 2005).

Os géis podem ser transparentes em um sistema monofásico ou opacos em um sistema bifásico, são espessos e se liquefazem ao entrar em contato com a pele, o que proporciona uma sensação de refrescância. Ao secarem formam uma película fina que não mancha e nem deixa uma textura oleosa, podendo ser lavados facilmente com água. Porém, são pouco oclusivos, ou seja, evitam pouco a perda de água e calor, e proporcionam pouca hidratação (BARNES et al., 2021; BUHSE et al., 2005). Por esse motivo, são mais indicados em aplicações que envolvam regiões do corpo com muito pelo (como o couro cabeludo), oleosas (como a pele) e que não transpirem muito, uma vez que a transpiração remove o gel (MAYBA e GOODERHAM, 2018).

1.1.2. Creme

O creme é uma formulação semissólida que pode conter um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma emulsão, a qual contém mais de

20% de água e voláteis e/ou menos de 50% de hidrocarbonetos, ceras ou polietilenoglicóis como veículo (BARNES et al., 2021; BRASIL, 2019b)

Uma emulsão consiste em um sistema bifásico de pelo menos dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso como glóbulos (fase interna ou dispersa) dentro da outra fase líquida (fase externa ou contínua), geralmente estabilizada por um agente emulsionante (BUHSE et al., 2005).

Os cremes podem ser de característica óleo-em-água (O/A), onde o óleo ou material oleoso é a fase dispersa e a água ou solução aquosa é fase contínua ou água-em-óleo (A/O), onde encontramos o cenário contrário (ALLEN JR. et al., 2007).

Geralmente são opacos, viscosos, não oleosos ou levemente oleosos dependendo do tipo, tendendo a evaporar ou ser absorvido quando esfregado na pele. Possuem características intermediárias em relação aos géis e pomada quanto a viscosidade, facilidade em espalhar, ação hidratante e oclusiva, podendo então serem usados tanto em peles secas como oleosas e úmidas e em todas as áreas do corpo, principalmente nas áreas flexurais (dobras) e genitais (BARNES et al., 2021; MAYBA e GOODERHAM, 2018).

1.1.3. Pomada

A pomada é uma formulação semissólida composta por um ou mais princípios ativos em baixa proporção (<20%), dispersos ou dissolvidos em uma base não aquosa, normalmente monofásica (BRASIL, 2019b; VAN HEUGTEN, 2018). Contém menos de 20% de água e voláteis e mais de 50% de hidrocarbonetos, ceras ou polietilenoglicóis como veículo (BARNES et al., 2021), sendo assim um ambiente apolar. Por esse motivo, muitas vezes não precisa de uso de conservantes (LOURENÇO, 2013).

Podem ser classificadas em quatro tipos principais dependendo da base utilizada: (1) bases de hidrocarbonetos, como por exemplo petróleo, cera microcristalina, ceresina; (2) bases de absorção, como por exemplo lanolina, cera de abelha; (3) bases removíveis em emulsão/água, como por exemplo cera emulsionante e (4) bases solúveis em água, como por exemplo macrogóis 200, 300 e 400 (BARNES et al., 2021).

Podem ser opacas ou translúcidas, são viscosas e gordurosas, tendendo a não evaporar ou ser absorvida quando esfregada na pele (VAN HEUGTEN, 2018).

Elas possuem forte efeito emoliente, suavizando e lubrificando a pele e forte efeito oclusivo, evitando perda de água e calor. São mais difíceis de espalhar se comparadas com géis e cremes e muitas vezes não são preferidas pelos usuários, devido sua característica mais oleosa. Por esse motivo são mais indicadas em aplicações que envolvam regiões mais secas da pele e que tenham pouco pelo (BARNES et al., 2021, MAYBA e GOODERHAM, 2018).

1.1.4. Componentes do veículo

Além do princípio ativo, aquele que fara com que a formulação semissólida gere o tratamento ou efeito desejado, as formulações semissólidas também são compostas por diversos outros componentes em seus veículos, conforme resumido na **Figura 2**.

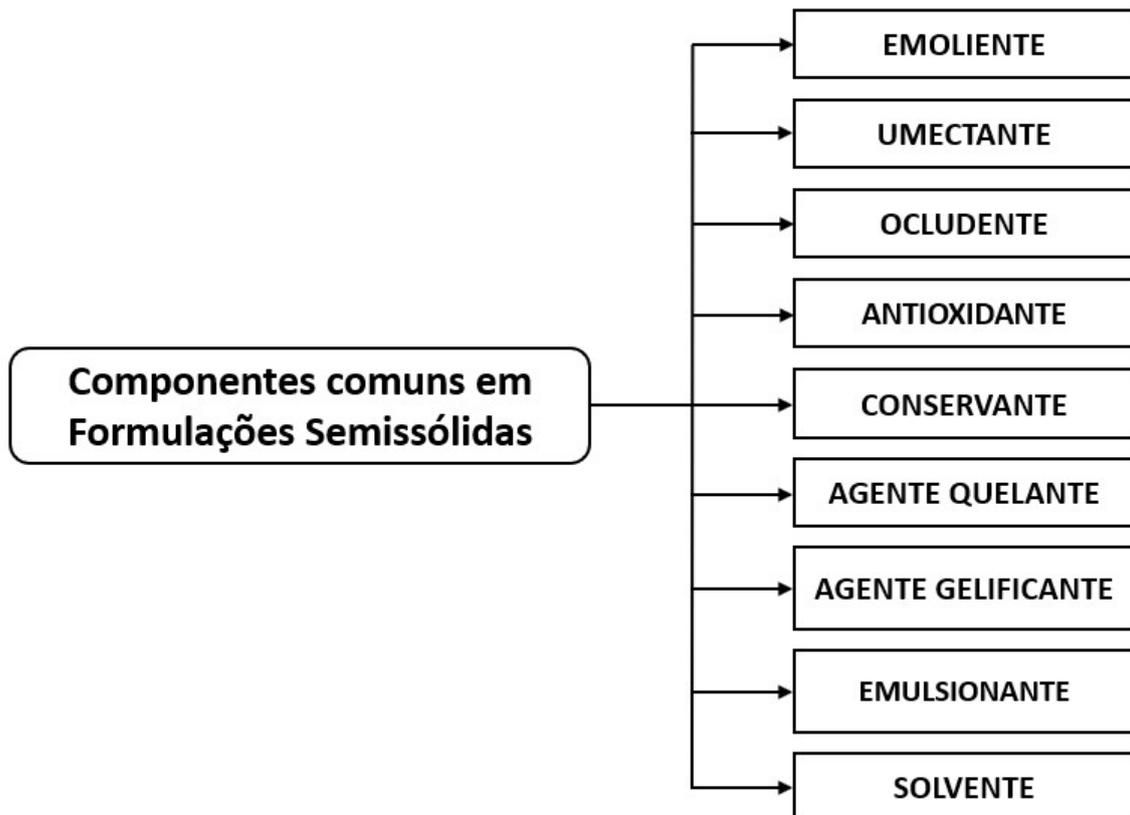


Figura 2: Componentes comuns em formulações semissólidas.

O solvente é o componente que dispersa ou dissolve todos os outros componentes, sendo o que está presente em maior proporção. Como solvente mais

comumente utilizado em géis e cremes temos a água, a qual deve ser esterilizada e livre de contaminantes que possam prejudicar a qualidade e estabilidade das formulações (JUREMA, 2019; ZAGO, 2017).

O agente gelificante ou espessante é um componente que ao ser disperso no meio assume uma conformação que adiciona viscosidade ao mesmo, podendo ser de origem sintética ou semissintética, sendo normalmente um polímero (BARNES et al., 2021; MELO et al., 2018). Ele é o agente principal da formulação de um gel, sendo que como exemplo de gelificantes de origem sintética temos o carbômero e semissintética temos o hidroxietilcelulose, que altera a viscosidade do meio através da absorção de água (BARNES et al., 2021).

O emulsionante ou surfactante é o agente responsável pela formação e estabilização da emulsão em cremes. Tipicamente é uma molécula anfifílica, ou seja, que possui uma região polar e apolar, conseguindo interagir ao mesmo tempo com a fase aquosa e oleosa, além de promover a redução da tensão superficial e gerar repulsão eletrostática entre as gotículas, promovendo e estabilizando a emulsão (BARNES et al., 2021). Normalmente a parte apolar é composta por cadeias de hidrocarbonetos alifáticos, lineares ou ramificados e a parte polar por grupos ácidos ou básicos (ZAGO, 2017).

Segundo SPADA et al., 2022, os emulsionantes podem ser classificados como:

- a. *Aniônico*: a parte polar possui uma carga negativa. São bastante populares, sendo bastante eficientes na remoção de sujeira, oleosidade e impurezas, todavia podem ser mais irritantes a pele. Como exemplos temos o Lauril sulfato de sódio e o Dodecilbenzeno sulfonato de sódio;
- b. *Catiônico*: a parte polar possui uma carga positiva. Possuem uma eficiência de limpeza menor que os aniônicos, com potencial de irritação semelhante. Como exemplos temos o Cloreto de benzalcônico, Cocamidopropil betaína e metossulfato de behentrimônio;
- c. *Não-iônico*: a parte polar não possui carga, sendo bastante adaptáveis e funcionando bem em ambientes alcalinos e ácidos. Eles são eficazes na solubilização de óleos e outros ingredientes hidrofóbicos. Como exemplos temos o Polissorbato 20 (popularmente conhecido como Tween 20), Decil glucosídeo e polietilenoglicol;

- d. *Anfótero*: a parte polar pode ter diferentes cargas dependendo do meio. Tendem a ser menos irritantes à pele que os outros tipos, sendo que exemplos compreendem cocamidopropil betaína, lauril betaína, cocoanfoacetato de sódio e cocoanfodiacetato dissódico.

Os umectantes são substâncias higroscópicas de baixo peso molecular que penetram facilmente no estrato córneo e são responsáveis por atrair e reter a umidade da pele, seja puxando-a da derme ou do meio externo (quando umidade relativa do ar está superior a 80%). Assim, os umectantes são normalmente incluídos em emulsões O/A para aumento do seu poder de hidratação (BARNES et al., 2021; JUREMA, 2019; ZAGO, 2017). São umectantes normalmente utilizados: glicerina, gelatina, propilenoglicol, butilenoglicol, pantenol, sorbitol, uréia, ácido hialurônico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirrolidina e carboxílico sódico (BARNES et al., 2021).

Os emolientes são hidrocarbonetos saturados e insaturados de comprimento variável que simulam as bicamadas lipídicas do estrato córneo preenchendo os espaços entre os corneócitos. Isso promove uma melhora na aparência e textura geral da pele, além de fornecer lubricidade, ou seja, uma sensação de suavidade e plasticidade à pele. Frequentemente são usados em combinação com emulsionantes. Exemplos de emolientes compreendem colesterol, esqualeno, ácido linoléico, ácido esteárico, ácido oleico, álcoois graxos (BARNES et al., 2021).

Os ocludentes são óleos e ceras que agem como lipídios naturalmente encontrados na pele. Eles formam uma camada hidrofóbica sobre a pele e bloqueiam fisicamente a perda de água transepidérmica (TEWL). Alguns ocludentes entram no espaço intercelular e interagem com os lipídios do estrato córneo, reforçando a barreira cutânea. Alguns exemplos são parafina, cera de abelha, óleo mineral, dimeticona, lanolina, cera de carnaúba, álcool cetílico e triglicerídeo caprílico (BARNES et al., 2021).

Os antioxidantes são substâncias adicionadas com o intuito de evitar degradações oxidativas em veículos tópicos contendo óleos e gorduras insaturados, que são mais suscetíveis a reações de oxidação. Os antioxidantes podem atuar de três maneiras: (1) captando os radicais livres gerados nas reações de oxidação, o que interrompe o processo, (2) sofrendo a oxidação, sendo então agentes redutores, e (3) sequestrando metais que catalisam reações de oxidação (ZAGO, 2017). Exemplos de antioxidantes comumente usados em formulações tópicas incluem hidroxianisol

butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), palmitato de ascorbila, fosfato de ascorbila sódica e tocoferóis (BARNES et al., 2021).

Os agentes quelantes ou sequestrantes são substâncias que tem como função realizar o sequestro de metais (ferro, cobre, cálcio e magnésio), possíveis resíduos da fabricação de insumos, evitando que ocorram reações de degradação catalisadas por eles. Isso evita a desestabilização dos produtos, o que leva também ao aumento dos efeitos esperados dos conservantes e antioxidantes, fazendo com que os agentes quelantes atuem de forma sinérgica com os mesmos. O mais utilizado é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e seus sais (BARNES et al., 2021; JUREMA, 2019; ZAGO, 2017).

Os conservantes são substâncias incluídas com o intuito de evitar a contaminação e crescimento de microrganismos, por isso são normalmente adicionados em géis e cremes, formulações ricas em água, sendo que nos cremes, o conservante escolhido deve ser solúvel em ambas as fases. Eles devem ser capazes controlar o crescimento de microrganismos, mantendo teor dos princípios ativos e características organolépticas dos produtos inalteradas (ZAGO, 2017), prolongando o prazo de validade, garantindo conformidade regulatória e evitando recalls de produtos (SHARMA et al., 2023). Exemplos de alguns conservantes comumente usados incluem álcoois (por exemplo, álcool benzílico, etanol, fenoxietanol), hidroxibenzoatos (todos os sais), fenóis (por exemplo, clorocresol) e compostos de amônio quaternário (por exemplo, cloreto de benzalcônio, cetrimida) (BARNES et al., 2021).

1.2. A Pele

1.2.1. Estrutura da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, compreendendo aproximadamente 15% do peso corporal total (PETRILLI e LOPEZ, 2018) e representando uma área de superfície de 1,8 a 2,0 m² ou, quando consideramos os folículos pilosos e dutos sudoríparos, 25 a 30 m² (SZALAY e WERTZ, 2023). Tem como funções a modulação da temperatura e umidade corporal e principalmente, proteção contra agentes químicos, físicos e biológicos presentes no ambiente externo (ALLEN JR. et al., 2007). Ela é formada pela epiderme, derme e hipoderme, conforme ilustrado na **Figura 3**.

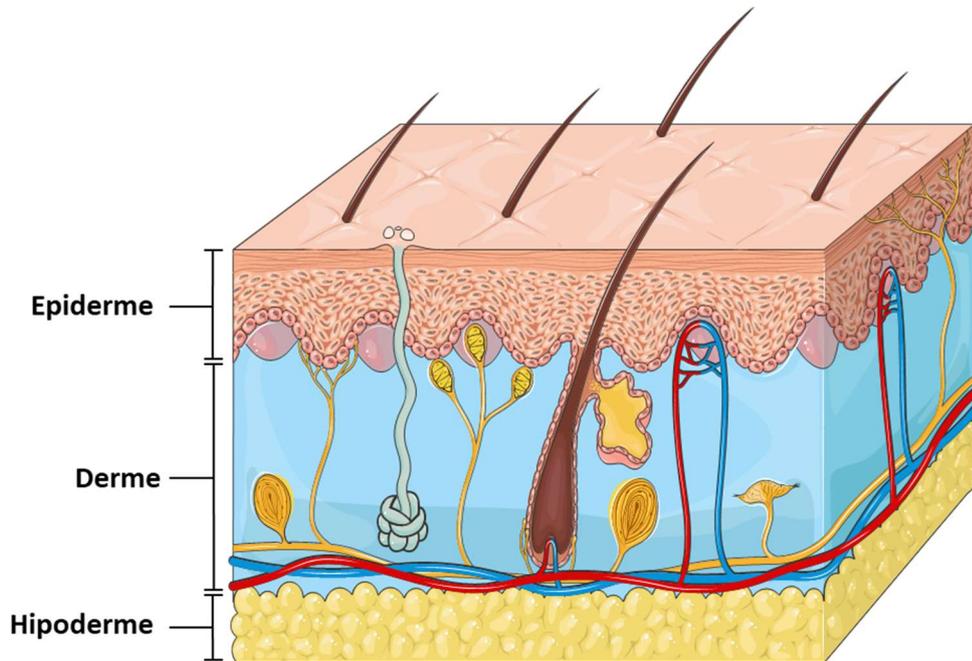


Figura 3: Representação das camadas da pele (Adaptado usando Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/> acessado em 1 de março de 2024).

- **Hipoderme**

A hipoderme é a camada mais interna da pele composta por tecido conjuntivo e adiposo, logo, formada pelos fibroblastos, adipócitos (células de gordura) e uma fração de células estroma-vasculares. Tem como função a manutenção da temperatura, amortecimento mecânico e armazenamento de energia (LOURENÇO, 2013; HOFMANN et al., 2023).

- **Derme**

A derme é a camada intermediária da pele, tendo uma espessura que varia entre 2 a 6 mm, podendo ser dividida em duas subcamadas, as quais são chamadas de estratos: o papilar, que fica mais próximo a epiderme, e o reticular, que fica mais próximo a hipoderme. O estrato papilar é composto de fibras de colágeno frouxamente entrelaçadas, tecido conjuntivo e terminações nervosas responsáveis pela transmissão sensorial do toque, vibração e calor. Já o reticular é composto de fibras de colágeno fortemente interligadas, sendo responsável pela função de suporte,

elasticidade e flexibilidade da pele, além de conter os vasos sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (HOFMANN et al., 2023).

Essa camada tem como funções a elasticidade, resposta sensorial e resistência da pele, uma vez que contém também a maioria das células envolvidas na resposta imune e inflamatória da mesma. Além disso, também é responsável por oxigenar, nutrir e remover resíduos por difusão da epiderme (LOURENÇO, 2013; HOFMANN et al., 2023).

- **Epiderme**

A epiderme é a camada mais externa da pele, com uma espessura variando de 30 μm (pálpebras) até 600 μm (palmas das mãos e solas dos pés), sendo composta por cinco estratos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (HOFMANN et al., 2023). Ela também é dividida em epiderme viável e não viável, sendo o estrato córneo a parte não viável e os outros estratos, a parte viável (PETRILLI e LOPEZ, 2018). Uma representação da mesma pode ser observada na **Figura 4**.

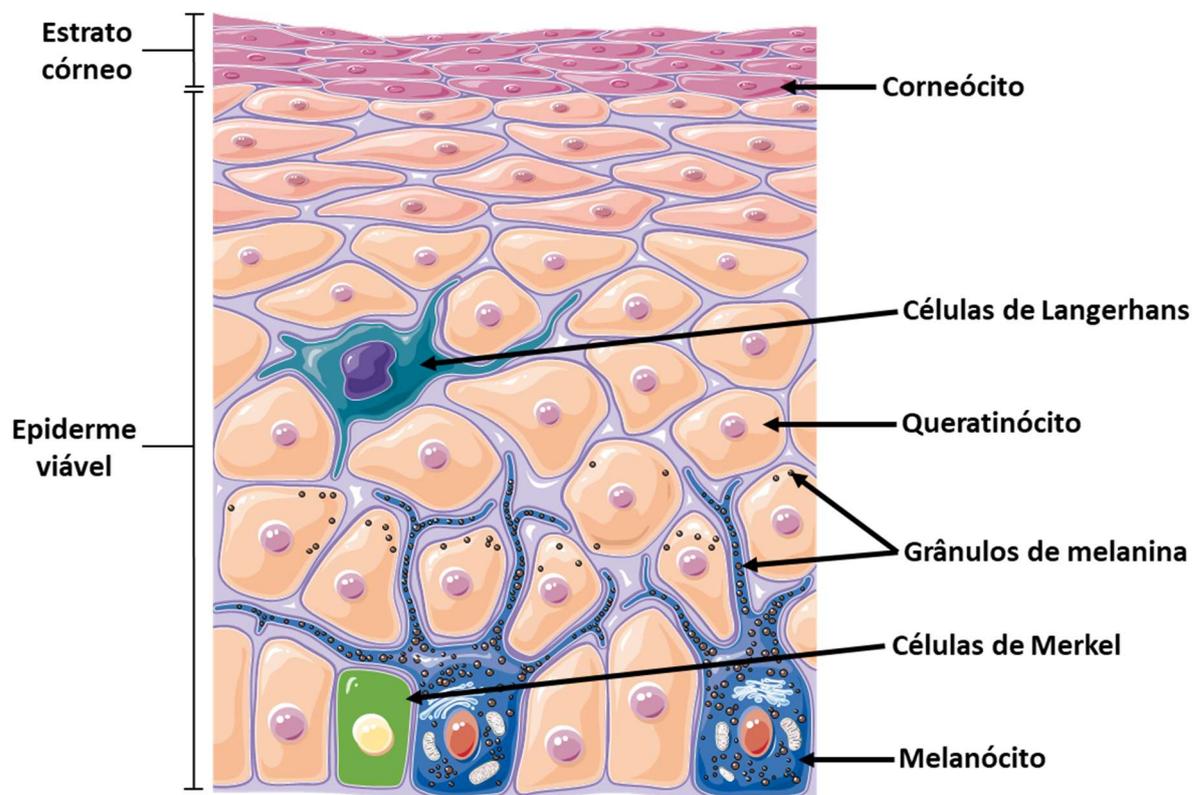


Figura 4: Representação da Epiderme (Adaptado usando Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/> acessado em 1 de março de 2024).

Ela é uma camada não vascularizada, por isso, depende da derme para sua nutrição, oxigenação e remoção de resíduos (HOFMANN et al., 2023; PETRILLI e LOPEZ, 2018). Todos os estratos estão fortemente conectados pelos queratinócitos, células geradas no estrato basal, o mais interno, que vão passando por diferentes fases de maturação, levando a sua diferenciação e ascensão ao longo dos outros estratos até se tornar corneócitos, células lamelares formadas de queratina e ausentes em organelas que formam o estrato córneo, o mais externo (GOMES e BOLDO, 2020; HOFMANN et al., 2023).

O estrato córneo possui uma estrutura fina (cerca de 15-20 μm) e é descrito como uma estrutura de “tijolos e argamassa”, onde os tijolos correspondem ao corneócitos e a argamassa corresponde a uma matriz lipídica, composta predominantemente de ceramidas (40 - 50%), colesterol (25%) e ácidos graxos livres (10 - 15%). Essa matriz lipídica se organiza em múltiplas bicamadas, se tornando mais compacta com o aumento da profundidade do estrato córneo, regulando assim o fluxo, a taxa e a magnitude de perda transepidérmica da água (SPADA et al., 2022).

Além dos queratinócitos, a epiderme também é composta pelos melanócitos, presentes no estrato basal, os quais são responsáveis pela produção da melanina, que juntamente com o ácido transurocânico protege a pele contra a radiação UV; as células de Merkel, presentes no estrato basal ou próximo a ele, que atuam como receptores sensoriais na pele e as células de Langerhans, presentes em toda a epiderme viável, mas em maior quantidade no estrato espinhoso, que são responsáveis por monitorar toda a epiderme e detectar antígenos, os quais são captados por elas e levados até os gânglios linfáticos onde são produzidos anticorpos para os patógenos detectados (HOFMANN et al., 2023; SZALAY e WERTZ, 2023).

Assim, devido a sua estrutura e características como pH baixo e presença de pouco nutrientes, a epiderme tem como funções a manutenção da umidade da pele e proteção contra radiação UV, proliferação de microrganismos e outros agentes externos (PETRILLI e LOPEZ, 2018; SPADA et al., 2022; SZALAY e WERTZ, 2023), sendo que o estrato córneo é a primeira barreira, impedindo que haja penetração para as camadas mais internas (RAGHAVAN et al., 2019).

1.2.2. A Pele como via de administração

Para que um princípio ativo aplicado à pele tenha efeito terapêutico, dependendo do objetivo, ele deve ser capaz de se manter no estrato córneo (epiderme não viável) e outras vezes deve ser necessário que atinja a epiderme viável (estratos mais internos) ou a derme e fique retido por um certo período de tempo (LOURENÇO, 2013).

Essa permeação depende de vários fatores como as características físico-químicas do princípio ativo, da formulação semissólida e da integridade da pele. Normalmente, uma pele íntegra irá atuar como uma barreira, o que limitará naturalmente o grau e velocidade de penetração do princípio ativo (ALLEN JR. et al., 2007). Dentre as camadas da pele, o estrato córneo atuará como a principal barreira, dificultando a permeação de quase todos os compostos com peso molecular superior a 600 Daltons (BARNES et al., 2021).

O principal mecanismo de permeação de um princípio ativo na pele é a difusão ao longo do gradiente de concentração (BARNES et al., 2021), o qual de maneira geral, pode ocorrer através de três vias: (1) o caminho intracelular (de forma direta através das células), (2) o caminho extracelular (em torno das células) e (3) através dos anexos da pele (folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas) (LOURENÇO, 2013). Essas vias podem ser visualizadas no esquema da **Figura 5**.

Na via intracelular o princípio ativo necessita se particionar e difundir através dos corneócitos, os quais por serem ricos em queratina proporcionam um ambiente aquoso que facilita a passagem de princípios ativos hidrofílicos (LOURENÇO, 2013). É uma via mais direta, mas requer que o princípio ativo atravesse as camadas alternadas de corneócitos e matriz lipídica, o que envolve uma sequência de partição e difusão em meios hidrofílicos e lipofílicos alternados (BARNES et al., 2021).

Na via intercelular, o princípio ativo precisa se particionar e difundir entre as bicamadas lipídicas, o que é preferido por aqueles que são pequenos e mais lipofílicos (LOURENÇO, 2013). É uma via menos direta que a via intracelular uma vez que o princípio ativo contorna os corneócitos através da matriz lipídica, sendo estimado que a água percorre um percurso 50 vezes maior ao se comparar com a via intracelular (BARNES et al., 2021).

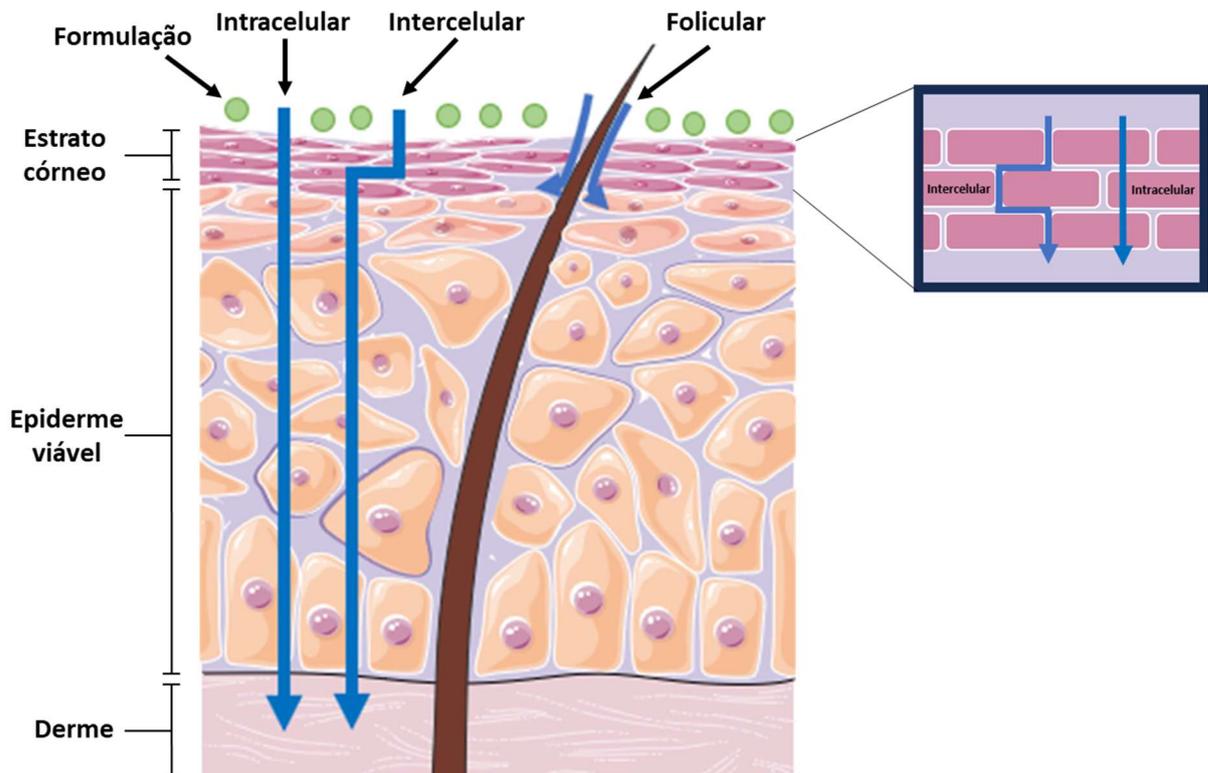


Figura 5: Vias de permeação do princípio ativo na pele (Adaptado usando Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/> acessado em 1 de março de 2024).

O transporte pelos anexos da pele é a via mais contínua utilizada, principalmente por princípios ativos grandes e polares, que possuem grande dificuldade em interagir com as camadas lipídicas do estrato córneo e assim usar as outras vias. Porém, temos uma baixa quantidade de anexos na pele, os quais representam somente 0,1% da área superficial, dificultando o uso dessa via, além da presença do suor que se desloca em sentido contrário do princípio ativo e da presença de sebo (BARNES et al., 2021; GOMES e BOLDO, 2020; LOURENÇO, 2013).

Em relação as características das formulações semissólidas, os géis por serem em sua maioria de característica não oleosa não são absorvidos pela pele, se liquefazendo e evaporando após aplicação (sem penetração). As pomadas também não são absorvidas, mas permanecem na pele após a aplicação (não evaporam). Já os cremes podem ficar na superfície ou serem absorvidas dependendo da sua característica e componentes (LOURENÇO, 2013).

1.3. A EGCG e suas ações terapêuticas

A EGCG é a catequina presente no chá verde (derivado da planta *Camellia sinensis*) em maior proporção (representando 50 a 80% do total de catequinas, o que corresponde a 200 a 300 mg em uma xícara de chá) e com maior atividade biológica (DAS et al., 2014; KHAN e MUKHTAR, 2019; SCHMITZ et al., 2005). Ela é um éster que se forma a partir da reação da epigalocatequina e do ácido gálico (ENG et al., 2018), também presentes no chá verde, possuindo fórmula molecular $C_{22}H_{18}O_{11}$ e uma massa molecular de $458,37 \text{ g.mol}^{-1}$. É sólida à temperatura ambiente, solúvel em água e sua estrutura química pode ser visualizada na **Figura 6**.

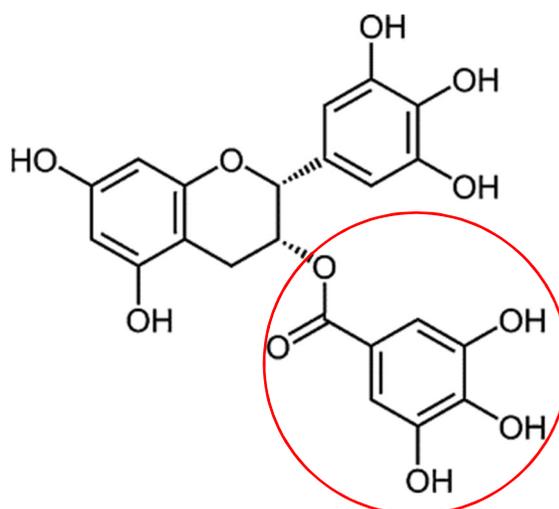


Figura 6: Estrutura química da EGCG com destaque para a estrutura trihidroxila no anel galato (BIANCHI et al., 2011).

Possui diversas aplicações terapêuticas devido às suas características antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antimicrobianas e anticarcinogênicas, sendo empregada como adjuvantes no tratamento de doenças metabólicas, como diabetes e obesidade, patologias cardiovasculares (ENG et al., 2018), alguns tipos de cânceres, como o de pele, pulmão, próstata, mama e trato gastrointestinal e na prevenção de doenças neurodegenerativas (KHAN e MUKHTAR, 2019), além de ser usada como antiviral e antibacteriana (ZHAO et al., 2022). Sua alta atividade biológica é atribuída principalmente à presença da estrutura trihidroxila no anel galato, ressaltada na **Figura 6** (KAYAL et al., 2019).

1.3.1. Ação antioxidante

A ação antioxidante da EGCG é a mais pronunciada, ocorrendo tanto diretamente como indiretamente. Na ação antioxidante direta, a EGCG atua na eliminação de radicais livres e quelação de íons metálicos. A eliminação de radicais livres se dá pela presença do grupo fenólico em sua estrutura, o qual reage com as espécies reativas de oxigênio, doando elétrons ou hidrogênios e estabilizando-as, o que quebra o ciclo de geração de novos radicais. A carga resultante na estrutura da EGCG é estabilizada e deslocalizada pela ressonância com o anel benzênico. A quelação de íons metálicos como ferro e cobre ocorre também devido à ação dos grupos hidroxilas adjacentes na sua molécula. Na ação antioxidante indireta da EGCG, ela participa de processos que induzem e produzem enzimas antioxidantes, que inibem enzimas pró-oxidantes e que produzem enzimas de desintoxicação de fase II (BERNATONIENE e KOPUSTINSKIENE, 2018; NIKKO et al., 2018; SCHMITZ et al., 2005).

Sua ação antioxidante foi avaliada através de testes padrões usados para esse fim. Em um teste de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) com incubação a uma temperatura de 10 °C, obteve-se para uma solução de EGCG um IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do radical livre) de 1,68 µg.mL⁻¹, sendo que para o ácido ascórbico esse valor corresponde a 14,2 µg.mL⁻¹, mostrando que a EGCG tem uma maior ação antioxidante ao ser comparada com ele (KAYAL et al., 2019).

Comparou-se sua ação antioxidante também com a curcumina, usando-se o teste de DPPH com uma incubação de 20 minutos em temperatura ambiente, obtendo-se para a EGCG um IC₅₀ de 8,52 ± 1,24 µg.mL⁻¹ e para a curcumina, 19,19 ± 2,13 µg.mL⁻¹. Usando-se agora o ensaio de ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), obteve-se para a EGCG e curcumina, um IC₅₀ de 4,12 ± 0,89 µg.mL⁻¹ e 15,03 ± 2,67 µg.mL⁻¹, respectivamente, mostrando também seu poder antioxidante superior (AVADHANI et al., 2017).

1.3.2. Ação anti-inflamatória

A inflamação é um processo natural do nosso corpo no qual o sistema imunológico reconhece e remove estímulos nocivos e estranhos. O processo é

regulado por diversas células do nosso sistema imunológico, as quais durante sua atuação liberam citocinas inflamatórias como Interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2), além de espécies reativas de oxigênio (LU e YEN, 2015; PAHWA et al., 2023).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a EGCG possui uma ação anti-inflamatória devido sua participação direta em processos de supressão da liberação de citocinas inflamatórias como a ciclooxigenase 2 (COX-2), TNF- α , NO e PGE2 (LU e YEN, 2015; SCHMITZ et al., 2005), além de atuar reduzindo as espécies reativas de oxigênio, o que protege as células contra seus danos.

1.3.3. Ação antimicrobiana

A EGCG possui uma ampla ação antimicrobiana, incluindo fungos (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*), bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococci spp.*) e vírus (*Orthomyxoviridae* (Influenza), *Flaviviridae* (hepatite C), *Hepadnaviridae* (hepatite B), *Herpesviridae* (herpes simples) e adenovírus) (DAS et al., 2014).

No caso dos fungos, a EGCG causa instabilidade metabólica, danos a membrana celular, inibe a diidrofolato redutase (DHFR), uma enzima ligada ao processo de replicação do DNA, além de causar um efeito sinérgico com outros antifúngicos que inibem a síntese de ergosterol, constituinte natural das membranas miceliais dos fungos. Há estudos também que mostram sua ação prejudicando a formação de biofilmes da espécie *Candida* (DAS et al., 2014).

No caso das bactérias, a EGCG também causa danos a membrana celular (leva a fragmentação da bicamada lipídica) e inibe a diidrofolato redutase (DHFR), assim como nos fungos. Ela também inibe a DNA girase bacteriana, impedindo o superenrolamento do DNA e inibe a penicilinase, uma enzima que inativa a penicilina (DAS et al., 2014). Quando a EGCG não consegue se ligar a membrana bacteriana, como é o caso de bactérias gram-negativas, ela inibe crescimento bacteriano causando estresse oxidativo pela produção de peróxido de hidrogênio (NIKKO et al., 2018). A EGCG também interfere na formação de biofilmes bacterianos, um mecanismo de proteção e resistência das mesmas (XU et al., 2021).

No caso de vírus, ela atua inibindo a transcriptase reversa, processo envolvido na replicação viral dentro da célula, além de evitar a ligação dos mesmos

com a membrana celular, impedindo sua entrada e posterior replicação (DAS et al., 2014).

1.3.4. Ação imunomoduladora e anticarcinogênica

A ação imunomoduladora da EGCG ocorre de maneira direta e indireta. De forma direta, a EGCG atua inibindo a divisão das células T, as quais estimulam a proliferação de células B, ambas responsáveis pela expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como os receptores do tipo-Toll que atuam no reconhecimento de patógenos. Além disso, a EGCG estimula múltiplas vias de sinalização das PRRs, o que melhora a resposta imunológica. De forma indireta, a EGCG atua através do seu efeito antioxidante e anti-inflamatório, uma vez que um ambiente com estresse oxidativo e inflamado leva a um prejuízo na imunidade do indivíduo, além do seu efeito antimicrobiano, impedindo a ligação e entrada de patógenos na célula, auxiliando o sistema imunológico (WANG et al., 2021).

A ação da EGCG em neoplasias malignas ocorre tanto na prevenção do surgimento de células tumorais como na redução e tratamento do câncer. Sua ação ocorre através de alguns mecanismos incluindo (1) inibição da migração e a invasão de células tumorais, (2) indução de apoptose das mesmas, um processo de proteção contra o início do câncer, (3) inibição da sua angiogênese, (4) inibição da sua proliferação e crescimento tumoral e (5) outros mecanismos que incluem desintoxicação e ação indireta da EGCG devido sua ação anti-inflamatória e antioxidante (BERNATONIENE e KOPUSTINSKIENE, 2018; ZHAO et al., 2022).

1.4. EGCG e suas aplicações tópicas

Devido suas propriedades terapêuticas apresentadas anteriormente, a EGCG também vem sendo estudada em diversas aplicações dermatológicas e cosméticas, sendo em seguida apresentado algumas delas.

1.4.1. Câncer de pele e danos UV

A EGCG apresenta um efeito fotoprotetor na pele, reduzindo a inflamação causada por uma exposição solar (SCHMITZ et al., 2005), além de proteger a pele

contra tumores cutâneos induzidos por radiação UVB (FRASHERI et al., 2020), através da indução da autofagia de células tumorais e controle da sua proliferação (SAJADIMAJD et al., 2020).

Há também um efeito protetor contra radiação UVA. SHIN et al, 2014 realizou estudos *in vitro* para investigar esse efeito em fibroblastos da pele humana, verificando-se que a EGCG alivia o dano induzido pela radiação UVA, aumentando a viabilidade dos fibroblastos em 18,3% e a ação da glutathione peroxidase (ação antioxidante) em 103,4%.

SALAHELDIN et al., 2022, preparou três formulações compreendendo nanopartículas poliméricas e nanoemulsões lipídicas de EGCG e verificou que sua aplicação na pele levou a uma redução do estresse oxidativo induzido por UVB e, conseqüentemente, dos danos causados ao DNA da pele.

1.4.2. Queimaduras

As queimaduras, principalmente as de maior extensão e maior grau, são lesões cutâneas extremamente traumáticas, debilitantes e demorada cicatrização.

Uma aplicação em queimaduras foi relatada por FATEMI et al., 2014, que avaliou o uso de um extrato alcóolico 2% de chá verde (onde a EGCG é a catequina mais abundante) em queimaduras de segundo grau provocadas em ratos, verificando-se uma maior redução na área queimada em 14 dias se comparada ao cuidado da queimadura apenas com curativo simples.

Outra aplicação foi relatada por LI et al., 2023 que dentre vários testes, avaliou a cicatrização de queimaduras de segundo grau provocadas em ratos com a aplicação de hidrogel zwitteriônico de carboxibetaína contendo EGCG e íons cobre encapsulados, comparando-se com grupo controle, somente gel e somente EGCG e íons cobre. Após 14 dias, verificou-se que as feridas onde aplicou-se somente EGCG-Cu e o hidrogel contendo EGCG-Cu apresentou redução da área da ferida em 94,6% e 94,6%, respectivamente.

1.4.3. Queloides

PARK et al., 2008 avaliou os efeitos da EGCG no crescimento e migração de fibroblastos queloides (KF) em modelos *in vitro* e verificou-se uma redução. SYED

et al., 2013 avaliou isso em modelos *ex vivo*, observando-se que a EGCG atua reduzindo a ação do PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1) nos fibroblastos, o que reduz a produção de colágeno e assim, reduz a fibrogênese excessiva.

1.4.4. Alopecia

Há relatos de uso da EGCG no tratamento da alopecia androgênica, uma vez que ela reduz a 5- α -redutase, que atua na fisiopatologia (HIIPAKKA et al., 2002).

KIM et al., 2011 avaliou os efeitos da aplicação de um tópico contendo EGCG na queda de pelos de camundongos após a aplicação de injeções de testosterona (atua nos folículos capilares por apoptose acentuando a queda), verificando-se que no grupo de ratos que receberam o tópico, a queda de cabelo atingiu 10% após 6 semanas, o que ocorreu com o grupo que não recebeu a aplicação tópica após 5 semanas, mostrando que a EGCG reduziu a queda capilar, regulando negativamente a apoptose causada pela testosterona. O estudo também avaliou o crescimento capilar após depilação da região de queda, verificando-se que no grupo de ratos que receberam o tópico contendo EGCG, houve crescimento após o 11º dia e no outro grupo (sem uso do tópico), o crescimento foi observado somente no 13º dia, mostrando que a EGCG também estimula o crescimento do pelo.

Esse estímulo no crescimento do cabelo também foi verificado por KWON et al., 2007 que avaliou a queda de cabelo não androgênica através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

1.4.5. Psoríase

A EGCG também vem sendo estudada para ser usada no tratamento da psoríase, uma vez que a inflamação está diretamente relacionada a essa doença autoimune.

ZHANG et al., 2016 avaliou a ação de EGCG em ratos que tiveram a indução de psoríase com Imiquimod (IMI), separando os mesmos em três grupos. O primeiro recebeu IMI por 6 dias, o segundo recebeu 3 dias IMI e nos outros três EGCG e o terceiro, recebeu 6 dias de IMI juntamente com EGCG. Observou-se que no primeiro grupo houve desenvolvimento de eritema, escamas finas e valores de

infiltração muito superiores aos dos grupos tratados com EGCG, sendo que o terceiro grupo foi aquele que apresentou pouco eritema, escamas finas e nenhuma infiltração, mostrando a ação anti-inflamatória da EGCG na pele.

1.4.6. Cicatrização de feridas

Há também aplicações da EGCG na cicatrização de feridas cutâneas (LI et al., 2016). Segundo XU et al., 2021, a EGCG atua em três das quatro fases de cicatrização da pele. Na hemostase, primeira etapa, a EGCG atua aumentando o efeito de hemadsorção, auxiliando no fechamento da ferida. Na etapa de inflamação, segunda etapa, ela atua através de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, facilitando o processo. Na terceira etapa, proliferação, ela tem propriedades angiogênicas e antifibróticas, facilitando o aumento do tecido sem a formação de cicatrizes. Por esse motivo, há vários exemplos da incorporação da EGCG em diversos materiais como hidrogéis, micro e nanopartículas, micro e nanofibras, filmes e microagulhas, todas com esse mesmo fim (XU et al., 2021; ZAWANI e FAUZI, 2021)

HUANG et al., 2019 mostrou uma melhora em feridas de camundongos diabéticos após aplicação tópica de EGCG, mostrando que ela auxilia até na cicatrização de feridas difíceis. PRAKOESWA et al., 2021 mostrou que a aplicação de uma pomada de EGCG a 1% acelerou o fechamento de úlceras plantares crônicas na Hanseníase ao se comparar com um produto comumente utilizado para essa finalidade que continha antibiótico.

1.4.7. Aplicações cosméticas

Em aplicações cosméticas, KIM et al., 2018 verificou que a EGCG aumenta a expressão de genes relacionados ao fator de hidratação natural da pele, mostrando que ela pode ser incorporada como ingrediente cosmético a fim de melhorar a atividade hidratante, o que incorporaria também à formulação seus efeitos antioxidantes, o que geraria ótimos resultados na prevenção do fotoenvelhecimento. CERBIN-KOCZOROWSKA et al., 2021 revisou alguns estudos que avaliaram o poder de permeação da EGCG na pele, concluindo que a EGCG teria um excelente potencial de hidratação.

1.5. EGCG e seus desafios

Apesar de todos os benefícios e possibilidades de utilizações da EGCG na pele, ainda não há uma ampla aplicação em formulações semissólidas dermatológicas e cosméticas (FRASHERI et al., 2020). Isso porque há algumas dificuldades e desafios no seu uso em formulações semissólidas para aplicações tópicas.

A EGCG possui uma alta sensibilidade à luz e reatividade, sofrendo facilmente oxidação, hidrólise, epimerização e polimerização (SCALIA et al., 2013; KAYAL et al., 2019), além de ser extremamente sensível a altas temperaturas e pH (FRASHERI et al., 2020).

KAYAL et al., 2019 avaliou a estabilidade da EGCG em uma solução aquosa e observou uma degradação de 16,4% após 24h de exposição à luz do dia. SCALIA et al., 2014 avaliou a fotodegradação de géis e cremes contendo 1% de EGCG após 1h de exposição, observando-se uma degradação de 48-72% da EGCG nos cremes e 9-41% nos géis, mostrando sua fotosensibilidade.

Segundo CHEN et al., 2001, em bebidas de chá verde com pH acima de 4,5, o teor das catequinas tende a cair pela metade após 3 meses em temperatura ambiente. LAMBERT et al., 2006 avaliou a estabilidade da EGCG em géis transdérmicos em diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C), observando uma maior estabilidade da molécula na menor temperatura e um tempo de meia-vida de 20,2 h e 47,1 h para 37 e 25 °C, respectivamente.

Outra dificuldade é seu alto tamanho molecular e sua alta solubilidade em água, o que dificulta sua penetração na pele, dependendo do objetivo terapêutico desejado. DAL'BELO, 2008 estudou a permeação de EGCG e Ginkgo biloba em formulações cosméticas na pele humana em um período de 24 h e verificou que a EGCG penetra na pele se concentrando majoritariamente no estrato córneo (21,45% da dose aplicada), mas também chega à epiderme viável (13,48% da dose aplicada) e derme (9,19% da dose aplicada). ALVES, 2013 avaliou a permeação de EGCG presente em emulsões por um período de 12 h, verificando-se que nesse caso a EGCG foi encontrada somente no estrato córneo. SCALIA et al., 2014 avaliou a permeação de um gel e um creme contendo EGCG em pele humana. Observou-se que 36,1 e 35,5% das doses aplicadas permearam o estrato córneo das preparações de emulsão e gel, respectivamente, sendo a diferença estatisticamente não significativa. O gel produziu uma concentração de EGCG significativamente maior (p

< 0,05) na porção superficial da pele em comparação com o creme, sendo que esse último produziu um aumento nos níveis de EGCG nas camadas mais internas.

1.6. Caracterizações de Formulações Semissólidas

No processo de desenvolvimento, obtenção de registro e no controle de qualidade de formulações semissólidas são necessários testes físico-químicos a fim de caracterizá-las.

Em 2019, a fim de orientar e promover uma padronização na caracterização e avaliação da qualidade e desempenho *in vitro* de formulações semissólidas, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou o Guia nº 20/2019, o qual foi revisto em 2021, que descreve os testes físico-químicos a serem realizados nos produtos para obtenção do registro de medicamentos tópicos e transdérmicos junto ao órgão (BRASIL, 2021). No caso de formulações cosméticas, a Anvisa também disponibiliza um Guia de Controle de Qualidade com orientações sobre ensaios físicos e químicos (BRASIL, 2008).

Em ambos os guias são descritos testes físico-químicos que incluem aspecto (cor e odor), pH, densidade e teor do princípio ativo, sendo que no Guia nº 20/2019 também são descritos estudos de liberação e estabilidade das formulações (BRASIL, 2008; BRASIL, 2021).

1.6.1. Validação Analítica

Para avaliação do teor do princípio ativo são usadas técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar o mesmo, como a Espectroscopia UV/visível, Cromatografia Líquida e Eletroforese Capilar. Para isso é necessário a validação do método analítico utilizado, processo de avaliação através de ensaios experimentais que visam gerar evidências que o mesmo é adequado ao objetivo pretendido de uso (BRASIL, 2017), garantindo assim sua confiabilidade e promovendo a geração de dados fidedignos sobre as amostras analisadas, e conseqüentemente, interpretações adequadas sobre elas (RAO, 2018; RIBANI et al., 2004).

A Anvisa apresenta orientações para validação de métodos analíticos através da Resolução RDC nº 166 de 2017, apresentando informações sobre as figuras de méritos (parâmetros) que devem ser consideradas na validação de acordo

com o objetivo. No presente trabalho fez-se uso dessa resolução com objetivo de avaliar o teor de EGCG em formulações semissólidas, logo, torna-se necessário a avaliação da Linearidade, Intervalo, Seletividade, Precisão e Exatidão (BRASIL, 2017).

Linearidade

A Linearidade corresponde a relação diretamente proporcional e linear entre a concentração do analito e a resposta obtida no método (FERREIRA et al., 2008). Ela é avaliada através da construção de uma curva analítica, devendo ser demonstrada em toda a faixa de trabalho escolhida (BRASIL, 2017).

Os resíduos da curva analítica devem ser avaliados quanto a sua normalidade, independência e variação, além da presença de pontos anômalos, uma vez que isso permite a detecção de possíveis problemas no ajuste da curva (FERREIRA et al., 2008). Para isso pode-se usar de ferramentas gráficas e testes estatísticos adequados.

Intervalo

O Intervalo corresponde a faixa de trabalho ou faixa de concentração a ser avaliada, sendo que a mesma depende do objetivo da validação. No caso de teor é necessário que ela seja de 80%-120% da concentração do analito (BRASIL, 2017). No presente trabalho avaliou-se o teor das formulações logo após o preparo e após teste de Estabilidade Acelerada, logo, usou-se uma faixa de 10%-120%.

Seletividade

A Seletividade corresponde a capacidade do mesmo em identificar e quantificar de forma inequívoca o analito de interesse mesmo na presença de outros componentes como impurezas, diluentes e componentes da amostra (BRASIL, 2017).

A mesma pode ser observada através da:

- Análise dos solventes empregados;
- Análise do placebo;
- Análise de padrões de impurezas do analito;

- Análise de amostras após o estudo de estabilidade (stress test);
- Avaliação da pureza de pico.

No caso da cromatografia, como resultado, os componentes não podem apresentar sinal no mesmo tempo de retenção que aquele utilizado para quantificar o analito.

Precisão

A Precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. Pode ser avaliada em três níveis:

- Repetibilidade: avalia as medidas em um curto período com o mesmo analista e mesma instrumentação;
- Precisão intermediária: avalia os resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;
- Reprodutibilidade: avalia os resultados obtidos por diferentes laboratórios, usando a mesma metodologia.

Em ambos os níveis a precisão é expressa pelo coeficiente de variação (CV) das replicatas obtidas, dado pela Equação (1):

$$CV (\%) = RSD (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \quad (1)$$

Para isso, pode-se realizar nove determinações ao longo do intervalo do método, sendo três delas em concentrações baixas, três em concentrações médias e três em concentrações altas, todas em triplicata, ou seis determinações usando-se o ponto central (100%) da curva. Nas duas situações, as amostras devem ser preparadas de maneira independente (BRASIL, 2017).

Exatidão

A Exatidão avalia a diferença entre o valor obtido para o analito através do método analítico escolhido e o valor de referência (tomado como verdadeiro). Ela pode ser avaliada através da:

- Análise de um padrão (substância com pureza conhecida);
- Comparação dos resultados com outro método já estabelecido para aquele analito;
- Ensaio de adição e recuperação do analito no placebo.

Para isso deve-se realizar nove determinações em diferentes níveis ao longo do intervalo do método, contemplando uma concentração baixa, média e alta em triplicata, sendo que as amostras também devem ser preparadas de maneira independente (BRASIL, 2017). No caso de recuperação a mesma pode ser calculada através da Equação (2):

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{concentração obtida pela curva}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Robustez

A robustez corresponde a capacidade do método de resistir a pequenas variações nos parâmetros analíticos, os quais incluem variação no pH, composição e fluxo da fase móvel, diferentes colunas e temperatura. No caso de métodos qualitativos, deve-se verificar se essas variações impactam a resposta analítica e no caso de métodos quantitativos, deve se avaliar os impactos da mesma forma que se avalia a exatidão (BRASIL, 2017).

1.6.2. Liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* do princípio ativo a partir de formulações semissólidas é uma maneira de estimar a liberação e prever a absorção cutânea do mesmo, podendo ser usado para comparar formulações, estabelecer uniformidade e

como controle de qualidade (ALVES, 2013; RAGHAVAN et al., 2019). Nesse caso usou-se os estudos de liberação *in vitro* para comparar as diferentes formulações quanto à liberação de EGCG para o meio.

Para esses estudos são utilizados equipamentos de célula de difusão, sendo que o mais utilizado são as células de difusão do tipo Franz, desenvolvido em 1975 por Thomas Franz. Nelas há um compartimento doador (onde se adiciona a formulação a ser estudada) e outro receptor (onde há uma solução receptora), separados por uma membrana que simula a pele. O sistema é todo mantido a uma temperatura similar à da pele, podendo ser obtidas alíquotas do meio receptor para avaliação de parâmetros pertinentes (RAGHAVAN et al., 2019). Um esquema de uma célula de difusão do tipo Franz está descrito na **Figura 7**. No presente trabalho fez-se uso da liberação *in vitro* para avaliar a liberação de EGCG nas diferentes formulações semissólidas.

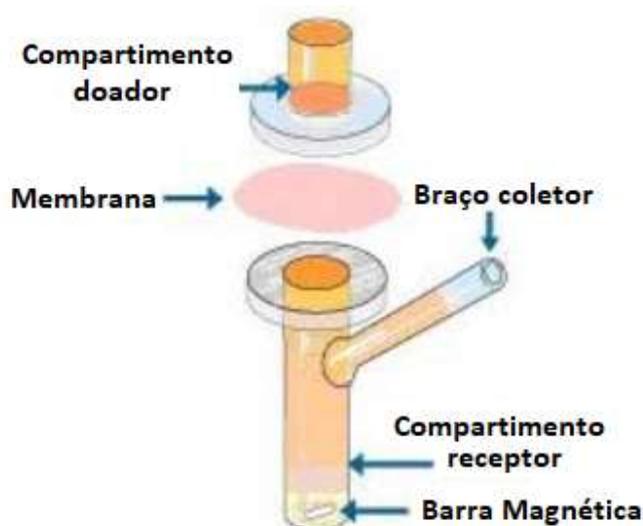


Figura 7: Esquema de uma célula de difusão do tipo Franz (Adaptado de DAL'BELO, 2008).

1.6.3. Estabilidade

A estabilidade é definida como tempo pelo qual um princípio ativo ou formulação mantém as mesmas condições e características que possuía no momento da fabricação durante sua estocagem e uso ou não varia mais que 10% de sua potência inicial, desde que os produtos de alteração sejam seguros e tenham efeitos conhecidos (DIAS, 2014). Assim, os estudos de estabilidade são necessários para

assegurar a qualidade e, conseqüentemente, a segurança e eficácia das formulações (FACCI et al., 2020).

A Anvisa apresenta na Resolução RDC nº 318 de 2019 os critérios para a realização de estudos de estabilidade de princípio ativos e medicamentos, exceto biológicos, descrevendo os diferentes estudos de estabilidade que podem ser realizados. No caso de um estudo de Estabilidade Acelerada são utilizadas condições forçadas de armazenamento a fim de acelerar a degradação do princípio ativo e/ou formulação e, assim, avaliar o impacto de exposições a condições de armazenamento fora do estabelecido (BRASIL, 2019). Nesse estudo escolheu-se fazer uso do teste de Estabilidade Acelerada a fim de avaliar a estabilidade da EGCG nas diferentes formulações semissólidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver diferentes formulações semissólidas contendo EGCG e caracterizá-las de acordo com suas propriedades físico-químicas, liberação *in vitro* e principalmente estabilidade visando aplicação tópica com ação cicatrizante e antioxidante.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar diferentes formulações semissólidas contendo EGCG a fim de obter preparações tecnicamente viáveis sob o ponto de vista de qualidade e estabilidade para produção em escala;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas gerais e específicas das formulações semissólidas como densidade, pH, aspecto e teor de EGCG, sendo que para esse último, utilizando um método validado de acordo com a RDC 166/2017 da Anvisa;
- Observar o comportamento da EGCG nas diferentes formulações semissólidas, avaliando para isso a morfologia, o perfil de liberação *in vitro* e estabilidade de acordo com a RDC 318/2019 da Anvisa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

Para o preparo das formulações semissólidas usou-se Dispersador Ultra Turrax (IKA, T25) e chapa de aquecimento (Fisatom, 503).

As análises de CLAE foram realizadas em cromatógrafo Waters 2996, com injetor automático modelo 717 plus, detector DAD modelo 996 com varredura de 200 a 400 nm e o programa Empower 3 PRO para aquisição de dados. Utilizou-se a coluna cromatográfica Phenomenex Luna, C18 (150 mm X 4,6 mm), partículas de 5 µm.

Na extração da EGCG das formulações semissólidas para a quantificação por meio da análise cromatográfica usou-se balança analítica (Ohaus, PA214CP), agitador vórtex (Phoenix, AP-56), banho de ultrassom (Eco-Sonics, Q3.0/40) e centrífuga (Fanem, 206). Para o preparo da curva analítica usou-se balança microanalítica (Marte, AUW220D).

Para a aferição do pH usou-se pHmetro digital de bancada (Kasvi, K39-2014B). Para densidade usou-se banho termostático (Logen, LS4BD2-220) e balança analítica (Ohaus, PA214CP).

Para avaliação do perfil de liberação *in vitro*, usou-se Sistema de Células de difusão do tipo Franz (PermeGear, V6-CA) com banho ultratermostático acoplado (Quimis, Q214M2).

Para avaliação da morfologia, usou-se Microscópio Ótico (Leica, DMLM) e para avaliação da estabilidade, usou-se Câmara Climática (Ethik, 420-CLDTS).

3.2. Reagentes

Para preparo das formulações semissólidas usou-se EGCG ≥90%, Florien Fitoativos, Lote: 20F16-B019-063714, gelificantes Lecigel® (Biotec Dermocosmeticos) e Aristoflex® AVC (Pharmaspecial), emulsionantes Olivem 1000® (Biovital) e Emulium Delta® (Brasquim), umectante Glicerina (Biovital), Óleo de Rosa Mosqueta (Biovital), conservante Optiphen® (Jovii Cosmeceutica), antioxidante Acetato de tocoferol líquido (Infinity Farma) e sequestrante de metais EDTA dissódio (Fagron). A base para pomada foi adquirida manipulada pela farmácia MagisPharma.

Para análise cromatográfica, incluindo fase móvel, diluições e solução de extração usou-se Metanol (Merck, Lichrosolv[®]), Ácido Acético Glacial (Synth[®]), Hexano (Mallinckrodt[®]) e água ultrapurificada (Merck Millipore, Direct-Q[®]3 UV).

Para construção da curva analítica foi utilizado o Padrão farmacêutico secundário de EGCG, Supelco[®], Lote: LRAC4432 com pureza de 92,4% conforme Certificado presente no **Anexo I**.

Para avaliação do perfil de liberação *in vitro* usou-se membranas Millipore[®] tipo HVLP com tamanho de poro de 0,45 µm e os sais cloreto de sódio (NaCl) (Vetec), cloreto de cálcio (CaCl₂) (Synth), Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O) (Synth) e Dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) (Synth) para preparo de suor artificial, usado como meio receptor.

Para avaliação da morfologia da EGCG ≥90%, usou-se óleo mineral (Biolog) para dispersão da EGCG.

3.3. Preparo das formulações

Com o intuito de obter formulações semissólidas com diferentes propriedades e assim, diferentes aplicações, escolheu-se preparar géis, cremes e pomada, totalizando 5 formulações com 1% (m/m) de EGCG ≥90%, sendo 2 géis, 2 cremes e 1 pomada. As formulações de géis e cremes foram preparadas no ICosmetologia Educacional, Instituto especializado no mercado Cosmético, Nutracêutico e Farmacêutico situado em Campinas-SP, sendo que os componentes e suas proporções em cada formulação estão descritos na **Tabela 1**.

3.4. Caracterização das formulações

As caracterizações de propriedades gerais foram feitas de acordo com o Guia nº 20/2019 da ANVISA, que descreve os testes físico-químicos a serem realizados nos produtos para obtenção do registro de medicamentos tópicos e transdérmicos junto ao órgão (BRASIL, 2021). Avaliou-se o aspecto (cor e odor), densidade e pH das formulações logo após o preparo (tempo zero) e após os períodos estabelecidos para o teste de estabilidade.

Tabela 1: Descrição e proporção (%) dos componentes das formulações semissólidas

Matéria Prima	Gel 01	Gel 02	Creme 01	Creme 02	Pomada
Água purificada	92,05	92,05	81,05	81,05	-
EDTA dissódico	0,10	0,10	0,10	0,10	-
Lecigel®	1,50	-	-	-	-
Glicerina	5,00	5,00	5,00	5,00	-
Optiphen®	0,85	0,85	0,85	0,85	-
Acetato de tocoferol	1,00	1,00	1,00	1,00	-
EGCG ≥90%	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Aristoflex AVC®	-	1,00	1,00	1,00	-
Olivem 1000®	-	-	5,00	-	-
Óleo de Rosa Mosqueta	-	-	5,00	5,00	-
Emulium Delta®	-	-	-	5,00	-
Petrolato	-	-	-	-	69,3
Lanolina	-	-	-	-	29,7

(-): Não presente

Para aspecto (cor e odor), fez-se uso de comparações entre eles para verificar se houve modificações ao longo do teste de estabilidade. Para densidade usou-se picnômetros de vidro de 5 mL, previamente calibrados à 25 °C para determinação de seu volume (V). Assim, adicionou-se a formulação no mesmo com auxílio de uma seringa, até que ele transbordasse pela tampa. Após limpeza registrou-se a massa (m) e calculou-se a densidade (g.mL⁻¹) através da Equação (3). Realizou-se o procedimento em triplicata.

$$d = \frac{(m_{\text{picnômetro cheio}} - m_{\text{picnômetro vazio}})}{V_{\text{picnômetro}}} \quad (3)$$

Para pH das formulações aquosas, realizou-se a leitura com imersão do eletrodo diretamente nas mesmas, sendo realizado em triplicata. Para a formulação em pomada, por considerar a presença apenas de fase oleosa, insolúvel em água, não foi possível medir o pH.

3.5. Verificação do teor de EGCG e validação do método CLAE

3.5.1. Método de extração da EGCG das formulações

Para extração da EGCG, pesou-se de 1,1 g a 1,3 g das formulações em tubo cônico de 15 mL. Para a pomada, adicionou-se previamente 2 mL de hexano para solubilização da fase oleosa. Adicionou-se 10 mL de fase extratora (1% de Ácido Acético:Metanol 30:70), levou-se ao vórtex por 5 minutos, sonicou-se por 10 minutos e centrifugou-se por 5 minutos a 3190 rpm (796 rcf). Coletou-se 1 mL e diluiu-se em balão volumétrico de 10 mL com fase móvel. Filtrou-se as soluções obtidas em membrana de 0,45 µm PVDF e colocou-se no vial.

3.5.2. Método cromatográfico

Como método cromatográfico usou-se fase móvel de 1% de Ácido Acético:Metanol (75:25), volume de injeção de 20 µL, vazão de 0,80 mL.min⁻¹, detector DAD fixado em 280 nm, varredura de 200 nm a 400 nm e temperatura do forno da coluna de 30 °C.

O método cromatográfico foi avaliado quanto à linearidade, seletividade, exatidão, precisão (repetibilidade) e robustez conforme os critérios estabelecidos pela ANVISA na RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Para avaliação estatística usou-se os Softwares Microsoft Excel®, Past e o Design Expert® para construção das superfícies usadas para avaliar robustez.

- **Linearidade e Intervalo**

A linearidade foi avaliada no intervalo de 0,01 - 0,12 mg.mL⁻¹ (10 - 120%) em 9 pontos. Para isso, em triplicata, pesou-se a quantidade necessária do Padrão, diluiu-se em balão volumétrico de 10 mL com fase móvel para obtenção de solução estoque e com micropipetas diluiu-se a mesma a fim de obter as concentrações desejadas. A partir da curva analítica, avaliou-se a normalidade, independência e variação dos resíduos e a presença de pontos anômalos.

- **Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada realizando-se o processo de extração com os brancos de cada uma das formulações semissólidas (sem a EGCG $\geq 90\%$) a fim de avaliar se havia algum outro componente que tinha mesmo tempo de retenção da EGCG.

- **Precisão**

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade, no qual realizou-se seis determinações da concentração central ($0,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ - 100%) da curva analítica usando-se para isso a formulação Creme 02. Os seis preparos foram feitos de maneira independente e de acordo com a extração descrita anteriormente. Para avaliação deste parâmetro foi calculado o CV, conforme Equação (1).

- **Exatidão**

Para avaliar a exatidão do método, realizou-se três determinações em três níveis diferentes da curva ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$). Para isso, preparou-se uma solução com Padrão de EGCG com concentração de 100 mg.mL^{-1} e uma solução do branco da formulação Creme 02 (pesou-se em torno de 12 g do branco e diluiu-se com 50 mL de solução extratora). Em tubos cônicos de 15 mL, colocou-se 5 mL da solução do branco e adicionou-se volumes do Padrão a fim de se obter as concentrações de cada nível. Completou-se com fase extratora até completar 10 mL. Realizou-se a extração conforme descrito anteriormente. Para avaliação desse parâmetro, foram calculadas a Recuperação da EGCG (%) em cada nível, conforme Equação (2).

- **Robustez**

Para avaliação da Robustez, fez-se inicialmente um planejamento fatorial de face centrada com $\alpha = 1$, sendo escolhido como fatores o % de Ácido Acético 1% na fase móvel, a vazão da fase móvel e a temperatura do forno da coluna em dois níveis como pode ser visto na **Tabela 2**.

Tabela 2: Parâmetros modificados para avaliação da robustez

Parâmetro	Varição 1 (-1, -α)	Método padrão	Varição 2 (+1, +α)
Ácido Acético 1% (%)	73	75	77
Vazão da Fase Móvel (mL.min ⁻¹)	0,7	0,8	0,9
Temperatura da Coluna (°C)	28	30	32

Obteve-se quatro coletas do ponto central, correspondente ao método padrão. Foi avaliado como resposta o tempo de retenção e a área do pico para o Padrão de 0,10 mg.mL⁻¹ (100%) e a formulação Creme 02. Para avaliação desse parâmetro, calculou-se os efeitos e interações e verificou-se sua significância a 95% de confiança.

Posteriormente avaliou-se as mesmas variações do planejamento fatorial na relação do sinal amostra/Padrão avaliando-se a Recuperação (%).

3.6. Avaliação morfológica

Para avaliar a morfologia das formulações semissólidas, utilizou-se o microscópio ótico do Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), laboratório multiusuário atuante na prestação de serviços analíticos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Para isso, espalhou-se uma fina camada da formulação em lâmina de vidro e cobriu-se com lamínula. Para avaliação das EGCG $\geq 90\%$, fez-se uma dispersão prévia em óleo mineral, pingando-se algumas gotas em lâmina e se cobrindo com lamínula. Levou-se ao microscópio ótico, obtendo-se imagens com ampliação de 200x, em luz transmitida, com e sem polarização da luz.

3.7. Liberação *in vitro*

As avaliações de liberação *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica e Cuidado em Saúde (LaFateCS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp.

Para avaliar o perfil de liberação, usou-se a uma solução de EGCG $\geq 90\%$ com concentração de 1% (m/m) preparada no dia do ensaio, as formulações Gel 02,

Creme 02 e Pomada, todas referentes ao tempo zero. Usou-se como meio receptor suor humano artificial, o qual foi preparado conforme detalhado na **Tabela 3**. As membranas foram cortadas em um diâmetro de 1 cm e deixadas imersas no meio por 30 minutos para saturação. Montou-se o sistema, preenchendo a câmara receptora com 5 mL de meio receptor, colocando-se a membrana e espalhando-se de forma homogênea no compartimento doador 1,0 g da formulação a ser avaliada e 1 mL da solução EGCG $\geq 90\%$. Todo o sistema foi mantido a 32 °C.

Tabela 3: Composição suor humano artificial (ALVES, 2013).

Componente	Concentração (mM)
NaCl	49,96
CaCl ₂	0,15
MgSO ₄	1,00
KH ₂ PO ₄	7,50

Foram retiradas alíquotas de 0,3 mL com 0,5; 1; 2; 4; 6 e 24 horas, sendo repostas o mesmo volume com a mesma temperatura. As alíquotas foram avaliadas por CLAE usando-se o mesmo método descrito anteriormente. Realizou-se em triplicata.

3.8. Estabilidade das formulações

Para avaliar a estabilidade das formulações (BRASIL, 2019a), separou-se em bisnagas de alumínio em torno de 50 g de cada uma delas, e mantiveram-se em câmara climática a 40 °C e 75% de umidade (pertencente ao Laboratório de Farmacotécnica e Cuidado em Saúde (LaFateCS)), realizando caracterizações com 1 mês (avaliou-se somente o aspecto e teor de EGCG), 3 e 6 meses.

4. RESULTADOS

4.1. Preparo e caracterização das formulações

Os géis, cremes e pomada obtidos podem ser observados no *Apêndice A*, **Figura 31(a)**. Os resultados obtidos para a densidade e pH de cada uma das formulações no tempo zero estão descritos nas **Tabela 10** e **Tabela 11**, respectivamente. Na **Tabela 13** e na **Tabela 14**, no *Apêndice B*, estão descritos os desvios padrões e coeficientes de variação obtidos para cada um deles.

4.2. Validação do método CLAE para verificação do teor de EGCG

4.2.1. Linearidade

A curva analítica do tipo $y = a + bx$ obtida através do Padrão está descrita na **Figura 8**, sendo $r = 0,9995$ e $r^2 = 0,9991$. Com 95% de confiança, verificou-se que a e b são significativos, sendo eles:

- $a: -30.880,33 \pm 28.690,63$
- $b: 30.949.151,60 \pm 340.332,56$

A Resolução RDC nº 166 de 2017 da Anvisa preconiza que os resíduos sejam avaliados quanto a sua Normalidade, Independência, Variação e a Presença de pontos anômalos. Dessa forma, a fim de verificar a normalidade dos resíduos, avaliou-se os mesmos graficamente (**Figura 9**) e através da aplicação do Teste de Shapiro-Wilk, obtendo-se $p > 0,05$.

A fim de verificar a independência dos resíduos, plotou-se os mesmos em ordem cronológica de execução das injeções, cujo gráfico está descrito na **Figura 10**.

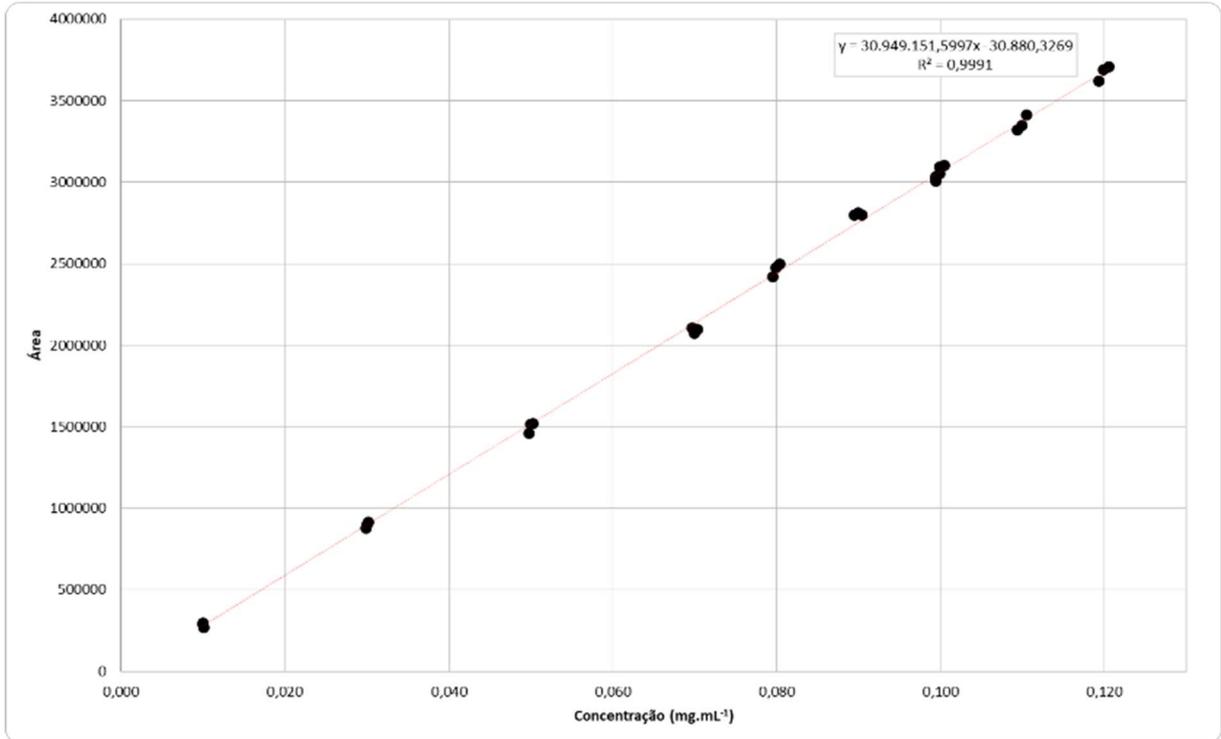


Figura 8: Curva Analítica para a EGCG.

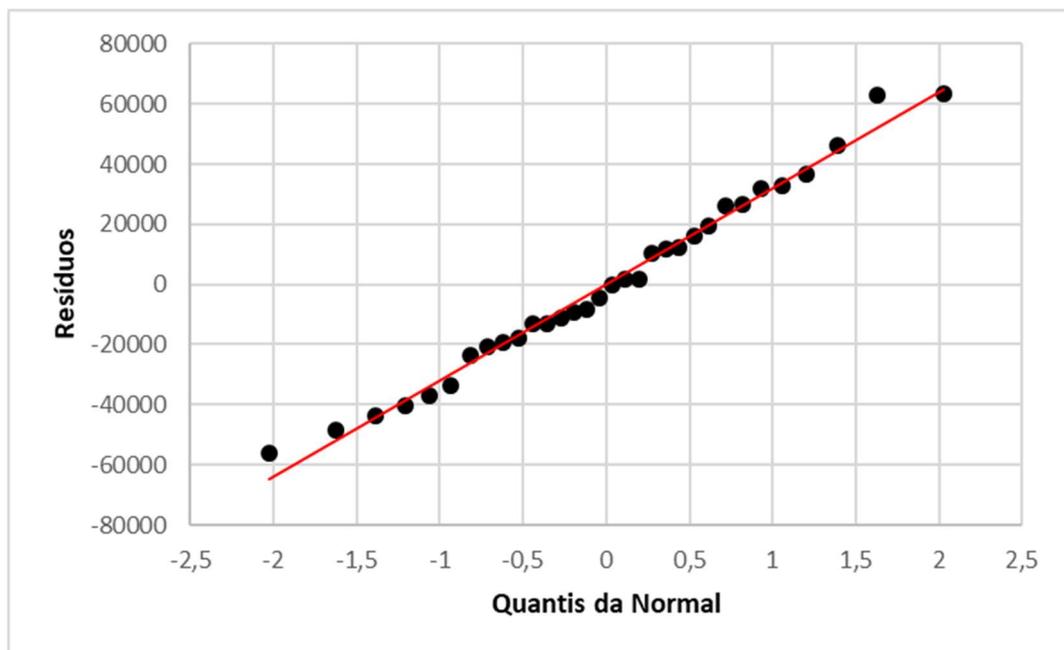


Figura 9: Gráfico para avaliação da Normalidade dos resíduos.

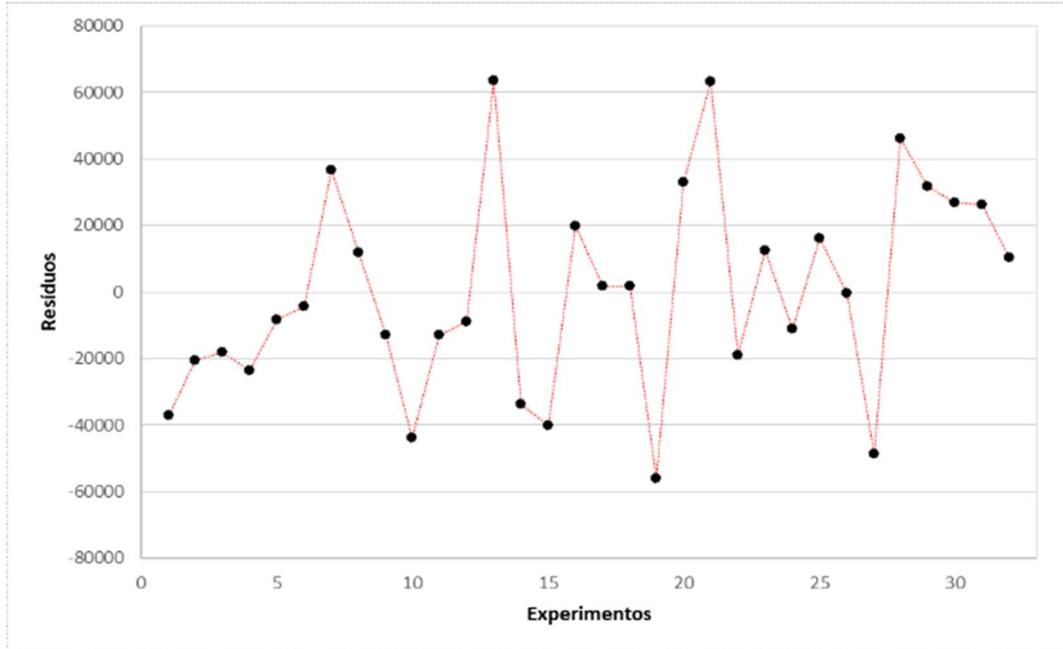


Figura 10: Gráfico para avaliação da Independência dos resíduos.

A fim de verificar a variação dos resíduos, avaliou-se graficamente plotando-se os resíduos obtidos em cada concentração da curva, obtendo-se o gráfico presente na **Figura 11** e através do Teste Breusch-Pagan, no qual obteve-se $p > 0,05$.

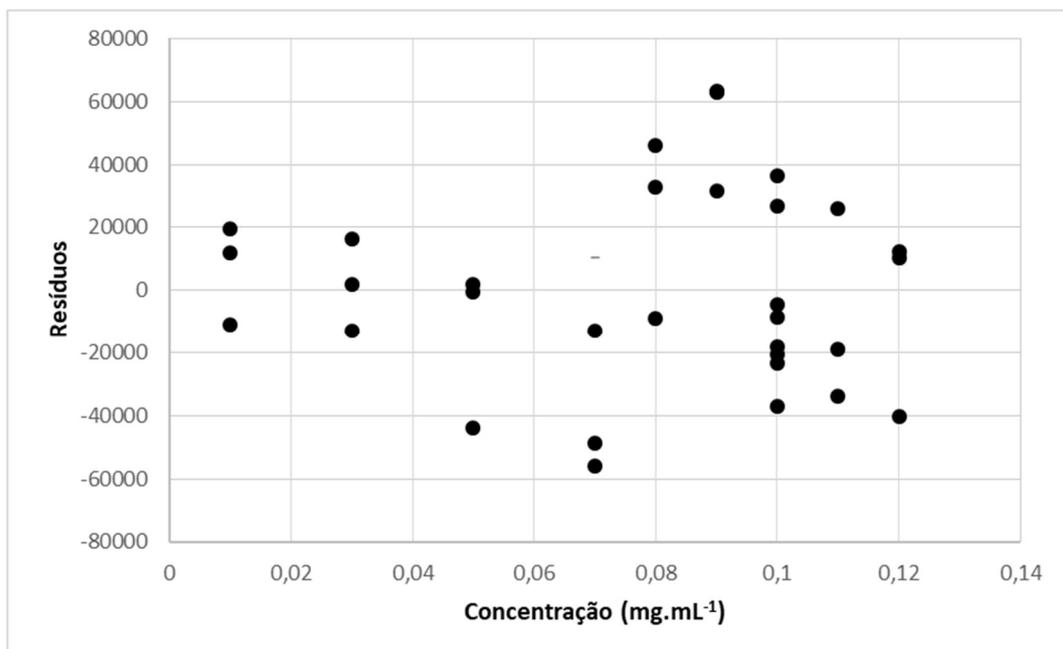


Figura 11: Gráfico para avaliação da variação dos resíduos.

Para avaliação de pontos anômalos, usou-se agora os resíduos padronizados, cujo gráfico obtido está descrito na **Figura 12**.

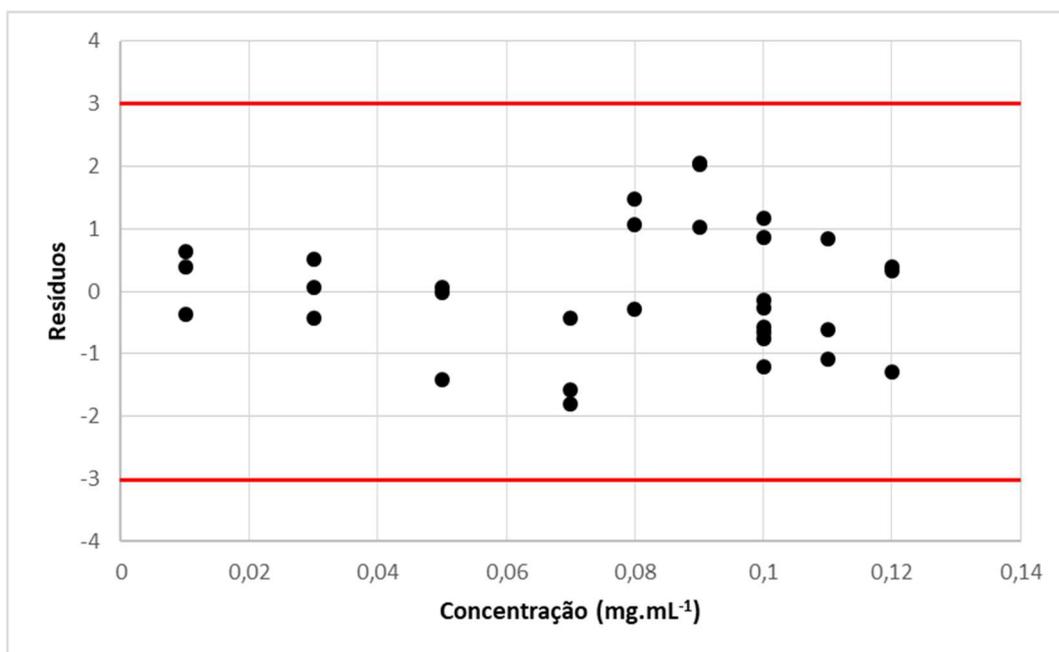


Figura 12: Gráfico para avaliação dos resíduos padronizados.

4.2.2. Seletividade

A fim de avaliar a seletividade, obteve-se o cromatograma do Padrão com 0,10 mg.mL⁻¹ (100%) o qual pode ser visualizado na **Figura 13** e os cromatogramas dos brancos (placebos) de cada formulação, obtidos em triplicata, os quais podem ser visualizados na **Figura 14** a **Figura 16**.

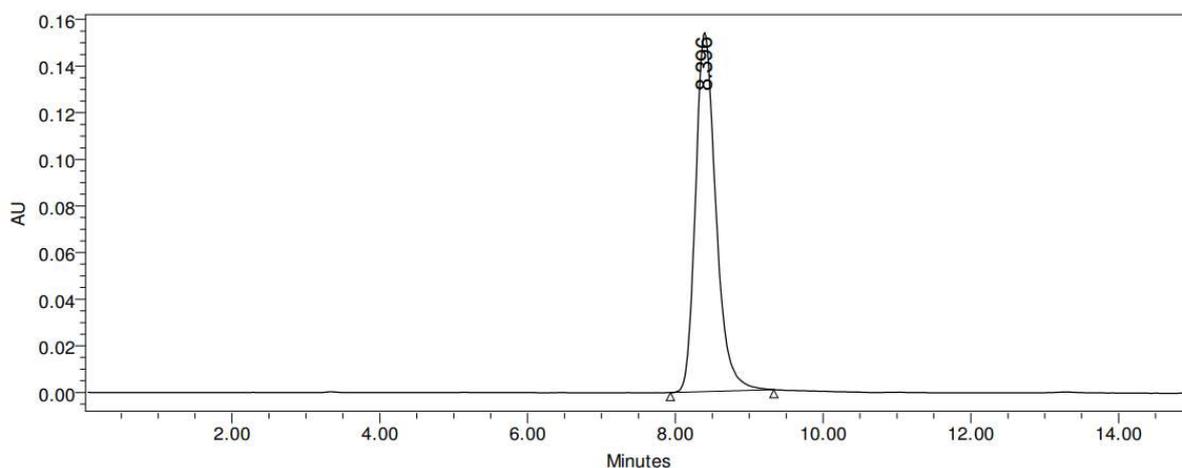


Figura 13: Cromatograma do Padrão de EGCG com 0,10 mg.mL⁻¹.

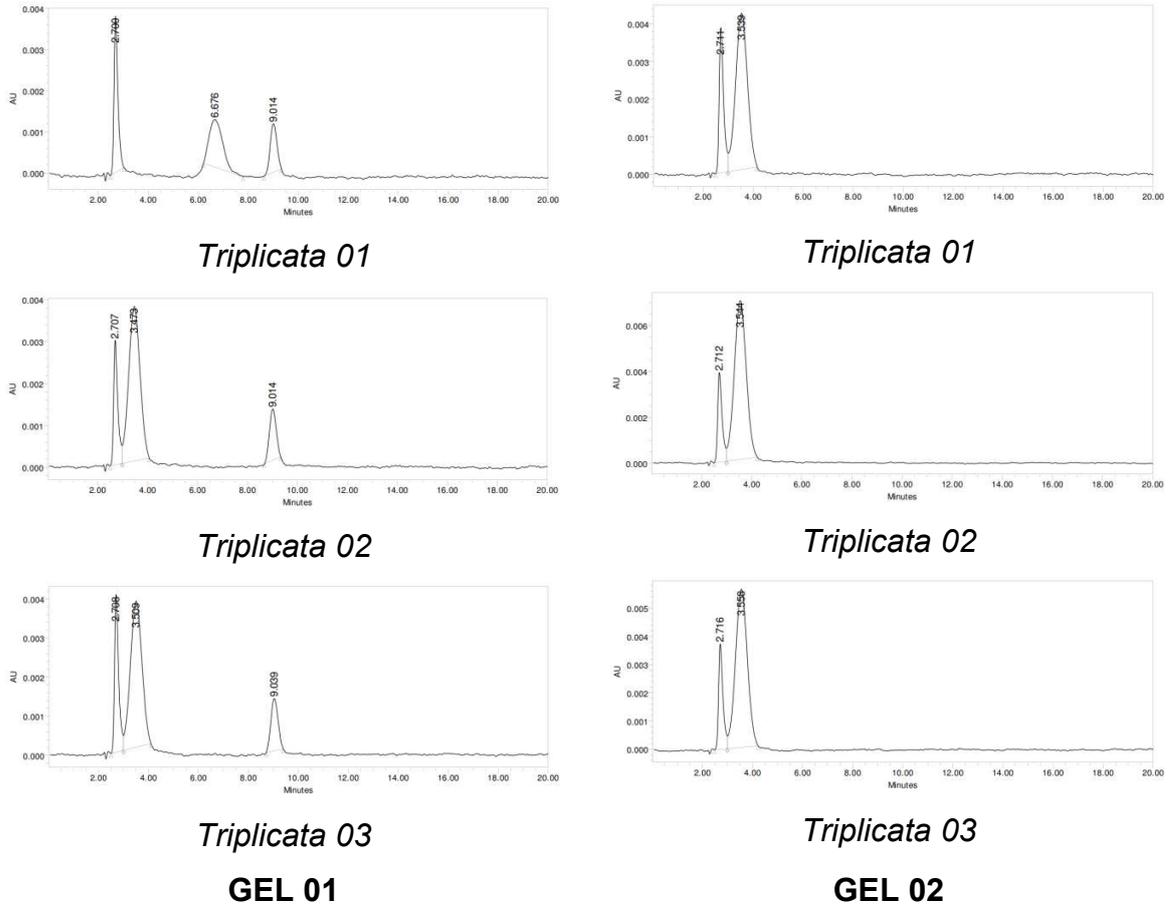


Figura 14: Cromatogramas obtidos em triplicata dos brancos (placebos) das formulações de Géis.

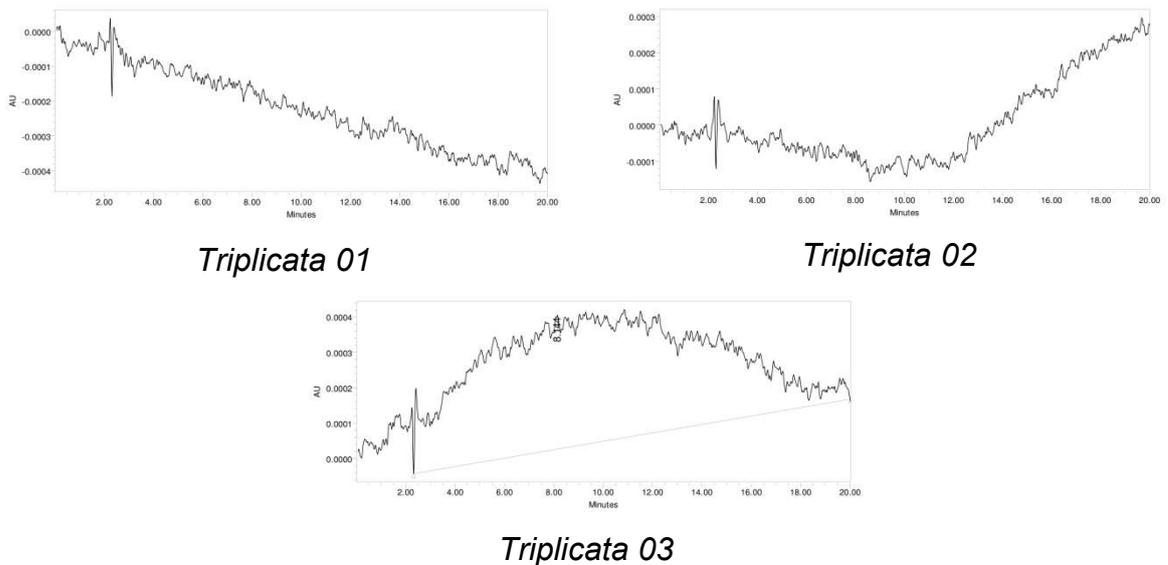


Figura 15: Cromatogramas obtidos em triplicata dos brancos (placebos) da formulação Pomada.

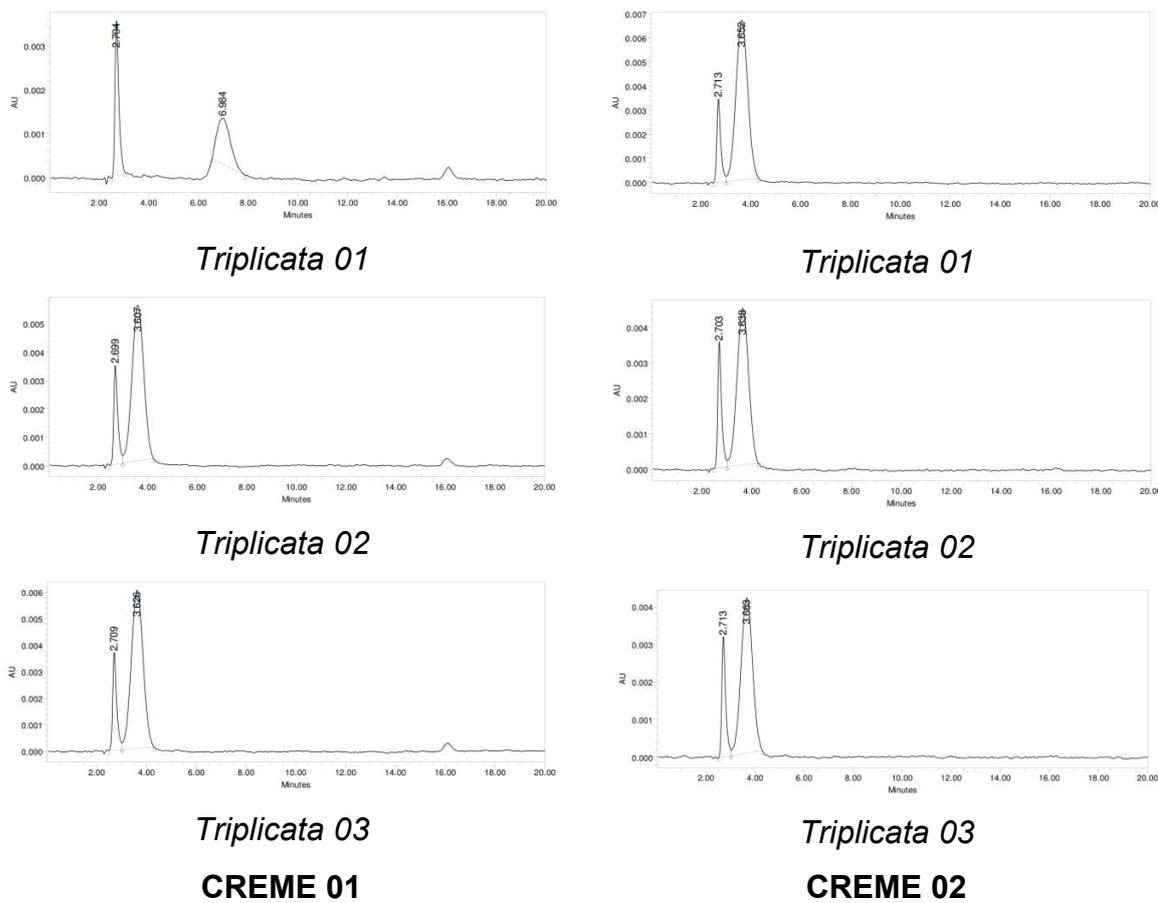


Figura 16: Cromatogramas obtidos em triplicata dos brancos (placebos) das formulações de Cremes.

Para avaliar a pureza do pico correspondente a EGCG na formulação Gel 01 e compará-la com a obtida para o Padrão, obteve-se o ângulo e limiar de pureza através do software do equipamento, cujo resultado está descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4: Pureza de pico obtida para o Padrão e Gel 01 calculada pelo software.

Item	Ângulo de pureza	Limiar de pureza
Padrão 0,10 mg.mL ⁻¹	0,119	0,252
Gel 01	0,141	0,258

Quando o ângulo de pureza > que o limiar de pureza, uma impureza detectável está presente dentro do pico.

4.2.3. Precisão

Os resultados obtidos para avaliar a precisão (repetibilidade) encontram-se descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5: Valores obtidos para a precisão (repetibilidade), n = 6.

Formulação	% (m/m) Médio (%)	DP (%)	CV (%)
Creme 02	0,860	0,013	1,559

4.2.4. Exatidão

Os resultados obtidos para avaliar a exatidão encontram-se descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6: Valores obtidos para a exatidão (n = 3).

Concentração esperada (mg.mL ⁻¹)	Concentração média encontrada (mg.mL ⁻¹)	Média % Recuperação	CV (%)
0,0103	0,0101	99,912	5,049
0,1001	0,1007	100,679	4,078
0,1214	0,1208	99,573	3,708

4.2.5. Robustez

Processando-se os dados obtidos com o planejamento fatorial, obteve-se um modelo quadrático como melhor ajuste para o tempo de retenção, sendo que na **Figura 17** e **Figura 18** são apresentadas as curvas/superfície de resposta obtidas para o Padrão e Creme 02, respectivamente.

Para a área obteve-se um modelo linear como melhor ajuste, tanto para o Padrão como para o Creme 02, sendo que na **Figura 19** e **Figura 20** são apresentadas as curvas obtidas para o Padrão e Creme 02, respectivamente.

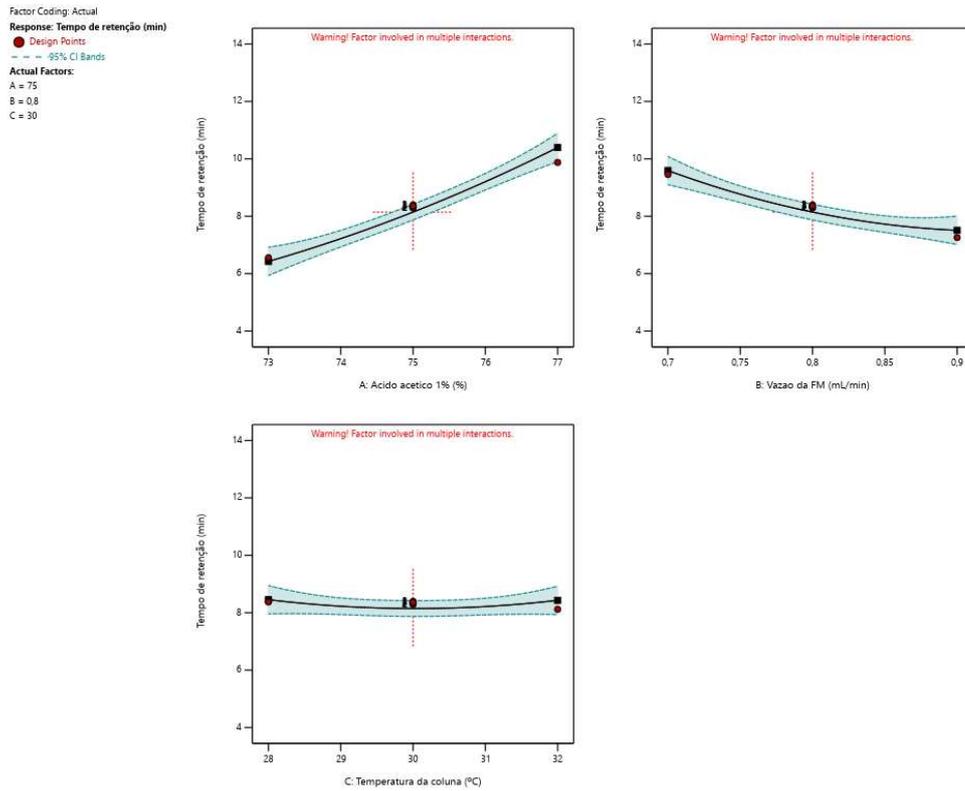


Figura 17: Fatores avaliados na robustez para tempo de retenção no Padrão 0,10 mg.mL⁻¹.

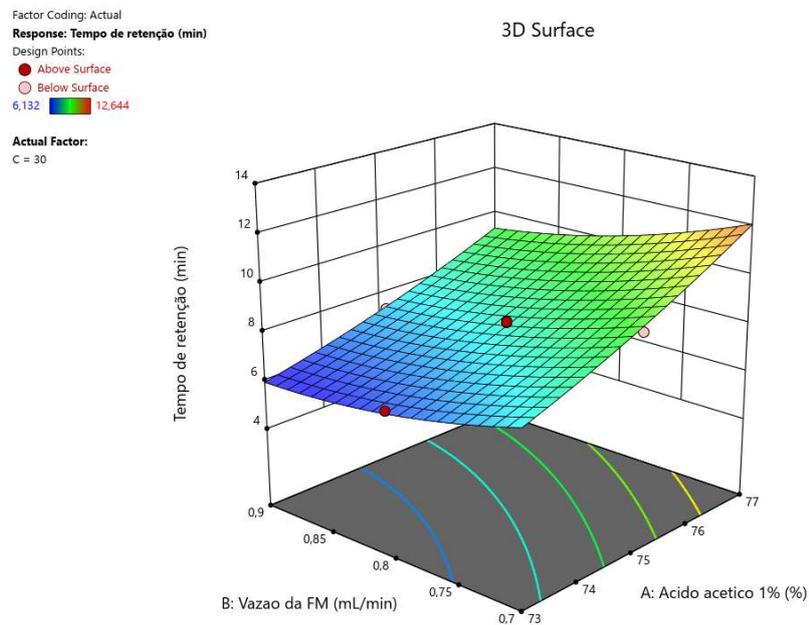


Figura 18: Superfície de resposta para o tempo de retenção no Creme 02.

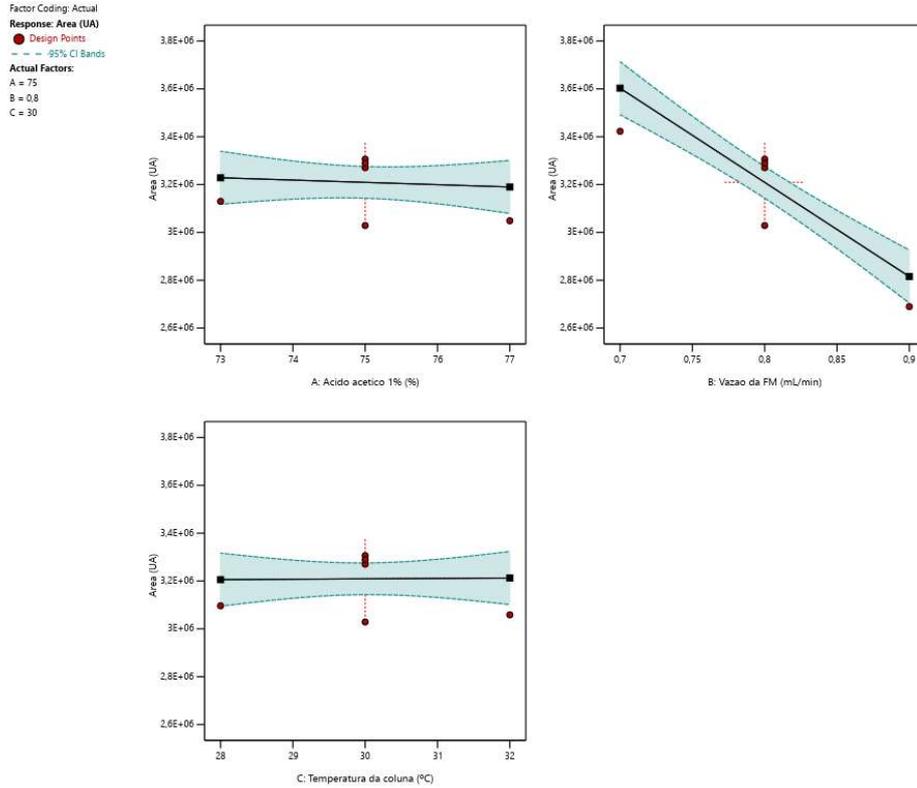


Figura 19: Fatores avaliados na robustez para área no Padrão 0,10 mg.mL⁻¹.

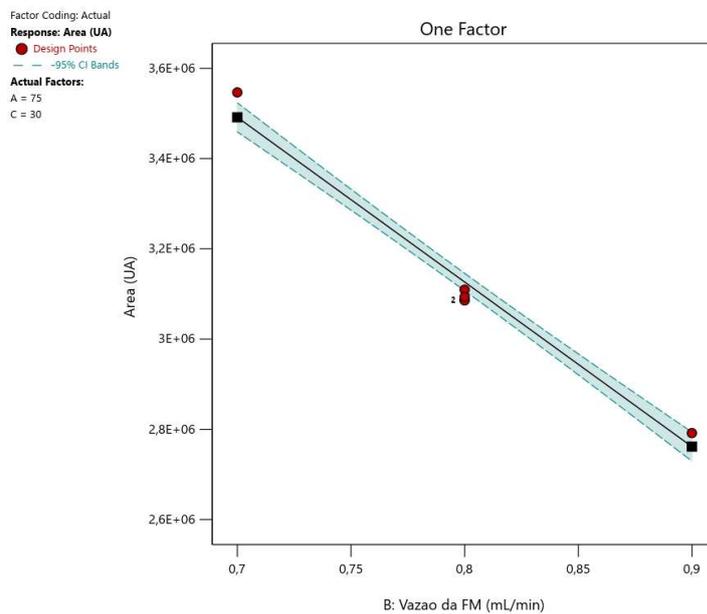


Figura 20: Variação na área observada com mudanças na vazão da fase móvel no Creme 02.

Avaliando-se agora o % de Recuperação em relação ao sinal amostra/Padrão temos os dados descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Valores de recuperação para o tempo de retenção e área obtidas para avaliar robustez.

Parâmetro	Valores	Recuperação (%)	Recuperação (%)
		Tempo de retenção	Área
% do Ácido	73	99,40	98,72
Acético 1% (%)	77	99,95	98,96
Vazão da fase móvel (mL.min ⁻¹)	0,7	99,97	100,12
Temperatura da coluna (°C)	0,9	100,97	101,39
	28	99,32	100,88
	32	99,82	100,82
Método padrão		99,38	101,00

4.3. Avaliação do teor de EGCG nas formulações

Usando a curva analítica obtida, realizou-se a quantificação das formulações (tempo zero) e da EGCG $\geq 90\%$ usada nas formulações. Os resultados estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8: Valores de teor (% m/m) para as formulações e EGCG $\geq 90\%$ no tempo zero.

Formulação/ Amostra	% (m/m) Esperado	% (m/m) Médio Obtido (%)	Recuperação (%)	DP (%)	CV (%)
Gel 01	0,882	0,713	80,84	0,018	2,557
Gel 02	0,900	0,880	97,77	0,016	1,783
Creme 01	0,833	0,836	100,36	0,008	0,922
Creme 02	0,922	0,879	95,33	0,020	2,315
Pomada	0,900	0,855	95,00	0,034	4,035
EGCG $\geq 90\%$	90,0	90,372	100,41	0,361	0,400

4.4. Morfologia das formulações

As micrografias obtidas para a EGCG $\geq 90\%$ dispersa em óleo mineral, os brancos e cada formulação no tempo zero e após 6 meses da Estabilidade Acelerada estão descritos no *Apêndice C*.

4.5. Liberação *in vitro*

As curvas de perfil de liberação *in vitro* para a solução de EGCG $\geq 90\%$ e do Gel 02 estão descritas na **Figura 21** e as obtidas para o Creme 02 e Pomada estão descritas na **Figura 22**. Em ambas, os valores descritos correspondem aos valores médios obtidos para o % de massa liberada.

Para avaliar se a membrana escolhida era inerte e a EGCG não se ligava a ela, monitorou-se a recuperação da mesma através da solução de EGCG $\geq 90\%$, conforme pode ser visto na **Figura 23**. Além disso, monitorou-se a solução de suor humano artificial após dissolução de EGCG por 8 dias para avaliar estabilidade, cuja comparação pode ser vista na **Figura 24**.

Os resultados obtidos para liberação *in vitro* foram então tratados para avaliação da cinética de liberação, usando-se o método de regressão linear. Para construção das curvas de Ordem zero plotou-se a massa cumulativa de EGCG liberada *versus* o tempo, para as curvas de Primeira ordem plotou-se o logaritmo cumulativo do % de EGCG restante *versus* o tempo e para Higuchi, plotou-se o % cumulativo de liberação de EGCG *versus* raiz quadrada do tempo, assim como descrito por PAARAKH et al., 2018. Os dados obtidos são mostrados na **Tabela 9**, sendo que para a pomada não foi possível avaliar devido à baixa liberação.

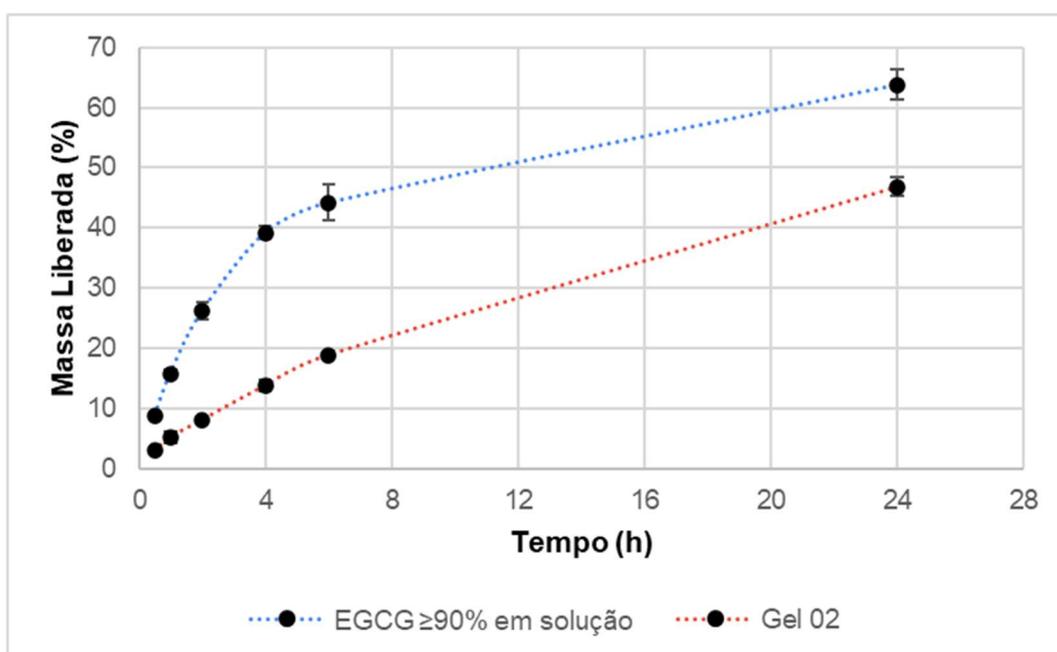


Figura 21: Perfil de liberação *in vitro* obtido para solução de EGCG $\geq 90\%$ e Gel 02, com barra de erros correspondente ao DP.

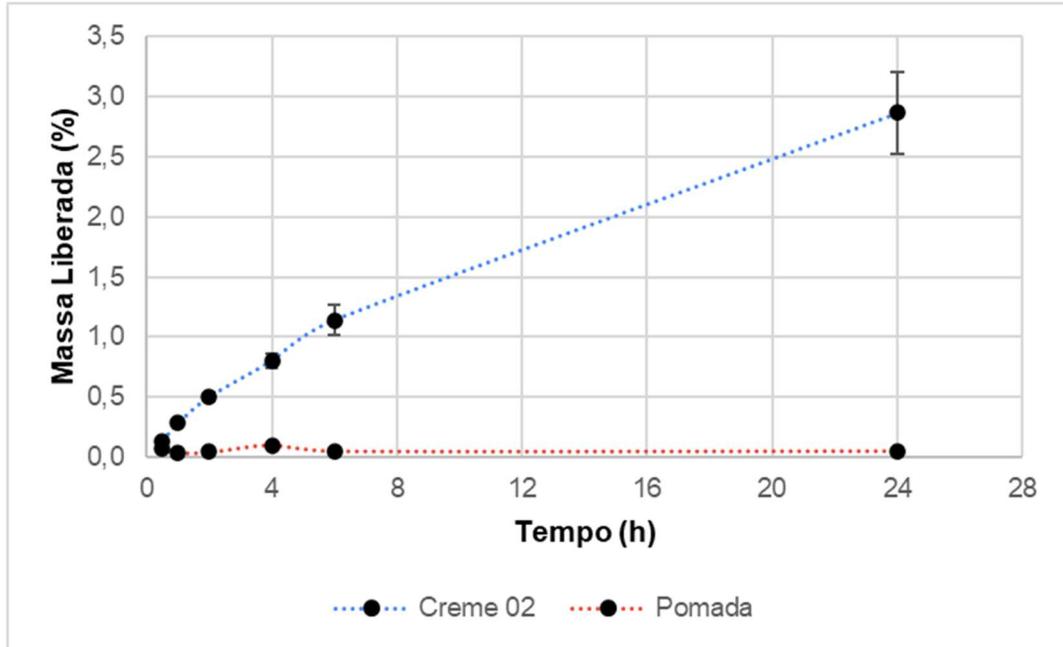


Figura 22: Perfil de liberação *in vitro* obtido para o Creme 02 e Pomada, com barra de erros correspondente ao DP.

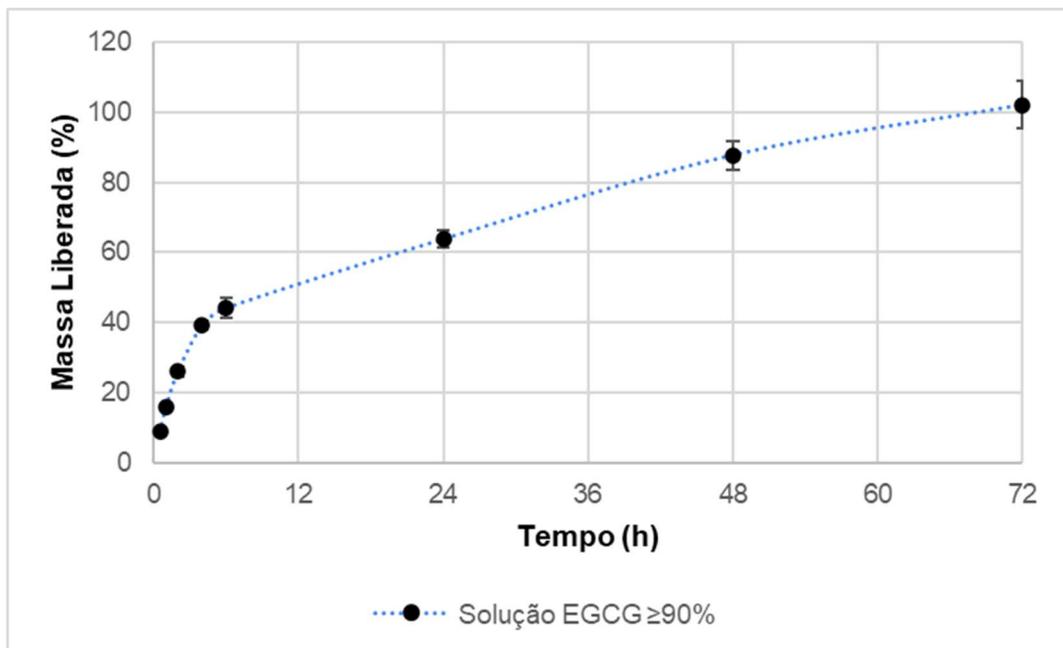


Figura 23: Perfil de liberação *in vitro* obtido para solução de EGCG $\geq 90\%$ para avaliação da membrana, com barra de erros correspondente ao DP.

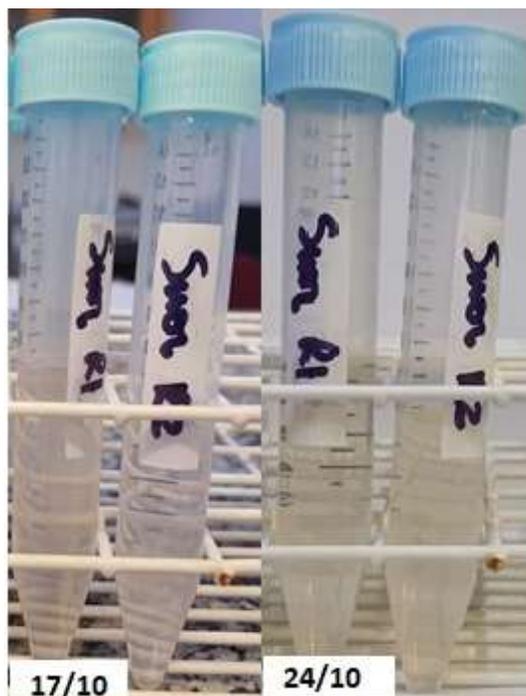


Figura 24: Suor humano artificial com EGCG dissolvida no tempo inicial (esquerda) e após 8 dias (direita).

Tabela 9: Avaliação da cinética de liberação da EGCG

Formulação	Modelo	Equação	r ²
Solução EGCG ≥90%	Ordem zero	$y = 0,650x + 3,522$	0,8067
	Higuchi	$y = 45,627x + 10,552$	0,9349
	Primeira Ordem	$y = 0,017x + 2,271$	0,3911
Gel 02	Ordem zero	$y = 0,329x + 0,910$	0,9286
	Higuchi	$y = 22,656x + 13,371$	0,9898
	Primeira Ordem	$y = 0,019x + 2,321$	0,4109
Creme 02	Ordem zero	$y = 0,020x + 0,049$	0,9330
	Higuchi	$y = 1,368x - 0,877$	0,9906
	Primeira Ordem	$y = 0,022x + 2,339$	0,4533

4.6. Estabilidade das formulações

Realizou-se o protocolo de Estabilidade Acelerada de acordo com a RDC 318/2019, avaliando-se os parâmetros: aspecto (cor e odor), densidade, pH e teor de EGCG após 3 e 6 meses (mesmas características avaliadas no tempo zero das formulações). Realizou-se também a verificação de aspecto e teor após 1 mês.

A cor de cada formulação após 1 mês pode ser visualizada na **Figura 25**, e após 3 e 6 meses pode ser visualizada no *Apêndice A*, **Figura 31(b)** e **(c)**, respectivamente.

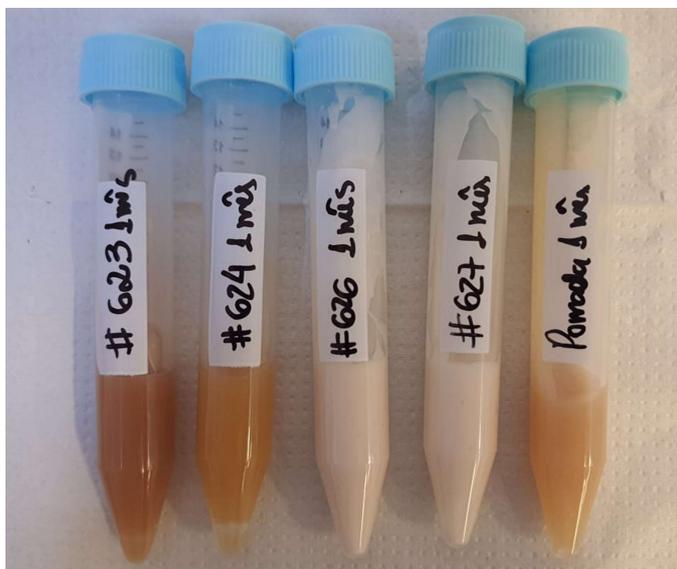


Figura 25: Amostras das formulações após 1 mês do teste de Estabilidade Acelerada, sendo, da esquerda para a direita, Gel 01, Gel 02, Creme 01, Creme 02 e Pomada.

Para densidade e pH, os valores obtidos para 3 e 6 meses estão descritos na **Tabela 10** e **Tabela 11**, respectivamente, onde compara-se com os dados obtidos para o tempo zero. No *Apêndice B*, **Tabela 13** e **Tabela 14**, estão os dados de desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para as medidas de densidade e pH, respectivamente.

Tabela 10: Densidade média das formulações a 25 °C com 0, 3 e 6 meses (n = 3).

Formulação	Tempo zero	3 meses	6 meses
Gel 01	1,0056	1,0142*	1,0179*
Gel 02	1,0079	1,0122*	1,0133*
Creme 01	0,9860	0,9914**	0,9938*
Creme 02	0,9909	1,0004**	1,0004*
Pomada	0,8566	0,8518**	0,8518**

(*) Com 95% de confiança, estatisticamente diferente do tempo zero;

(**) Com 95% de confiança, estatisticamente equivalente ao tempo zero.

Tabela 11: Valores de pH médios obtidos com 0, 3 e 6 meses (n = 3).

Formulação	Tempo zero	3 meses	6 meses
Gel 01	5,42	5,45**	5,34**
Gel 02	4,65	4,49*	4,21*
Creme 01	5,01	4,33*	4,28*
Creme 02	4,63	4,56**	4,50**

(*) Com 95% de confiança, estatisticamente diferente do tempo zero;

(**) Com 95% de confiança, estatisticamente equivalente ao tempo zero.

A fim de visualizar melhor as variações observadas na densidade e pH, plotou-se os resultados obtidos, sendo que as curvas resultantes podem ser visualizadas na **Figura 26** e **Figura 27**, respectivamente.

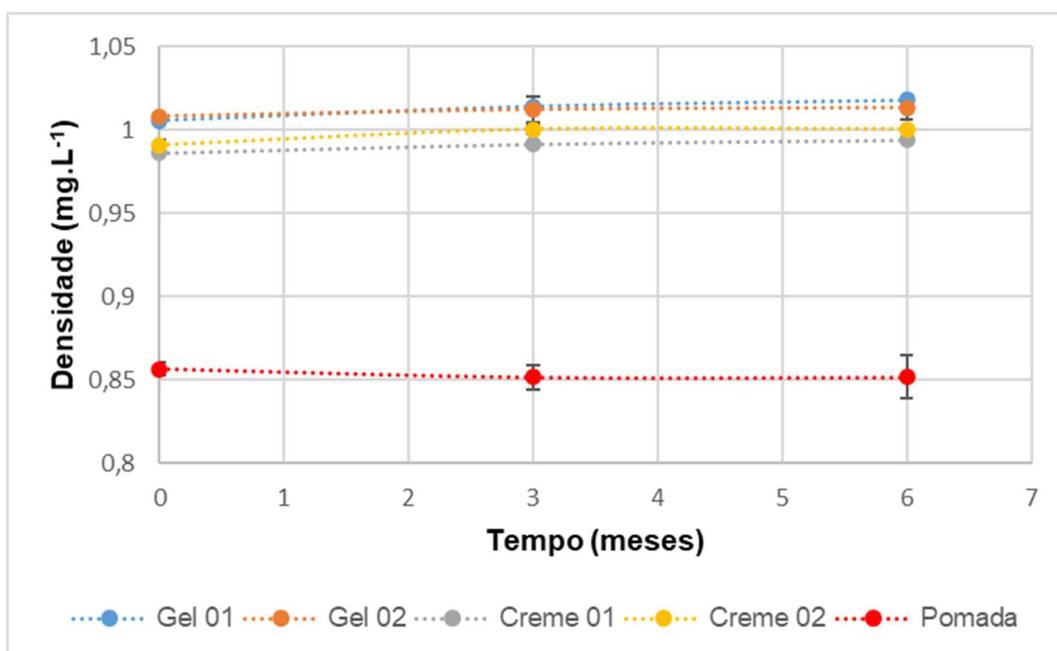


Figura 26: Densidade das formulações ao longo do tempo do teste de Estabilidade Acelerada (40 °C e 75% de umidade), com barra de erros correspondente ao DP.

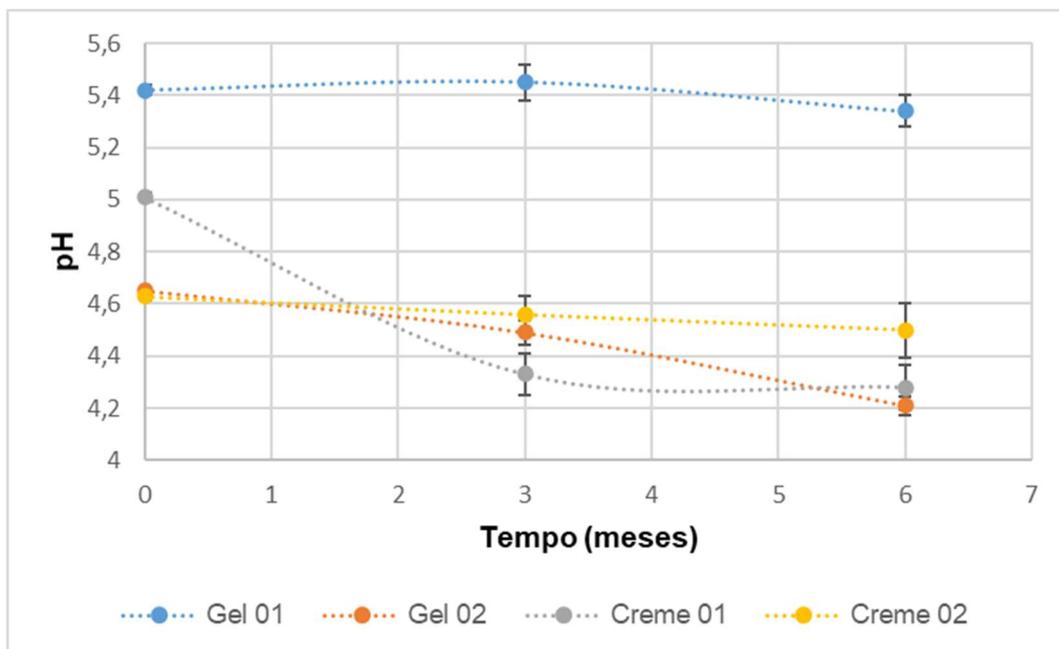


Figura 27: pH das formulações ao longo do tempo do teste de Estabilidade Acelerada (40 °C e 75% de umidade), com barra de erros correspondente ao DP.

O teor de EGCG obtidos para 1, 3 e 6 meses estão descritos na **Tabela 12**, onde compara-se com os dados obtidos para o tempo zero. No **Apêndice B, Tabela 15**, estão descritos os dados de desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para os teores em cada tempo. Também para avaliar melhor o teor, plotou-se o % m/m de EGCG ao longo do tempo, o qual pode ser visto na **Figura 28**, sendo que todos os pontos correspondem a medições em triplicata.

Tabela 12: Valores de teor (% m/m) para as formulações com 0, 1, 3 e 6 meses (n = 3).

Formulação	Teor (% m/m)			
	Tempo zero	1 mês	3 meses	6 meses
Gel 01	0,713	0,433	0,357	0,290
Gel 02	0,880	0,683	0,607	0,512
Creme 01	0,836	0,628	0,531	0,483
Creme 02	0,879	0,749	0,709	0,672
Pomada	0,855	0,861	0,853	0,834

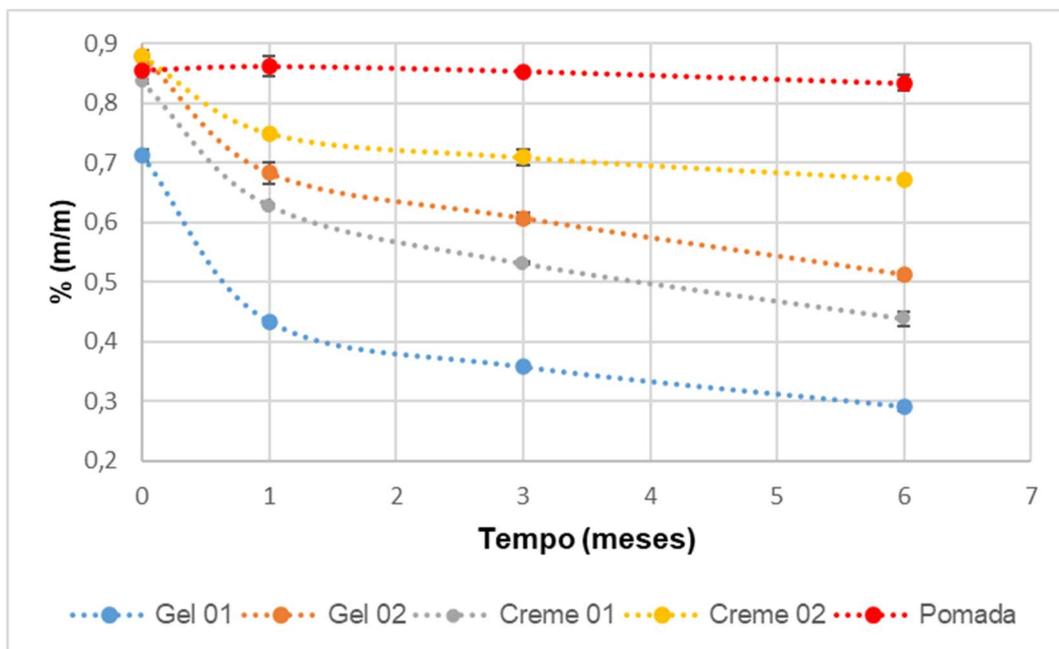


Figura 28: Teor de EGCG ao longo do tempo do teste de Estabilidade Acelerada (n=3), com barra de erros correspondente ao DP.

Os cromatogramas de cada formulação no tempo zero e após 6 meses do teste de Estabilidade Acelerada estão disponíveis no *Apêndice D*, **Figura 64** a **Figura 73**.

5. DISCUSSÃO

5.1. Preparo das formulações

Foram produzidas diferentes formulações com o propósito de se estudar o comportamento dessas apresentações acrescidas de EGCG, a fim de se selecionar as preparações mais viáveis sob o ponto de vista de aplicação prática.

Em todas as formulações escolheu-se usar 1% de EGCG, uma concentração típica usada em formulações tópicas e também com menor risco de causar sensibilidade, uma vez que, conforme relatado por ISBRUCKER et al., 2006, aplicações tópicas de EGCG com concentrações de 5 e 10% levaram a sensibilidade dérmica após 16 e 13 dias de aplicação, respectivamente, mostrando que há um efeito de dose-resposta. Os mesmos autores avaliaram a toxicidade e irritação dérmica que poderia ser causada pela aplicação de EGCG e verificaram que o LD₅₀ dérmico agudo para ratos de ambos os sexos era superior a 1860 mg de EGCG/kg, mostrando também que a concentração escolhida apresenta baixo risco de toxicidade e irritação da pele.

Nos Géis, os agentes gelificantes escolhidos, os quais são responsáveis pela estrutura e aspecto do produto, foram no Gel 01 o Lecigel[®], um copolímero desenvolvido com fosfolipídios da soja, portanto, de origem semissintética, que possui estabilidade na faixa de pH de 4 a 8 e resulta em um gel com maior fluidez (BIOTEC, 2019) e no Gel 02, o Aristoflex AVC[®], um copolímero sintético bastante usado para essa finalidade, que possui boa estabilidade na faixa de pH de 4 a 9 (PHARMASPECIAL, 2018).

O uso de pH mais ácidos (2 a 5,5) é extremamente importante, uma vez que a EGCG possui instabilidade em pH maiores que 5,5 e altas temperaturas, quando dispersa em meio aquoso (KRUPKOVA et al., 2016), ocorrendo epimerização da mesma para GCG (XU et al., 2019). Por esse mesmo motivo, optou-se por não usar o Carbopol, um dos agentes gelificantes mais comumente utilizados, uma vez que ele precisa ser neutralizado para sua ativação.

Como a EGCG também pode sofrer reações de hidrólise e polimerização, estratégias como uso de veículos à base de glicerina em um meio mais ácido mostraram uma melhora na estabilidade da mesma (PRONIUK et al., 2002; SCALIA et al., 2013). Por esse motivo e para ser incorporado com a função de umectante,

usou-se glicerina em todas as formulações de géis e cremes. A inclusão de glicerina, principalmente nos géis, também tem como objetivo melhorar seu efeito hidratante e oclusivo, o qual neles é menor em comparação aos cremes e pomadas (BARNES et al., 2021).

Como agente antioxidante nos géis e cremes, escolheu-se usar o acetato de tocoferol, um derivado da Vitamina E obtido por esterificação, que mostra maior estabilidade devido a retirada do grupo hidroxila (KUSUMAWATI e INDRAYANTO, 2013). A estrutura do mesmo em comparação com a Vitamina E pode ser visualizada na **Figura 29**.

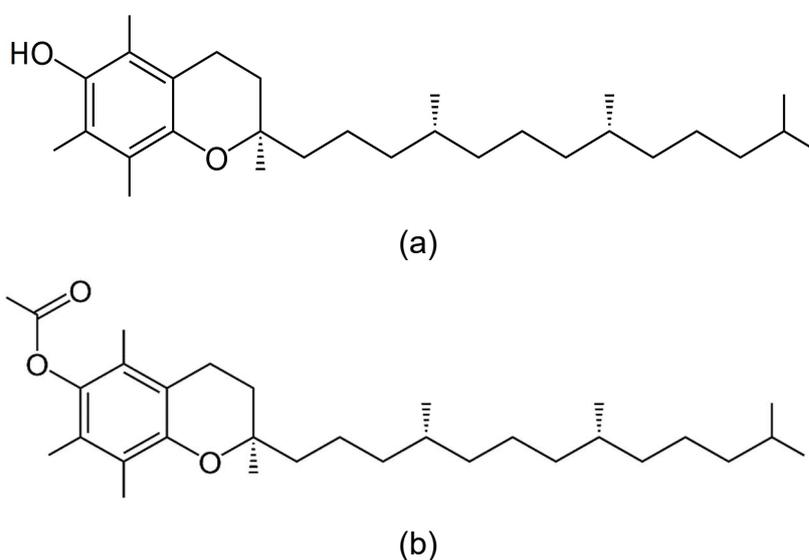


Figura 29: Estrutura química da (a) Vitamina E e do (b) Acetato de tocoferol (SILVA et al., 2019).

A Vitamina E é usada há mais de 50 anos em formulações devido a suas funções antioxidantes, fotoprotetoras e anti-inflamatórias. Ela é comumente utilizada em cremes antienvhecimento, no tratamento de queimaduras, cicatrizes e feridas (SILVA et al., 2019; KEEN e HASSAN, 2016). Assim, além da vantagem de ser de origem natural, evitando-se usar antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), que possuem incertezas quanto a sua segurança e por isso, limite de concentração em formulações cosméticas de no máximo 0,5% como trazido por PANICO et al., 2019, a Vitamina E enriquece as formulações em seu efeito terapêutico, uma vez que concentrações entre 0,1 a 1% da

mesma em formulações tópicas se mostram eficazes como antioxidante na pele (NADA et al., 2012).

Como conservante nos géis e cremes, escolheu-se usar o Optiphen[®], um conservante líquido, que consiste na junção do fenoxietanol e caprililglicol. O fenoxietanol é um conservante comumente utilizado por sua baixa toxicidade, sendo eficaz contra bactérias e fungos (SHARMA et al., 2023). O caprililglicol é normalmente utilizado como emoliente, mas quando usado em conjunto com outro conservante, como nesse caso, potencializa a ação antimicrobiana, sendo interessante no caso de microrganismos mais resistentes como fungos e bactérias gram-negativas (SCHMITT et al., 2022). O Optiphen[®] é livre de parabenos e formaldeído, conservantes sintéticos comumente usados, mas que já possuem proibições de uso em alguns países devido sua possível toxicidade, atuação como desregulador endócrino e efeito mutagênico (BILAL et al., 2020).

Como agente quelante nos géis e cremes, usou-se o EDTA dissódico, um composto comumente usado para essa função.

No Creme 01, o agente emulsionante escolhido foi o Olivem 1000[®], um produto natural, composto por olivato de cetearila e olivato de sorbitano, derivados do azeite de oliva. Ele cria uma emulsão de cristal líquido, que imita o arranjo dos lipídios do estrato córneo, o que torna suas emulsões biocompatíveis. Olivem 1000[®] também possui características umectantes e emolientes, protegendo a pele da perda excessiva de umidade e ajudando a suavizá-la, além de proporcionar uma ótima espalhabilidade (WRÓBLEWSKA e WINNICKA, 2022).

No Creme 02, o agente emulsionante escolhido foi Emulium Delta[®], uma mistura de ingredientes vegetais e sintéticos: o álcool cetílico, estearato de glicerila, estearato de PEG-75, Ceteth-20[®] e Steareth 20[®]. Os últimos três componentes são os que possuem a função de emulsionar a formulação. O álcool cetílico tem função emoliente, sendo normalmente usado com a função de aumentar a viscosidade e estabilizar formulações, e o estearato de glicerila é um coemulsionante que também possui propriedades emolientes (SHARMA et al., 2023). Por esse motivo, o Emulium Delta[®] é um ingrediente bastante utilizado em formulações difíceis de estabilizar.

Em ambos os cremes escolheu-se utilizar o Óleo de Rosa Mosqueta como meio oleoso devido suas propriedades emolientes e terapêuticas, uma vez que ele possui uma proteção relativamente alta contra a inflamação e o estresse oxidativo, sendo bastante eficaz na regeneração da pele (LIN et al., 2018). Segundo COELHO

et al., 2022, ela é rica em ácido linoleico, responsável pela regulação da produção de colagenase, que induz a granulação, e em ácido linolênico que protege a pele contra agentes químicos e enzimáticos e age na manutenção da permeabilidade epidérmica, sendo ambos os processos estimuladores da cicatrização.

Nos cremes também se utilizou o Aristoflex[®] AVC como espessante para dar mais consistência aos mesmos.

A formulação da pomada escolhida está de acordo com a base sugerida pela Farmacopeia Americana (USP) contendo lanolina e vaselina, conhecida também como petrolato, em uma proporção 30/70. Como não é um meio aquoso, não foram incluídos conservantes.

A lanolina é um subproduto da produção de lã, tendo uma função semelhante ao sebo presente na pele. Atua como hidratante, emoliente e também possui efeito antimicrobiano (SCANES, 2018). Há relatos de uso de lanolina na maturação de feridas em animais, incluindo um ensaio clínico que mostrou o aumento na taxa de epitelização e espessura dérmica de leitões (THEORET e STASHAK, 2014).

A vaselina ou petrolato é um produto sintético obtida pela combinação complexa de componentes líquidos (óleo mineral) e sólidos (cera de parafina e cera microcristalina). É insípida e quase inodora. Atua como ocludente e hidratante (diminui a perda transepidérmica de água (TEWL) em 50% a 99%), sendo amplamente utilizado em produtos usados na pele, uma vez que tem baixo potencial alergênico e irritante (KAMRANI et al., 2024).

5.2. Caracterização das propriedades gerais

Os géis, cremes e pomada mostraram aparências e odor característicos. Observa-se pela **Figura 31(a)**, *Apêndice A*, que os géis e cremes mostravam uma coloração rosada, característica da EGCG $\geq 90\%$, que consiste em um pó rosado, e a pomada mostrava uma coloração amarelada.

Em relação a densidade obtida (**Tabela 10**), conforme esperado, os géis, que possuem uma composição em torno de 90% de água, possuem densidades próximas a ela ($0,997 \text{ g.mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Os cremes mostraram uma densidade inferior aos géis, também como esperado, uma vez que eles já possuem a presença de substâncias oleosas, as quais possuem densidades inferiores à da água. Da mesma

forma, a pomada possui a menor densidade em relação aos outros, uma vez que ela é composta somente de substâncias oleosas, apresentando uma densidade próxima ao petrolato ($0,900 \text{ g.mL}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). A densidade, portanto, é um parâmetro característico da formulação, podendo ser usada no controle de qualidade do produto para monitorar sua integridade e estabilidade (MELO et al., 2018).

Quanto aos pHs obtidos (**Tabela 11**), observa-se pHs entre 4,6 e 5,4, o que está dentro da faixa de pH natural da pele, que é em torno de 4,0 a 6,0. Esse é um aspecto muito importante, uma vez que aplicar produtos tópicos que contenham um pH muito diferente do pH da pele (principalmente alcalino), altera seu pH natural, o que pode causar vários efeitos indesejados.

SPADA et al., 2022 relata a avaliação do impacto do pH na pele através de imagens de tomografia de coerência óptica do estrato córneo após sua exposição a produtos com pH ácido, neutro e básico, mostrando que ocorre um inchaço de suas proteínas significativamente maior naqueles com pH superior a 8,0. Esse inchaço por consequência leva a uma desestabilização das bicamadas lipídicas, dispersão da microbiota ativa e promoção de microrganismos oportunistas e patogênicos, o que pode levar a uma perturbação e uma ruptura mínima na barreira natural da pele. Além disso, assim como a densidade, o pH é um parâmetro importante para avaliar a estabilidade do produto, principalmente no caso da EGCG que é sensível a pH maiores que 5,5 quando dispersa em meio aquoso (KRUPKOVA et al., 2016).

5.3. Validação do método CLAE para verificação do teor de EGCG

Avaliando-se a Linearidade, a curva obtida (**Figura 8**) se mostrou linear em toda a região de concentração escolhida. Ao aplicar a ANOVA à Regressão, pode-se rejeitar a Hipótese Nula através do teste F e assim, considerar a regressão significativa, ou seja, a variação observada no conjunto de dados não é apenas devido a erro aleatório e sim devido a variação da concentração.

Na avaliação dos resíduos, verificou-se que eles seguem uma distribuição normal, tanto graficamente (**Figura 9**) como através do Teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), são independentes, ou seja, há uma aleatoriedade dos mesmos entre si em torno do zero ao longo das injeções, são Homocedásticos, tanto graficamente (**Figura 11**) como através do Teste de Breusch-Pagan ($p > 0,05$) e estão dentro de 99% da distribuição normal, não havendo pontos anômalos.

Na Seletividade, observa-se pela **Figura 13** que o tempo de retenção do Padrão de EGCG é em torno de 8,4 min. Comparando-se com os cromatogramas obtidos para os brancos (placebos) de cada formulação, observa-se que com exceção do branco do Gel 01, não há pico próximo ao tempo de retenção do Padrão, mostrando que nenhum dos componentes das formulações possuem tempo de retenção igual a EGCG e, portanto, não eluem junto com ela.

No caso do branco do Gel 01 (**Figura 14**), observa-se um pico em torno de 9,0 minutos, eluindo muito próximo a EGCG. Avaliando-se a área desse pico, obtém-se um valor inferior a 1% da área obtida para o ponto central (100%), não interferindo, portanto, na quantificação da EGCG. Avaliando-se a resolução dos dois picos, através do cromatograma da formulação Gel 01, obtém-se um valor em torno de 1,00, mostrando, que apesar de próximos, é possível separá-los, sendo que ao avaliar-se a pureza do pico correspondente a EGCG no cromatograma do Padrão e do obtido para a formulação Gel 01 (**Tabela 4**), observa-se que o pico identificado e quantificado para EGCG não contém interferentes.

Assim, pode-se concluir que nenhum dos componentes das formulações eluem junto com a EGCG, mostrando que o método é específico para a EGCG nas condições ensaiadas em todas as formulações avaliadas.

Em relação a precisão do método (**Tabela 5**), observa-se que o CV obtido foi baixo (<2,0%), mostrando uma boa concordância entre os resultados obtidos, logo, o método pode ser considerado preciso.

Quanto a exatidão do método (**Tabela 6**), observa-se que a recuperação obtida está entre 99-100% em todos os níveis testados, dentro do esperado para essa faixa de concentração (95-105%), mostrando que o método é exato dentro do intervalo linear avaliado.

Quanto a Robustez, avaliando-se os dados obtidos no planejamento fatorial, obteve-se que em relação ao tempo de retenção, tanto no Padrão como no Creme 02, o % de Ácido Acético 1% na fase móvel e a vazão da mesma se mostraram parâmetros significativos, ou seja, alterações nos mesmos, alteram o tempo de retenção observado (também obteve-se significância na interação entre eles).

Avaliando-se as curvas/superfície obtidas (**Figura 17 e Figura 18**), ao aumentarmos o % de Ácido Acético de 73% para 77% observa-se um aumento no tempo de retenção. Isso ocorre devido a diminuição da força cromatográfica ocasionada pela diminuição do metanol, aumentando o fator de retenção, ou seja, o

analito interage mais com a fase estacionária. Ao aumentarmos a vazão da fase móvel de 0,7 para 0,9 mL/min, observa-se a mesma redução no tempo de retenção, uma vez que com maior fluxo de fase móvel há mais interações da fase móvel com o mesmo, eluindo o mesmo mais rapidamente. Para a temperatura da coluna, não há efeito significativo.

Em relação a área, a vazão da fase móvel foi o único parâmetro significativo, tanto para o Padrão como para o Creme 02. Avaliando-se as curvas obtidas (**Figura 19** e **Figura 20**), ao aumentarmos a vazão da fase móvel de 0,7 para 0,9 mL.min⁻¹, observa-se uma redução na área, o que pode impactar no teor quantificado. Para o % de Ácido Acético na fase móvel e temperatura da coluna, não há efeito significativo.

Agora avaliando a robustez pelo % de Recuperação em relação ao sinal amostra/Padrão (**Tabela 7**), observa-se que a recuperação ficou entre 98,72 e 101,39%, mostrando que apesar de ocorrerem mudanças no tempo de retenção e área com as variações testadas, elas ocorrem na mesma proporção para padrão e amostra. Assim, o método pode ser considerado robusto.

5.4. Avaliação do teor de EGCG nas formulações

Observa-se pelos resultados obtidos (**Tabela 8**), que com exceção da formulação Gel 01, todas as formulações mostraram uma recuperação igual ou superior a 95%, mostrando que a EGCG foi devidamente incorporada nas mesmas. No Gel 01, como o valor obtido de EGCG ficou inferior ao esperado, suspeita-se que a EGCG já tenha sofrido alguma reação de degradação, responsável por essa redução no teor observada.

5.5. Morfologia das formulações

A microestrutura de uma formulação semissólida engloba a caracterização de algumas de suas características, como pH, reologia, o estado físico do princípio ativo (solubilizado *versus* sólido disperso), além do tamanho das suas partículas, quando sólido, ou das gotículas, no caso de emulsões (YEON et al., 2022).

A microscopia ótica é uma técnica clássica que pode trazer diversas informações como morfologia e homogeneidade da amostra, além de que com o uso

de polarizadores, é possível investigar amostras opticamente anisotrópicas (birrefringentes), como materiais cristalinos ou líquido-cristalinos (BUNJES e KUNTSCHE, 2016).

Além disso, pode ser usada na caracterização e no controle de qualidade das formulações, uma vez que permite monitorar modificações na morfologia como cristalização do princípio ativo, quando ele está solubilizado e alteração do tamanho das partículas ou gotículas no caso do princípio ativo disperso ou uma emulsão, respectivamente, ao longo do tempo (WU et al., 2019).

Assim, com o intuito de caracterizar a morfologia das formulações e também avaliar o estado físico da EGCG, obteve-se imagens em Microscopia Ótica da EGCG $\geq 90\%$, dos brancos e de cada formulação. Observa-se na **Figura 32** e na **Figura 33** (Apêndice C) que a EGCG $\geq 90\%$ é birrefringente, ou seja, desvia luz, se destacando quando se faz uso de luz polarizada. Dessa forma, pode-se usar essa característica para verificar o seu estado físico em cada uma das formulações. Para isso, repetiu-se o mesmo processo para os brancos de cada uma das formulações e para as formulações.

Como a EGCG é solúvel em água, espera-se que ela esteja solúvel nas formulações de gel e creme e dispersa na pomada. Observa-se na **Figura 34** a **Figura 63** que todos os brancos, exceto o da pomada, não mostram birrefringência. Quando observa-se as formulações de gel e creme sem o uso da luz polarizada, não identifica-se partículas como as observadas na **Figura 32**, onde a EGCG $\geq 90\%$ estava dispersa no óleo mineral. Ao observá-las com luz polarizada não se identifica birrefringência, corroborando com a expectativa inicial de que a EGCG $\geq 90\%$ esteja solúvel. Ao fazer isso com a pomada, observa-se partículas com mesma morfologia da EGCG sem uso de luz polarizada e com luz polarizada, observa-se a birrefringência, corroborando com a expectativa de que a EGCG $\geq 90\%$ está dispersa na pomada. Esse resultado também corrobora com a cor observada nas formulações, que era rosada nos géis e cremes e amarelada na pomada, característica de seu branco (placebo).

Avaliou-se novamente a morfologia das formulações após os 6 meses do estudo de Estabilidade Acelerada com o intuito de monitorar possíveis modificações, ou seja, se a EGCG havia precipitado nos géis e cremes ou mudado de forma/característica na pomada. Observa-se que a morfologia dos géis, cremes e pomada não sofreu alterações, sendo que para os géis e cremes continua não se observando a birrefringência ao usar a luz polarizada, mostrando que a EGCG

continua solúvel e na pomada, observa-se partículas com tamanho e morfologia similares a observadas no tempo zero.

5.6. Liberação *in vitro*

Nas curvas de liberação obtidas (**Figura 21 e Figura 22**), observa-se que a liberação é maior para a solução de EGCG $\geq 90\%$ (63,80%), seguida do Gel 02 (46,79%) e do Creme 02 (2,86%). Para a Pomada a liberação foi muito baixa (0,05%), se comparada com as demais.

A liberação de um princípio ativo é dependente de diversos fatores, como viscosidade, componentes e forma farmacêutica. Geralmente, pomadas irão apresentar uma taxa de liberação menor do princípio ativo se comparada a outras formas farmacêuticas, devido sua baixa quantidade de água e alta viscosidade. Em cremes isso irá depender da taxa de partição do princípio ativo entre a fase oleosa e aquosa e no gel, a liberação do princípio ativo da matriz polimérica (RAGHAVAN et al., 2019).

Isso foi observado por PRONIUK, 2000 em géis anidros contendo EGCG, onde o resultado de liberação *in vitro* foi influenciado pela viscosidade da formulação, sendo que quanto maior a viscosidade, mais lenta a liberação. ZILLICH et al., 2013 também relatou diminuição na liberação observada com o aumento de óleo usado em emulsões contendo polifenóis. Ambos os relatos corroboram com o que foi observado nos resultados obtidos: o gel por ter uma estrutura mais fluida (menor viscosidade) liberou mais EGCG, seguida da emulsão e por fim, a pomada. Além disso, tem-se também uma maior interação entre o gel e o meio receptor, o qual diminui com o creme e a pomada, o que provavelmente também impactou na liberação, principalmente da pomada.

Outro fator que poderia afetar na liberação é o tipo de membrana escolhida para realização dos testes, sendo importante que ela seja inerte à formulação e ao meio receptor, não se ligue ao princípio ativo, o que acabaria limitando sua taxa de liberação, e seja facilmente disponível (RAGHAVAN et al., 2019). Para avaliar se a membrana escolhida era inerte e a EGCG não se ligava a ela, monitorou-se a recuperação da mesma através da solução de EGCG $\geq 90\%$, observando-se uma recuperação de 100% da mesma após 72 horas de ensaio (**Figura 23**), mostrando que a membrana não era um fator limitante.

O meio receptor foi escolhido baseando-se no trabalho de ALVES, 2003 que testou diferentes meios e o suor humano artificial se mostrou um dos mais solúveis para EGCG, e através do monitoramento da solução após dissolução da EGCG em 8 dias, não se observou escurecimento da mesma (**Figura 24**), mostrando que a EGCG é estável no meio.

Através dos resultados obtidos para as regressões lineares na avaliação da cinética de liberação (**Tabela 9**), observa-se pelos r^2 obtidos que tanto as formulações como a solução de EGCG $\geq 90\%$ seguem uma cinética de pseudo primeira ordem (Higuchi), mostrando que seu processo de liberação é dependente da raiz quadrada do tempo. Isso está de acordo com o reportado por ALVES, 2003 e DAL'BELO, 2008, que também avaliaram formulações semissólidas contendo EGCG ou extrato de chá verde.

Além disso, esses resultados norteiam possíveis usos práticos de cada uma das formulações. A pomada como teve pouca liberação ao ser aplicada na pele deve liberar pouco EGCG permitindo pouca penetração na pele, devendo ficar mais concentrada na superfície do estrato córneo. Assim, aplicações que precisem de efeito oclusivo e ação da EGCG na superfície da pele são mais adequadas. Já o gel e creme possuem uma maior liberação de EGCG, o que permite que ela possa penetrar no estrato córneo, sendo que o creme deve promover uma maior penetração em comparação ao gel, devido sua característica mais lipofílica, conforme observado por SCALIA et al., 2014. Assim, aplicações que dependam de uma maior penetração são mais adequadas para o gel e principalmente, creme.

5.7. Estabilidade das formulações

Após o protocolo de Estabilidade Acelerada, os géis, cremes e pomada mantiveram o odor inicial tanto após 1, 3 e 6 meses, não se observando modificações na textura, no caso dos géis e pomada, e separação de fase, no caso dos cremes.

Em relação a cor, observa-se que os géis e a pomada mostraram colorações mais escurecidas após 1 mês (**Figura 25**) se comparadas a cor inicial (**Figura 31(a)**, *Apêndice A*), o que indica possível oxidação. Os cremes não mostram alteração nesse período. Após 3 e 6 meses (**Figura 31(b)** e **(c)**, *Apêndice A*) o escurecimento observado nos géis e pomada foi se intensificando, sendo que os

cremes também passaram a mostrar leve escurecimento, se comparados ao tempo zero.

Em relação a densidade (**Tabela 10**), comparando-se estatisticamente a densidade de 3 meses com o tempo zero, usando *teste t*, observa-se que as densidades do Gel 01 e Gel 02 sofreram modificações, havendo um ligeiro aumento. Já para as formulações restantes, as médias são estatisticamente equivalentes com 95% de confiança. Comparando-se a densidade de 6 meses com o valor inicial, observa-se que estatisticamente, as densidades do Creme 01 e Creme 02 sofreram modificações, havendo novamente um ligeiro aumento. Já para a Pomada, as médias são estatisticamente equivalentes com 95% de confiança, tanto com 3 como com 6 meses. Esse aumento na densidade pode indicar modificações nas formulações como perda de componentes por volatilização, por exemplo (MELO et al., 2018), ou até formação de compostos mais densos devido a reações presentes no meio.

Quanto ao pH (**Tabela 11**), com 95% de confiança, verificou-se diferença nos valores obtidos, tanto entre o tempo zero e 3 meses, como entre o tempo zero e 6 meses para o Gel 02 e Creme 01. Em ambos se observou uma redução no pH. Em relação ao Gel 01 e Creme 02, as médias são estatisticamente equivalentes com 95% de confiança. Essa redução de pH indica aumento de substâncias ácidas no meio, provavelmente devido a reações que ocorreram. Mesmo com essa redução, os valores observados de pH ainda estão dentro da faixa de pH natural da pele.

Apesar da densidade e pH com 3 e 6 meses terem se mostrado estatisticamente diferentes com 95% de confiança (exceto pH do Gel 01 e Creme 02 e densidade da Pomada) ao avaliar-se graficamente os resultados (**Figura 26** e **Figura 27**), verifica-se que a modificação foi muito pequena.

BHATTACHARYA e SHERJE, 2020 também avaliaram o pH de formulações de emulgéis contendo EGCG e resveratrol com objetivo de serem fotoprotetoras e antioxidantes com 0 e 6 meses (após submeter as formulações a uma temperatura de 40 °C e 75% de umidade) e observaram pouca variação nos valores, sendo que o pH obtido para o tempo zero ficou entre 5,64 e 5,87 e o pH após 6 meses ficou entre 5,61 e 5,82.

Em relação ao teor (**Tabela 12**), observa-se que somente a Pomada se manteve com teor de EGCG estável ao longo do tempo, seguida de menor redução no Creme 02 (24% após 6 meses) e no Gel 02 (42% após 6 meses). O Creme 01 teve uma redução de 48% e o Gel 01 uma redução da EGCG de 59% ao longo dos 6

meses. Isso mostra que o Gel 01 é uma das formulações mais sensíveis, o que corrobora com o resultado de teor obtido no tempo zero, que foi menor que o esperado, confirmando que possivelmente já havia ocorrido uma degradação da EGCG. Ao comparar o valor final do Gel 01 com o valor esperado inicialmente, observa-se que a redução total foi de 67% após os 6 meses. Dessa forma, as formulações de géis e cremes podem ser consideradas não estáveis nas condições ensaiadas, uma vez que o percentual de perda da EGCG foi superior a 10%.

Segundo KRUPKOVA et al., 2016, a estabilidade a longo prazo de catequinas avaliadas em bebidas com pH entre 4 e 5 por 6 meses, mostrou que após 1 mês, 30-78% das mesmas já haviam sido perdidas. Isso mostra o quanto a EGCG é sensível a processos de degradação e como é importante o uso de antioxidantes em formulações que a contenha. Comparando-se o que foi relatado por KRUPKOVA et al., 2016 com os resultados obtidos de teor, vemos que o antioxidante adicionado promoveu a redução da perda da EGCG, pois os valores para 1 mês obtidos foram de 15-39%.

Conforme descrito anteriormente, o pH do meio é importante para a estabilização da EGCG, sendo que além do pH, a temperatura é outro fator importante na sua estabilidade. Segundo FRASHERI et al., 2020, quando temos uma interação entre pH e temperatura, observa-se que em temperaturas de 4 a 25 °C, com o aumento do pH, há uma degradação notável de EGCG, mas com o aumento da temperatura, o pH passa a não ser mais relevante, sendo a temperatura a principal causa de sua degradação, e os resultados corroboram com isso. Apesar das formulações com pH iniciais maiores mostrarem maior perda de EGCG (Gel 01 e Creme 01), provavelmente a perda observada de EGCG nas formulações foi bastante influenciada pela temperatura.

SECRETAN et al., 2021 realizou um teste de Estabilidade Acelerada com formulações aquosas contendo EGCG e observou que elas eram mais estáveis em temperatura de 2 a 8 °C, se mostrando mais suscetíveis a perda no teor em temperaturas maiores. No caso de 40 °C e 75 % de umidade relativa, observou-se uma maior perda em comparação com as outras temperaturas, o que corrobora com o obtido nos resultados para as formulações de géis e cremes.

O modo como a EGCG está em cada formulação (solúvel ou dispersa) também deve ter impactado em sua estabilidade. Como na pomada ela estava dispersa, estava menos disponível para sofrer reações de degradação. LI et al., 2013

avaliou a estabilidade da EGCG em solução e na forma de pó amorfo, verificando que a degradação dela ocorre em menor grau no pó.

HU et al., 2015 avaliou a estabilidade acelerada de um sistema de emulsão dupla sólido contendo EGCG a 30 °C e 65% de umidade por 0, 3 e 6 meses observando uma boa estabilidade e pouca redução do teor de EGCG, o que corrobora com o obtido para a pomada, formulação semissólida onde a EGCG estava no estado sólido.

Encontrou-se bastante dificuldade em comparar-se os dados obtidos para a Estabilidade Acelerada com dados da literatura, uma vez que há uma escassez de informações para testes de estabilidade realizados por um período tão longo de tempo. A maioria dos testes realizados utilizam alguns dias ou um mês de acompanhamento, seguindo outros protocolos de estabilidade, os quais não avaliam o teor de princípio ativo, somente parâmetros gerais como aspecto e pH.

A instabilidade da EGCG ocorre por sua facilidade de se auto-oxidar, formar epímeros, dímeros e polímeros desses dímeros. A auto-oxidação envolve perda de átomos de hidrogênio, formação de radicais semiquinona e peróxido de hidrogênio (UNGARALA et al., 2023; KRUPKOVA et al., 2016). Quando isso ocorre, a coloração do meio tende a mudar para marrom o que indica a presença de estruturas com maior peso molecular, via polimerização de dímeros de EGCG (KRUPKOVA et al., 2016).

Na presença de antioxidantes, a auto-oxidação é reduzida, havendo então a epimerização de EGCG em seu *trans*-epímero GCG. Seus epímeros não possuem efeito tóxico e até apresentam atividade biológica similar ao seu isômero *cis* (KRUPKOVA et al., 2016). A epimerização ocorre preferencialmente em pH < 5,5, altas concentrações de EGCG e temperaturas acima de 44-50 °C (KRUPKOVA et al., 2016; FRASHERI et al., 2020).

O esquema presente na **Figura 30** mostra os possíveis produtos da oxidação e epimerização da EGCG.

Assim, frente ao que está descrito na literatura e ao que foi observado na avaliação das formulações, provavelmente a queda no teor de EGCG ocorreu devido a uma mistura de eventos de auto-oxidação, epimerização e formação de polímeros dos seus dímeros, o que pode ter promovido as mudanças de cor, redução do pH de algumas formulações e aumento de densidade observados. Estudos futuros podem incluir a investigação das substâncias formadas devido a esses eventos usando-se de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas, por exemplo.

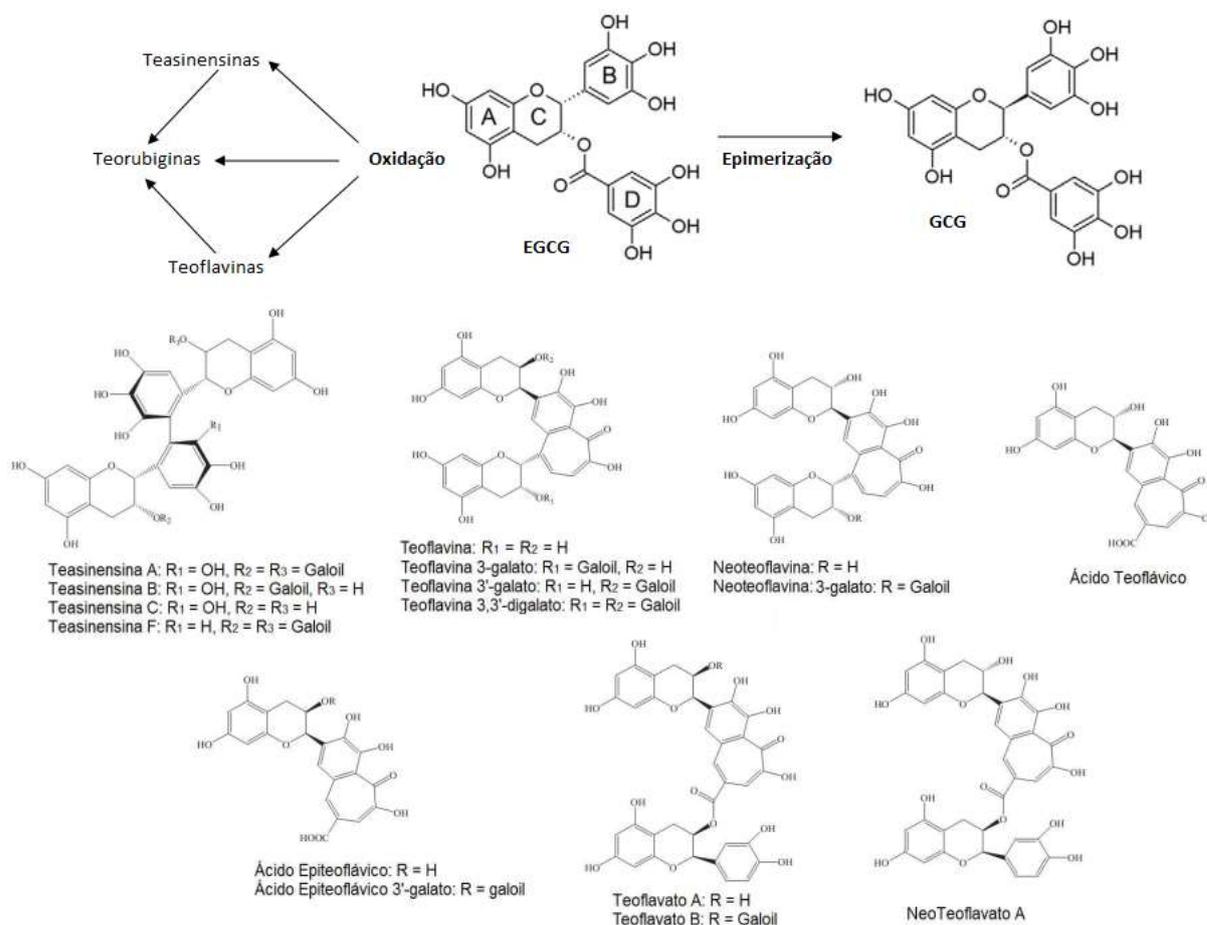


Figura 30: Produtos gerados pela oxidação e epimerização da EGCG (Adaptado de ALVES, 2013 e KRUPKOVA et al., 2016).

A partir de tudo o que foi avaliado, verifica-se que realmente a estabilidade das formulações contendo EGCG é um ponto crítico, principalmente quando ela está dissolvida no meio, como foi o caso dos géis e cremes. Apesar disso pode-se verificar que o uso do acetato de tocoferol se mostrou efetivo, uma vez que foi observado uma menor redução em seu teor ao comparar-se com os dados da literatura para soluções de chá verde, conforme já discutido anteriormente. Estudos futuros podem incluir uma maior concentração desse antioxidante, uma vez que apesar de mais estável que a Vitamina E, pode ter sua atividade antioxidante reduzida quando na forma de acetato (KUSUMAWATI e INDRAYANTO, 2013), além do uso de outros antioxidantes, principalmente para o Creme 02, que foi a formulação mais estável dos géis e cremes. Uma maior concentração de EGCG também pode ser avaliada em estudos futuros uma vez que isso também pode promover uma maior estabilidade conforme observado por KRUPKOVA et al., 2016 e FRASHERI et al., 2020.

Quanto a aplicação com efeito cicatrizante e antioxidante, também serão necessários estudos futuros para sua validação, incluindo aqui estudos *in vitro* e/ou *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível desenvolver diferentes formulações semissólidas com EGCG e caracterizar suas propriedades físico-químicas, obtendo-se pHs dentro da faixa do pH da pele, densidades correspondentes ao esperado para cada tipo de formulação e teores iniciais dentro do esperado.

Foi possível validar o método analítico usado para avaliação do teor de EGCG nas formulações, sendo que o mesmo se mostrou linear, preciso, exato e robusto nas condições e faixa de trabalho ensaiadas.

Através da morfologia foi possível avaliar o estado físico da EGCG nas formulações e verificar se ocorreram modificações após o estudo de Estabilidade Acelerada.

Foi possível avaliar o perfil de liberação *in vitro* de cada tipo de formulação, além de avaliar a cinética de liberação da EGCG em cada uma delas, o que norteia suas aplicações futuras.

Ao avaliar a Estabilidade Acelerada, apesar de melhores resultados de estabilidade que alguns relatados na literatura, somente a Pomada se mostrou estável (com perda inferior a 10% após 6 meses).

7. REFERÊNCIAS

ALLEN JR., Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8ª ed. 2007;

ALVES, Michele. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo chá verde e estudos de liberação e permeação cutânea. Dissertação de Mestrado, 2013;

AVADHANI, Kiran S.; MANIKKATH, Jyothsna; TIWARI, Mradul; CHANDRASEKHAR, Misra; GODAVARTHI, Ashok; VIDYA, Shimoga M.; HARIHARAPURA, Raghu C.; KALTHUR, Guruprasad; UDUPA, Nayanabhirama; MUTALIK, Srinivas. Skin delivery of epigallocatechin 3 gallate (EGCG) and hyaluronic acid loaded nano-transfersomes for antioxidant and anti-aging effects in UV radiation induced skin damage. *Drug Delivery*, 24 (1), 2017;

BARNES, Tanya M.; MIJALJICA, Dalibor; TOWNLEY, Joshua P.; SPADA, Fabrizio; HARRISON, Ian P. Vehicles for Drug Delivery and Cosmetic Moisturizers: Review and Comparison. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 12, 2021;

BERNATONIENE, Jurga; KOPUSTINSKIENE, Dalia Marija. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, v. 23, n. 4, 2018;

BIANCHI, Ana; MARCHETTI, Nicola; SCALIA, Santo. Photodegradation of (-)-epigallocatechin-3-gallate in topical cream formulations and its photostabilization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 56, n. 4, 2011;

BILAL, Muhammad; MEHMOOD, Shahid; IQBAL, Hafiz M. N. The Beast of Beauty: Environmental and Health Concerns of Toxic Components in Cosmetics. *Cosmetics*, v. 7, n. 1, 2020;

BIOTEC. Veículos Funcionais Dermocosméticos, 2019;

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos, nº20/2019, n. 2, 2021;

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos – Uma abordagem sobre os Ensaio Físico e Químicos, 2ª edição, 2008;

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, 2017;

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 318, de 06 de novembro de 2019. Dispõe sobre a Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências, 2019a;

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, 6 ed, Volume I, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019b;

BHATTACHARYA, Sohini; SHERJE, Atul P. Development of resveratrol and green tea sunscreen formulation for combined photoprotective and antioxidant properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 60, 2020;

BUHSE, Lucinda; KOLINSKI, Ricardo; WESTENBERGER, Benjamim; WOKOVICH, Anna; SPENCER, João; CHEN, Chi Wan; TURUJMAN, Saleh; BASAK, Mamta Gautam; KANG, Gil Jong; KIBE, Artur; HEINTZELMAN, Brian; WOLFGANG, Eric. Topical drug classification. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 295, n. 1-2, 2005;

BUNJES, H.; KUNTSCHE, J. Light and Electron Microscopy. In: MÜLLERTZ, A.; PERRIE, Y.; RADES, T. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. *Advances in Delivery Science and Technology*, 2016;

CERBIN-KOCZOROWSKA, Magdalena; WASZYK-NOWACZYK, Magdalena; BAKUN, Pawel; GOSLINSKI, Tomasz; KOCZOROWSKI, Tomasz. Current View on Green Tea Catechins Formulations, Their Interactions with Selected Drugs, and

Prospective Applications for Various Health Conditions. *Applied Sciences*, v. 11, n. 11, 2021;

CHEN, Zhen-Yu; ZHU, Qin Yan; TSANG, David; HUANG, Yu. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 1, 2001;

COELHO, João Paulo Martins; ASSUNÇÃO, Lara Luiza Nunes de; CASTRO, Raine-Clênia Oliveira; CARDOSO, Alessandra Marques; ZAMPIERI, Ana Lúcia Teixeira de Carvalho. Estudo de estabilidade de sistema emulsionado contendo *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) e *Rosa aff. rubiginosa* (Rosaceae). *Revista Fitos*, v. 16, n. 2, 2022;

DAL'BELO, Susi. Avaliação da eficácia fotoprotetora, permeação cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*. Dissertação de Doutorado, 2008;

DAS, Shrayanee; TANWAR, Jyoti; HAMEED, Saif; FATIMA, Zeeshan. Antimicrobial potential of epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a green tea polyphenol. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, v. 2, n. 3, 2014;

DIAS, Fernando Lino. Desenvolvimento e validação de método indicador de estabilidade de formulações farmacêuticas de uso tópico contendo peróxido de benzoíla. Dissertação de Mestrado, 2014;

ENG, Qian Yi; THANIKACHALAM, Punniyakoti V.; RAMAMURTHY, Srinivasan. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Ethno-pharmacology*, v. 210, 2018;

FACCI, Julia; DINIZ, Luan F.; REIS, Naialy F. A.; FERNANDES, Christian. Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. *Química Nova*, v. 43, n. 7, 2020;

FATEMI, Mohammad J.; NIKOOMARAM, Babak; RAHIMI, Amir A. K.; TALAYI, Donya; TAGHAVI, Sherazade; GHAVAMI, Yaser. Effect of green tea on the second degree burn wounds in rats. *Indian Journal of Plastic Surgery*, v. 47, n. 3, 2014;

FERREIRA, Marcia M. C.; RIBEIRO, Fabiana A. L.; MORANO, Sandra C.; SILVA, Lucimara R.; SCHNEIDER, René P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, n. 1, 2008;

FRASHERI, Lorenz; SCHIELEIN, Maximiliano C.; TIZEK, Linda; MIKSCHL, Petra; BIEDERMANN, Tilo; ZINK, Alexandre. Great green tea ingredient? A narrative literature review on epigallocatechin gallate and its biophysical properties for topical use in dermatology. *Phytotherapy Research*, v. 34, n. 9, 2020;

GOMES, F. P.; BOLDO, E. M. Estudos de ensaio de permeação e liberação, in vitro, de formas farmacêuticas semissólidas tópicas para padronização dos requisitos de qualidade em uma indústria farmacêutica. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 11, 2020;

HIIPAKKA, Richard A.; ZHANG, Han-Zhong; DAI, Wei; DAI, Qing; LIAO, Shutsung. Structure–activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, v. 63, n. 6, 2002;

HOFMANN, Elizabeth; SCHWARZ, Anna; FINK, Júlia; KAMOLZ, Lars P.; KOTZBECK, Petra. Modelling the Complexity of Human Skin In Vitro. *Biomedicines*, v. 11, n. 3, 2023;

HU, Caibiao; WANG, Qiang; ZHAO, Guodong; YAO, Wenbing; XIA, Qiang. Improved oral absorption of (-)-epigallocatechin-3-gallate via self-double-emulsifying solid formulation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 118, n. 8, 2015;

HUANG, Ye Wei; ZHU, Qiang- Qiang; YANG, Xiao-Ying; XU, Huan-Huan; SOL, Bin; WANG, Xuan-Jun; SHENG, Jun. Wound healing can be improved by (-)-

epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin-induced diabetic mice. *The FASEB Journal*, v. 33, n. 1, 2019;

ISBRUCKER, R.A.; EDWARDS, J.A.; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; BAUSCH, J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: Dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 5, 2006;

JUREMA, Thatyani Carla Fonseca. Desenvolvimento de formulação cosmética creme corporal contendo suco da casca do abacaxi (*Ananas comosus L. Merrill.*). Trabalho de conclusão de curso, 2019;

KAMRANI, Payvand; HEDRICK, Jamie; MARKS, James G.; ZAENGLEIN, Andrea L. Petroleum jelly: A comprehensive review of its history, uses, and safety. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 90, n. 4, 2024;

KAYAL, Maha El; NASR, Maha; ELKHESHEN, Seham; MORTADA, Nahed. Colloidal (-)-epigallocatechin-3-gallate vesicular systems for prevention and treatment of skin cancer: A comprehensive experimental study with preclinical investigation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 137, n. 1, 2019;

KEEN, Mohammad A.; HASSAN, Iffat. Vitamin E in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, v. 7, n. 4, 2016;

KHAN, Naghma; MUKHTAR, Hasan. Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. *Nutrients*, v. 11, n. 39, 2019;

KIM, Eunji; HWANG, Kyeonghwan; LEE, Jongsung; HAN, Sang Yun; KIM, Eun-Mi; PARK, Junseong; CHO, Jae Youl. Skin Protective Effect of Epigallocatechin Gallate. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1, 2018;

KIM, Yoon Y.; NO, Sun Up; KIM, Min Ho; KIM, Hei Sung; KANG, Hoon; OK, Hyung K.; PARK, Young Min. Effects of topical application of EGCG on testosterone-induced hair loss in a mouse model. *Experimental Dermatology*, v. 20, n. 12, 2011;

KRUPKOVA, Olga; FERGUSON, Stephen J.; WUERTZ-KOZAK, Karin. Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 37, 2016;

KUSUMAWATI, Idha; INDRAYANTO, Gunawan. Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 40, 2013;

KWON, O. S.; HAN, J. H.; YOO, H. G.; CHUNG, J. H.; CHO, K. H.; EUN, H. C.; KIM, K. H. Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine*, v. 14, n. 7-8, 2007;

LAMBERT, Joshua D.; KIM, Dou Hwan; ZHENG, Ruijin; YANG, Chung S. Transdermal delivery of (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea polyphenol, in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, n. 5, 2006;

LI, Min; XU, Jingxing; SHI, Tongxin; YU, Haiyang; BI, Jianping; CHEN, Guanzhi. Epigallocatechin-3-gallate augments therapeutic effects of mesenchymal stem cells in skin wound healing. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 43, n. 11, 2016;

LI, Na; TAYLOR, Lynne S.; FERRUZZI, Mario G.; MAUER, Lisa J. Color and chemical stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in solution and solid states. *Food Research International*, v. 53, n. 2, 2013;

LI, Qinghua; SONG, Huijuan; LI, Shuangyang; HU, Pengbo; ZHANG, Chuangnian; ZHANG, Ju; FENG, Zujian; KONG, Deling; WANG, Weiwei; HUANG, Pingsheng. Macrophage metabolism reprogramming EGCG-Cu coordination capsules delivered in polyzwitterionic hydrogel for burn wound healing and regeneration. *Bioactive Materials*, v. 29, 2023;

LIN, Tzu-Kai; ZHONG, Lily; SANTIAGO, Juan L. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1, 2018;

LOURENÇO, Ana Rita N. Administração Tópica de Fármacos – Das restrições aos desafios. Dissertação de Mestrado, 2013.

LU, Chi-Cheng; YEN, Gow-Chin. Antioxidative and anti-inflammatory activity of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, v. 2, 2015;

MAYBA, Julia N.; GOODERHAM, Melinda J. A Guide to Topical Vehicle Formulations. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 22, n. 2, 2018;

MELO, Cilene A. S.; DOMINGUES, Robson J. S.; LIMA, Anderson B. Elaboração de géis e análise de estabilidade de medicamentos. Coleção Saúde e Vida, EDUEPA, 2018;

NADA, A.H.; ZAGHLOUL, A.A.; HEDAYA, M.A.; KHATTAB, I.S. Stability of Vitamin E and Vitamin E Acetate containing Cosmetic Preparations. *Journal of Global Pharma Technology*, v. 4, n. 3, 2012;

NIKKO, Mehdi; REGENSTEIN, Joe M.; GAVLIGHI, Hassan A. Antioxidant and Antimicrobial Activities of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its Potential to Preserve the Quality and Safety of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 17, n. 3, 2018;

OSBORNE, David W. Review of Changes in Topical Drug Product Classification. *Pharmaceutical Technology*, v. 32, n. 10, 2008;

PAARAKH, M. P.; JOSE, Preethy A.; SETTY, CM; CHRISTOPER, G.V. Peter. Release Kinetics – Concepts and Applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, v. 8, 2018;

PANICO, A.; SERIO, F.; BAGORDO, F.; GRASSI, T.; IDOLO, A.; DE GIORGI, M.; GUIDO, M.; CONGEDO, M.; DE DONNO, A. Skin safety and health prevention: an overview of chemicals in cosmetic products. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, v. 60, n. 1, 2019;

PARK, Gyuman; YOUN, Byung Sun; MOON, Jai-Hee; KIM, Bona; JUM, Eun Kyoung; OH, Sejong; KIM, Hyunggee; SONG, Hea Joon; NOH, Joo Young; OH, Chilwan; YOU, Seungkwon. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Collagen Production and Proliferation in Keloid Fibroblasts via Inhibition of the STAT3-Signaling Pathway. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 128, n. 10, 2008;

PAHWA, Roma; GOYAL, Amandeep; JIALAL, Ishwarlal. Chronic Inflammation. *StatPearls*, 2023. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173>. Acesso em: 03 de dezembro de 2023.

PETRILLI, Raquel; LOPEZ, Renata F. V. Physical methods for topical skin drug delivery: concepts and applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, edição especial, 2018;

PHARMASPECIAL. Informativo Técnico: Aristoflex® AVC, 2018;

PRAKOESWA, C. R. S.; RN OKTAVIYANTIA, R. N.; INDRAMAYAA, D. M.; HENDRADRIB, E.; SAWITRIA, S.; ASTARIA, L.; DAMAYANTIAE, D.; LISTIAWANA, M. E. U. Efficacy of topical epigallocatechin gallate (EGCG) 1% on the healing of chronic plantar ulcers in leprosy. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 21, n. 8, 2021;

PRONIUK, Stefan. Development of a topical epigallocatechin gallate (EGCG) Formulation. *Dissertação de Doutorado*, 2000;

PRONIUK, Stefan; LIEDERER, Bianca M.; BLANCHARD, James. Preformulation Study of Epigallocatechin Gallate, a Promising Antioxidant for Topical Skin Cancer Prevention. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, n. 1, 2002;

RAGHAVAN, L.; BROWN, M.; MICHNIAK-KOHN, B.; NG, S.; SAMMETA, S. In Vitro Release Tests as a Critical Quality Attribute in Topical Product Development. In: LANGLEY, N.; MICHNIAK-KOHN, B.; OSBORNE, D. (eds) *The Role of Microstructure in Topical Drug Product Development*. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, v. 36, 2019;

RAO, TENTU NAGESWARA. Validation of Analytical Methods. In: Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches, 2018;

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz G.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina S. F.; MELO, Lúcio Flávio C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, 2004;

SALAHELDIN, Taher A.; ADHMI, Vaqar M.; FUJIOKA, Kazutoshi; MUKHTAR, Hasan; MOUSA, Shaker A. Photochemoprevention of ultraviolet Beam Radiation-induced DNA damage in keratinocytes by topical delivery of nanoformulated Epigallocatechin-3-gallate. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 44, 2022;

SAJADIMAJD, Soraya; BAHRAMSOLTANI, Roodabeh; IRANPANA, Amin; PATRA, Jayanta K.; DAS, Gitishree; GOUDA, Sushanto; RAHIMI, Roja; REZAEIAMIRI, Elnaz; CAO, Hui; GIAMPIERI, Francesca; BATTINO, Maurizio; TUNDIS, Rosa; CAMPOS, Maria G.; FARZAEI, Mohammad H.; XIAO, Jianbo. Advances on Natural Polyphenols as Anticancer Agents for Skin Cancer. *Pharmacological Research*, v. 151, n. x, 2020;

SCALIA, Santo; MARCHETTI, Nicola; BIANCHI, Ana. Comparative Evaluation of Different Co-Antioxidants on the Photochemical- and Functional-Stability of Epigallocatechin-3-gallate in Topical Creams Exposed to Simulated Sunlight. *Molecules*, v. 18, n. 1, 2013;

SCALIA, Santo; TROTTA, Valentina; BIANCHI, Ana. In vivo human skin penetration of (-)-epigallocatechin-3-gallate from topical formulation. *Acta Pharmaceutica*, v. 64, n. 2, 2014;

SCANES, Colin G. Animal Attributes Exploited by Humans (Nonfood Uses of Animals). In: SCANES, Colin G.; TOUKHSATI, Samia R. *Animals and Human Society*. Academic Press, 2018;

SCHMITZ, Wanderlei; SAITO, Alexandre Y.; ESTEVÃO, Dirceu; SARIDAKIS, Halha O. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 26, n. 2, p.119-130, 2005;

SCHMITT, Priscila O.; FISCHER, Ana Flávia; SILVA, Ruth M. L.; CRUZ, Alexandre B. Compatibility and efficiency of preservatives in emulsive cosmetics containing high surfactant content. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, 2022;

SECRETAN, Philippe-Henri; THIRION, Olivier; YAYÉ, Hassane Sadou; DAMY, Thibaud; ASTIER, Alain; PAUL, Muriel; DO, Bernard. Simple Approach to Enhance Green Tea Epigallocatechin Gallate Stability in Aqueous Solutions and Bioavailability: Experimental and Theoretical Characterizations. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 12, 2021;

SHARMA, Shivangi; AHMAD, Usama; AKHTAR, Juber; ISLAM, Anas; KHAN, Mohd M.; RIZVI, Naureen. *The Art and Science of Cosmetics: Understanding the Ingredients. Cosmetic Products and Industry - New Advances and Applications*, 2023;

SHIN, S.; WANG, L. X.; ZHENG, X. Q.; XIANG, L. P.; LIANG, Y. R. Protective Effect of (-)-Epigallocatechin Gallate against Photo-Damage Induced by Ultraviolet A in Human Skin Fibroblasts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 7, 2014.

SILVA, S.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA, A. S.; MAGALHÃES, C.; SOUZA, M. E.; PINTO, M.; SOUZA LOBO, J.M.; ALMEIDA, I. F. Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics, *International Journal of Cosmetic Science*, v. 41, n. 4, 2019;

SPADA, Fabrizio; MIJALJICA, Dalibor; HARRISON, Ian P. Skin Cleansing without or with Compromise: Soaps and Syndets. *Molecules*, v. 27, n. 6, 2022.

SYED, Farhatullah; BAGABIR, Rania A.; PAUS, Ralf; BAYAT, Ardeshir. Ex vivo evaluation of antifibrotic compounds in skin scarring: EGCG and silencing of PAI-1 independently inhibit growth and induce keloid shrinkage. *Laboratory Investigation*, v. 93, 2013;

SZALAY, Sarah de; WERTZ, Filipe W. Protective Barriers Provided by the Epidermis. *International Journal of Molecular Science*, v. 24, n. 4, 2023;

THEORET, Christine L.; STASHAK, Ted S. Chapter 19 - Integumentary System: Wound Healing, Management, and Reconstruction. In: ORSINI, James A.; DIVERS, Thomas J. (eds). *Equine Emergencies, Treatment and Procedures*, 2014;

UNGARALA, Ramakrishna; SINHA, Sukesh N. SUNDER, R. Shyam. Ultra high-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) method development and validation for the identification of oxidized product of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG). *Journal of Chromatographic Science*, v. 61, n. 2, 2023;

VAN HEUGTEN, A. J. P. Ointments: towards the understanding of structure, stability and processing. Tese de doutorado, 2018;

WANG, Shuzhen; LI, Zhiliang; MA, Yuting; LIU, Yan; LIN, Chi-Chen; LI, Shiming; ZHAN, Jianfeng; HO, Chi-Tang. Immunomodulatory Effects of Green Tea Polyphenols. *Molecules*, v. 26, n. 12, 2021;

WRÓBLEWSKA, Magdalena; WINNICKA, Katarzyna. Composition development and *in vitro* evaluation of o/w emulsions based on natural emulsifier Olivem 1000 as tea tree oil carriers. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, v. 79, n. 5, 2022;

XU, Fa-Wei; LV, Ying-Li; ZHONG, Yu-Fan; XUE, Ya-Nan; WANG, Yong; ZHANG, Li-Yun; HU, Xian; TAN, Wei-Qiang. Beneficial Effects of Green Tea EGCG on Skin Wound Healing: A Comprehensive Review. *Molecules*, v. 26, n. 20, 2021;

XU, Yong-Quan; XU, Peigen; ZHOU, Weibiao. Combined effect of pH and temperature on the stability and antioxidant capacity of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system. *Journal of Food Engineering*, v. 250, 2019;

YEOH, Thean; MA, Lisa; BADRUDDOZA, Abu Zayed; SHAH, Jaymin; ZHANG, Shawn. Semisolid Pharmaceutical Product Characterization Using Non-invasive X-ray

Microscopy and AI-Based Image Analytics. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 24, n. 46, 2022;

WU, Ke; YEOH, Thean; HSIEH, Yi-Ling; OSBORNE, David W. Quality Assessment of API in Semisolid Topical Drug Products. In: LANGLEY, N.; MICHNIAK-KOHN, B.; OSBORNE, D. (eds) *The Role of Microstructure in Topical Drug Product Development*. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, v. 36, 2019;

ZAGO, Gabriela. *Estudos de Pré-Formulação e Desenvolvimento de Cosméticos Linha Marrakech*. Trabalho de conclusão de curso. 2017;

ZAWANI, Mazlan; FAUZI, Busra. Epigallocatechin Gallate: The Emerging Wound Healing Potential of Multifunctional Biomaterials for Future Precision Medicine Treatment Strategies. *Polymers* v. 13, n. 21, 2021;

ZHANG, Shuangshuang; LIU, Xiangdong; MEI, Lihong; WANG, Hongfeng; FANG, Fang. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, v. 16, n. 1, 2016;

ZHAO, Tiantian; LI, Chao; WANG, Shuai; SONG, Xinqiang. Green Tea (*Camellia sinensis*): A Review of Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Molecules*, v. 27, n. 12, 2022.

ZILLICH, O. V.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; HASENKOPF, K; EISNER, P.; KERSCHER, M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsion. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 2013.

8. APÊNDICES

Apêndice A: Formulações no tempo zero e após 3 e 6 meses de Teste de Estabilidade



(a)



(b)



(c)

Figura 31: Formulações Gel 01, Gel 02, Creme 01, Creme 02 e Pomada (da esquerda para a direita), (a) no tempo zero, (b) após 3 meses e (c) após 6 meses de Teste de Estabilidade.

Apêndice B: Dados complementares de densidade e pH das formulações.**Tabela 13:** Desvios Padrões e Coeficientes de Variação obtidos para densidade das formulações a 25 °C com 0, 3 e 6 meses (n = 3).

Formulação	Tempo zero		3 meses		6 meses	
	DP (g.mL ⁻¹)	CV (%)	DP (g.mL ⁻¹)	CV (%)	DP (g.mL ⁻¹)	CV (%)
Gel 01	0,0026	0,26	0,0024	0,234	0,0022	0,215
Gel 02	0,0014	0,14	0,0015	0,152	0,0014	0,139
Creme 01	0,0020	0,20	0,0029	0,291	0,0017	0,170
Creme 02	0,0065	0,66	0,0005	0,046	0,0029	0,290
Pomada	0,0074	0,86	0,0143	1,675	0,0261	3,062

Tabela 14: Desvios Padrões e Coeficientes de Variação obtidos para pH das formulações com 0, 3 e 6 meses (n = 3).

Formulação	Tempo zero		3 meses		6 meses	
	DP (g.mL ⁻¹)	CV (%)	DP (g.mL ⁻¹)	CV (%)	DP (g.mL ⁻¹)	CV (%)
Gel 01	0,04	0,67	0,14	2,59	0,12	2,34
Gel 02	0,03	0,69	0,09	1,90	0,07	1,71
Creme 01	0,03	0,50	0,16	3,80	0,17	4,03
Creme 02	0,03	0,65	0,14	3,07	0,21	4,62

Tabela 15: Desvios Padrões e Coeficientes de Variação obtidos para o teor de EGCG obtido para cada formulação após 1, 3 e 6 meses (n = 3).

Formulação		Gel 01	Gel 02	Creme 01	Creme 02	Pomada
Tempo						
1 mês	DP	0,002	0,035	0,004	0,009	0,034
	CV (%)	0,404	5,101	0,710	1,175	3,941
3 meses	DP	0,009	0,017	0,005	0,028	0,004
	CV (%)	2,473	2,781	0,920	4,006	0,516
6 meses	DP	0,013	0,012	0,028	0,007	0,025
	CV (%)	4,446	2,354	5,884	1,041	3,031

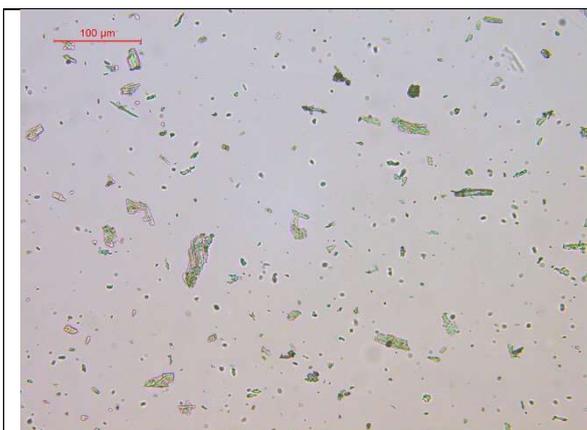
Apêndice C: Imagens obtidas por Microscopia Ótica

Figura 32: EGCG $\geq 90\%$ dispersa em óleo mineral com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

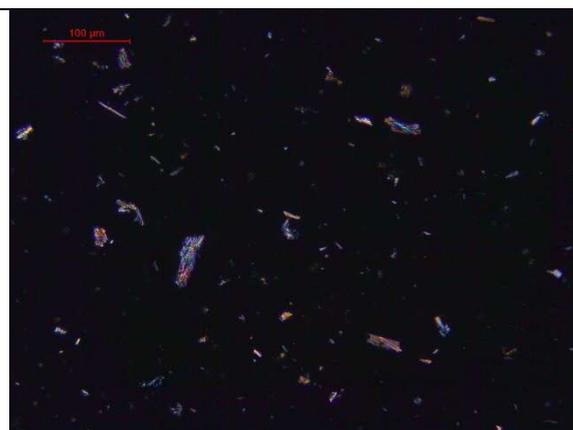


Figura 33: EGCG $\geq 90\%$ dispersa em óleo mineral com ampliação de 200x – com luz polarizada.

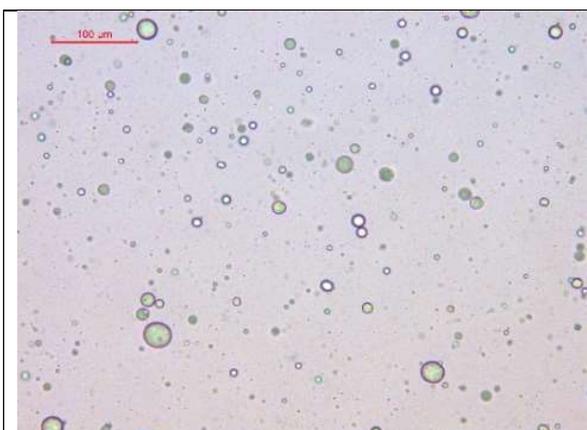


Figura 34: Branco Gel 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.



Figura 35: Branco Gel 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

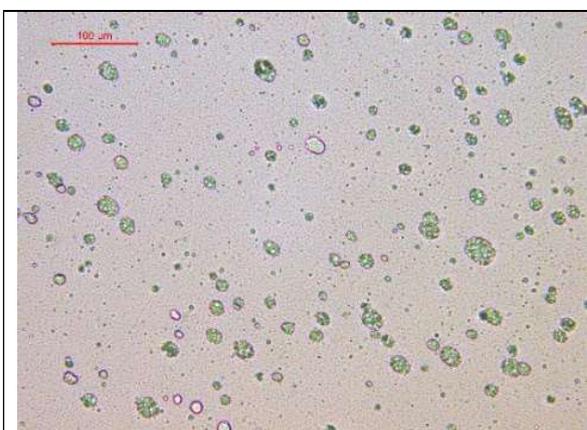


Figura 36: Formulção Gel 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.



Figura 37: Formulção Gel 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

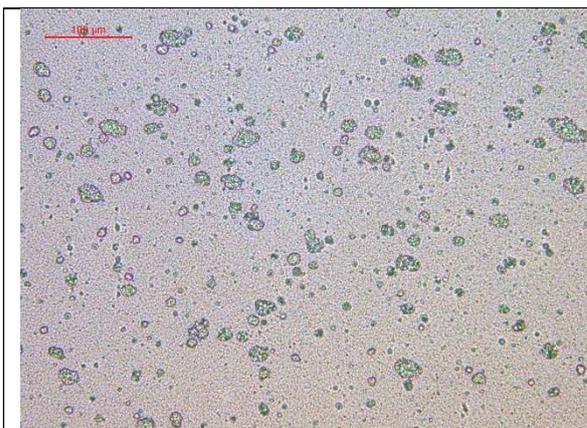


Figura 38: Formulação Gel 01 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

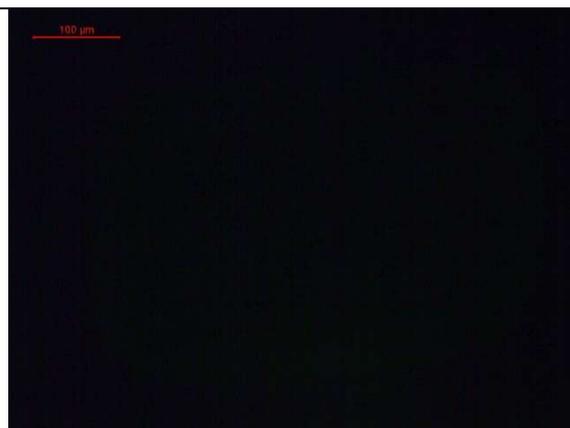


Figura 39: Formulação Gel 01 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.

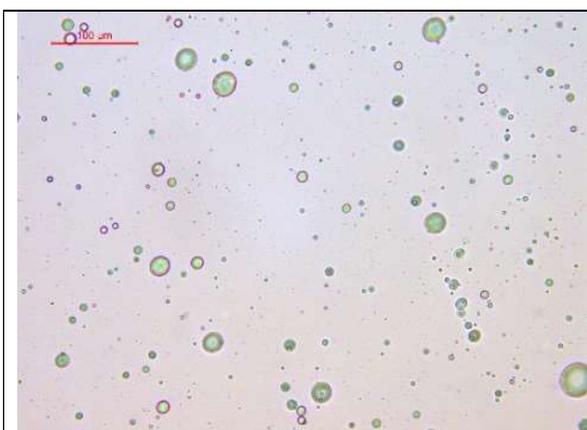


Figura 40: Branco Gel 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

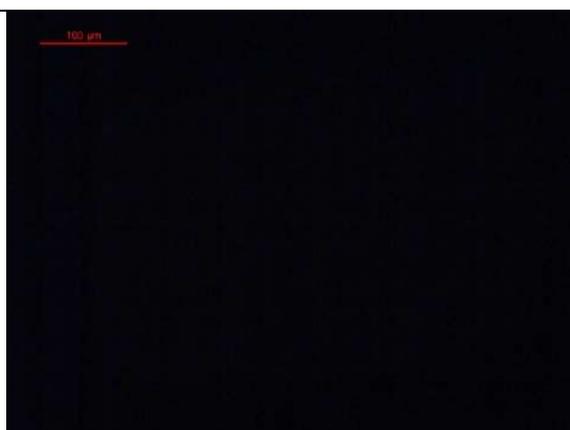


Figura 41: Branco Gel 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

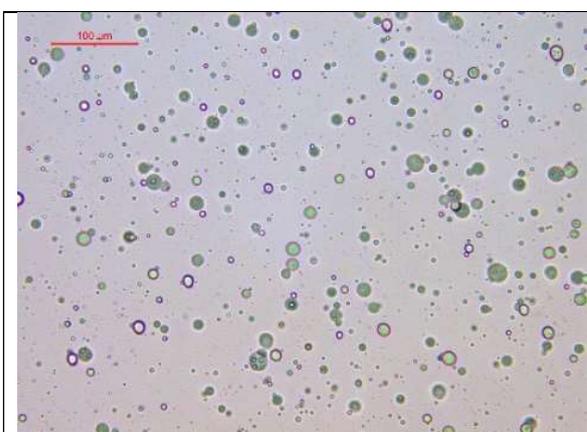


Figura 42: Formulação Gel 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

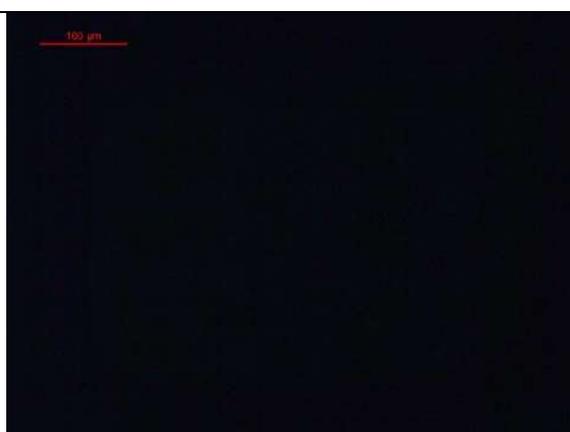


Figura 43: Formulação Gel 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

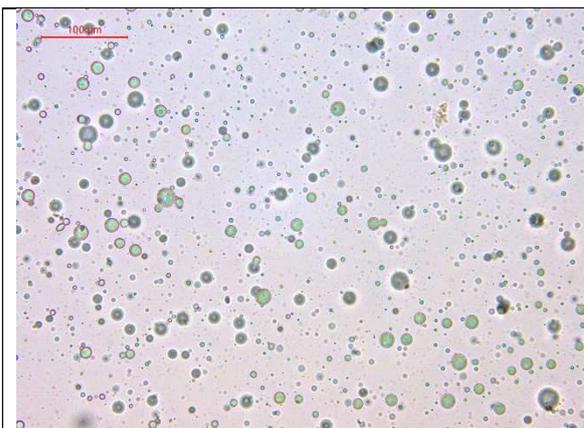


Figura 44: Formulação Gel 02 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

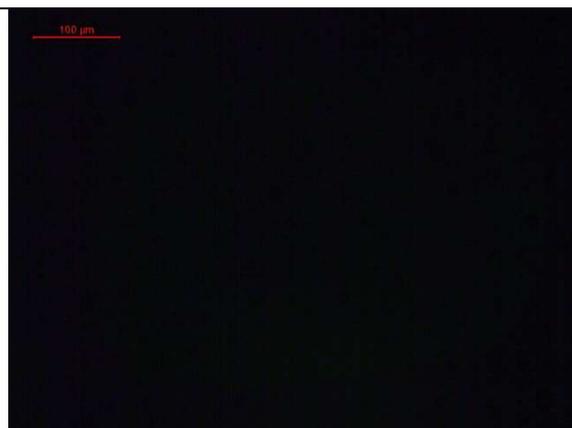


Figura 45: Formulação Gel 02 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.

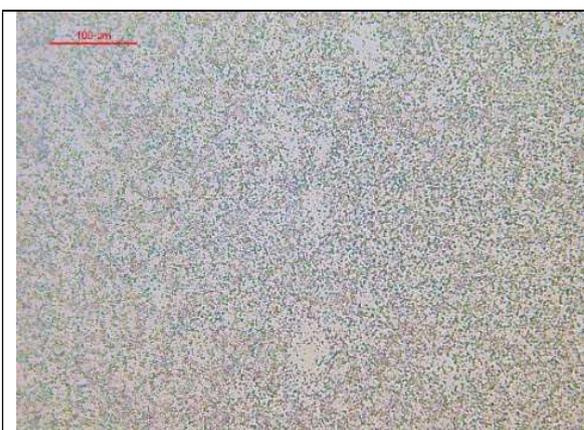


Figura 46: Branco Creme 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

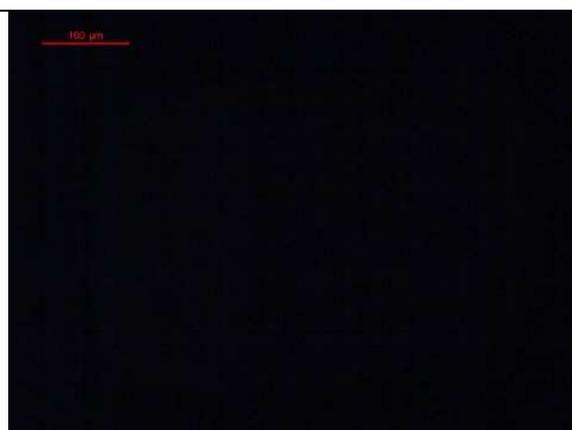


Figura 47: Branco Creme 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

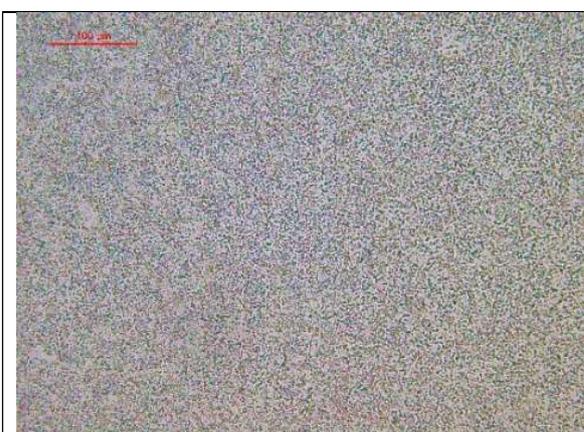


Figura 48: Formulação Creme 01 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

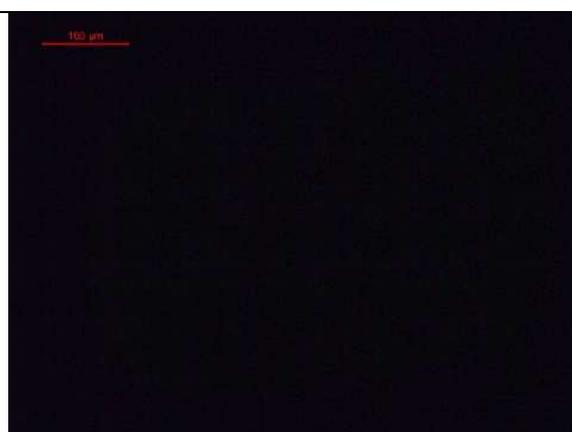


Figura 49: Formulação Creme 01 com ampliação de 200x – com luz polarizada.



Figura 50: Formulação Creme 01 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

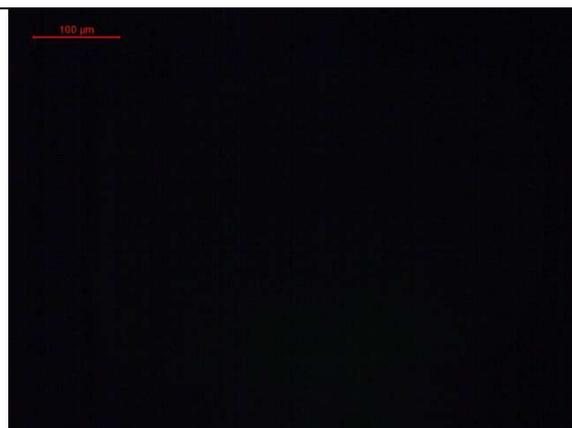


Figura 51: Formulação Creme 01 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.

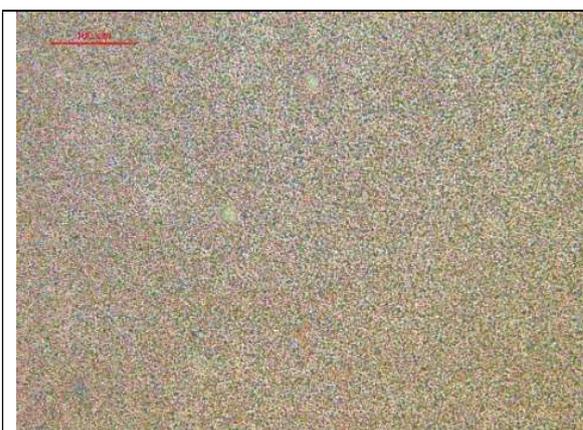


Figura 52: Branco Creme 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.



Figura 53: Branco Creme 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

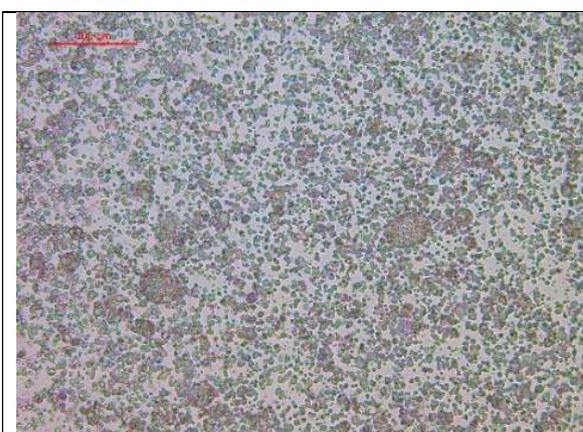


Figura 54: Formulação Creme 02 com ampliação de 200x – sem luz polarizada.



Figura 55: Formulação Creme 02 com ampliação de 200x – com luz polarizada.

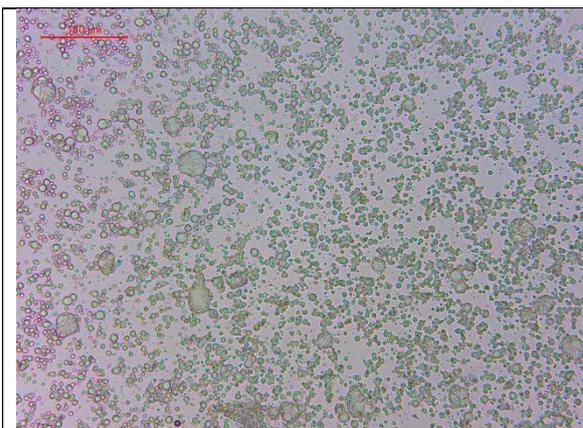


Figura 56: Formulação Creme 02 após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

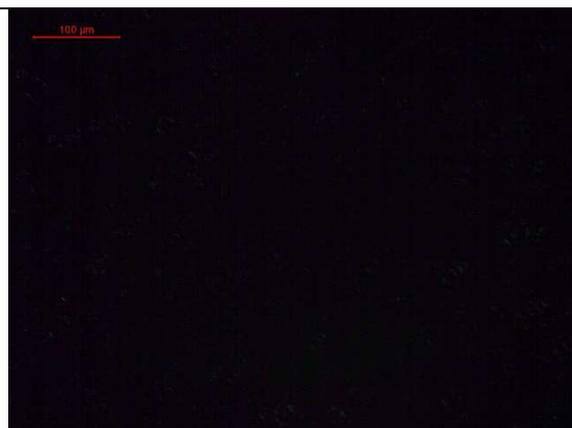


Figura 57: Formulação Creme 02 após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.

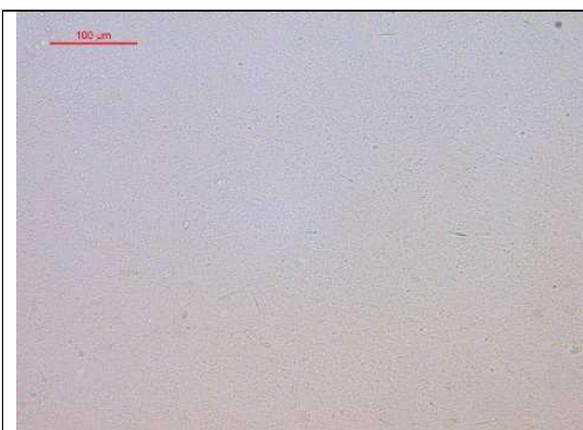


Figura 58: Branco Pomada com ampliação de 200x – sem luz polarizada.



Figura 59: Branco Pomada com ampliação de 200x – com luz polarizada.



Figura 60: Formulação Pomada com ampliação de 200x – sem luz polarizada.



Figura 61: Formulação Pomada com ampliação de 200x – com luz polarizada.



Figura 62: Formulação Pomada após 6 meses com ampliação de 200x – sem luz polarizada.

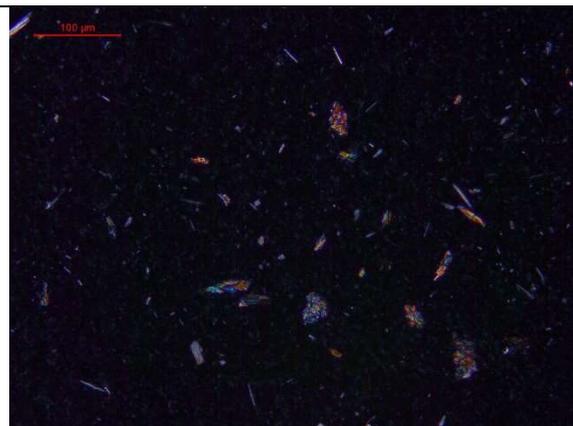


Figura 63: Formulação Pomada após 6 meses com ampliação de 200x – com luz polarizada.

Apêndice D: Cromatogramas das formulações no tempo zero e após Teste de Estabilidade Acelerada (6 meses).

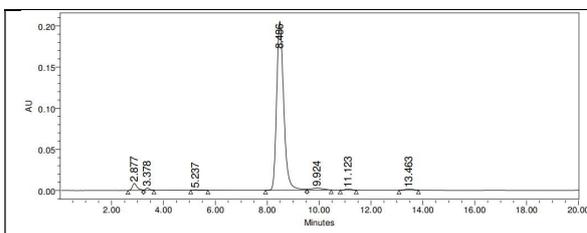


Figura 64: Cromatograma do Gel 01 no tempo zero.

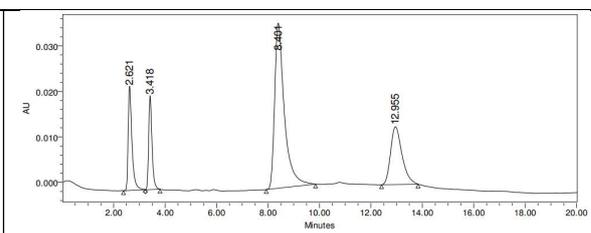


Figura 65: Cromatograma do Gel 01 após 6 meses.

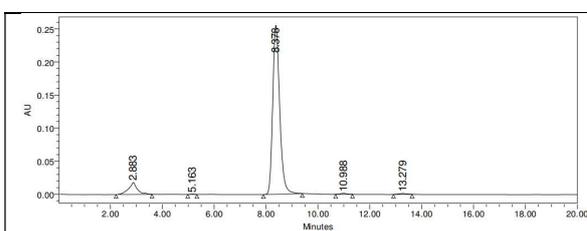


Figura 66: Cromatograma do Gel 02 no tempo zero.

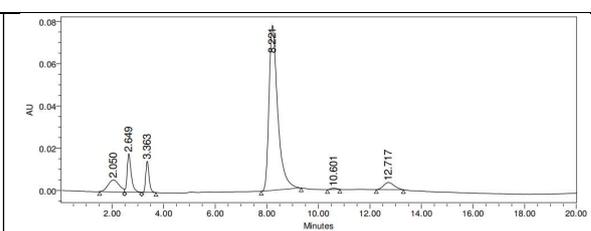


Figura 67: Cromatograma do Gel 02 após 6 meses.

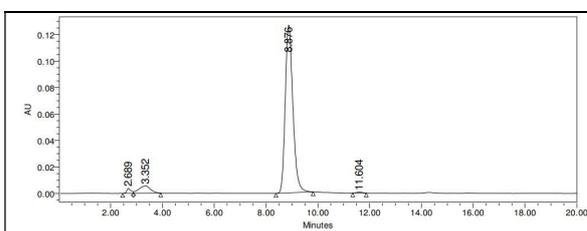


Figura 68: Cromatograma do Creme 01 no tempo zero.

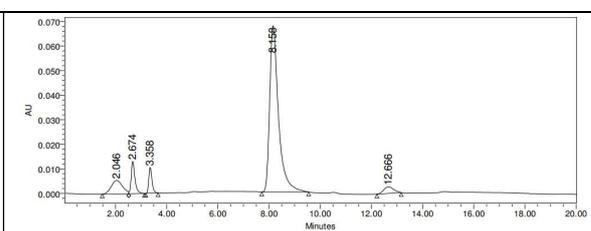


Figura 69: Cromatograma do Creme 01 após 6 meses.

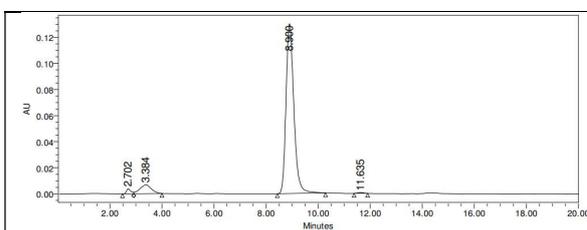


Figura 70: Cromatograma do Creme 02 no tempo zero.

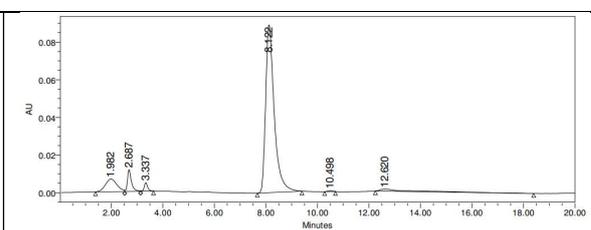


Figura 71: Cromatograma do Creme 02 após 6 meses.

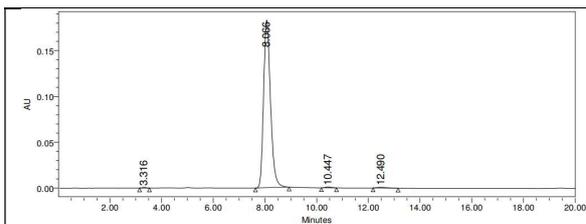


Figura 72: Cromatograma da Pomada no tempo zero.

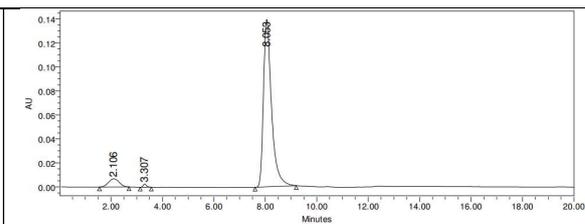


Figura 73: Cromatograma do Pomada após 6 meses.

9. ANEXOS

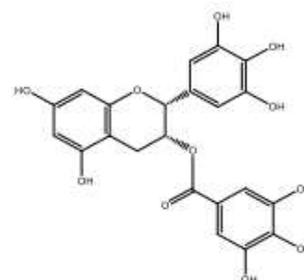
Supelco®

www.sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

EPIGALLOCATECHIN GALLATE

Product no.: PHR1333-1G
Lot no.: LRAC4432
Description of CRM: White Powder
Expiry date: 31 October 2023
Storage: Refrigerate/Protect from Light
Certificate version: LRAC4432.1 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigmaaldrich.com for the most current version.)
Chemical formula: C₂₂H₁₈O₁₁
Molecular mass: 458.4
CAS No.: 989-51-5



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty U , $U=k \cdot u$ ($k=$) (Mass Balance/basis)
EPIGALLOCATECHIN GALLATE	92.4 % $U_{\text{CRM}} = \pm 0.3 \%$, $k = 2.57$ (Mass Balance/as is basis)

Metrological traceability: Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

Measurement method: Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

Intended use: Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.

Minimum sample size: 20 mg

Instructions for handling and correct use: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

Health and safety information: All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

Accreditation: Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

Certificate issue date: 31 October 2019



[Andy Ommen; Quality Control]

[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd., Laramie, WY 82070, USA;
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; www.sigmaaldrich.com
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

