



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MICHELE CAMPOS ALVES

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo chá verde (*Camellia sinensis*) e estudos de liberação e permeação cutânea

**Juiz de Fora
2013**

MICHELE CAMPOS ALVES

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo chá verde (*Camellia sinensis*) e estudos de liberação e permeação cutânea

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão
Co-orientadora: Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo

**Juiz de Fora
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Alves, Michele Campos.

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo chá verde (*Camellia sinensis*) e estudos de liberação e permeação cutânea / Michele Campos Alves. -- 2013.

96 p. : il.

Orientador: Marcos Antônio Fernandes Brandão

Coorientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. *Camellia sinensis*. 2. Controle de Qualidade. 3. Cromatografia em Fase Líquida. 4. Liberação do Fármaco In Vitro. 5. Permeação Cutânea. I. Brandão, Marcos Antônio Fernandes, orient. II. Raposo, Nádia Rezende Barbosa, coorient. III. Título.

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que referenciada.

MICHELE CAMPOS ALVES

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo chá verde (*Camellia sinensis*) e estudos de liberação e permeação cutânea

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Magda Narciso Leite
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Fabíola Dutra Rocha (Suplente)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Denis Pires de Lima (Suplente)
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

**Juiz de Fora
2013**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, pela saúde e por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.

À minha família por me dar o suporte necessário nesta caminhada.

Aos colegas e amigos com quem tive a imensa satisfação de compartilhar as alegrias e as dificuldades do mestrado, especialmente a Livia e Kamilla, minhas eternas carrapatas.

Ao professor Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão pela paciência, orientação, ensinamento, apoio e amizade que dedicou durante esse tempo de convivência. Acima de tudo agradeço pela confiança e pelo incentivo.

A Hudson Polonini, pela amizade e pelos momentos de companheirismo durante a graduação e o mestrado.

À Priscila Almeida, minha aluna de iniciação científica, que sempre foi dedicada, amiga e companheira em todos os nossos momentos de trabalho.

A Urias, Felipe e a todos os monitores de Química Farmacêutica, pela ótima convivência e amizade.

À Profa. Nádia pelo imenso carinho e por ser uma co-orientadora tão presente e sempre disposta a me ajudar e dividir seus conhecimentos.

A toda a equipe do laboratório NÍQUA por me receber de braços abertos. Durante todo o tempo tive a presença de boas companhias, tanto para o trabalho quanto para celebrar os bons momentos da vida.

A toda a equipe Ortofarma, em especial a: Sharlene, Edson, Alex, Fernando, Livia, Talyta, Rosana, Roberta, Lucas, Adelino e Acácio, que participaram de alguma forma do trabalho, principalmente no auxílio durante meus treinamentos em cromatografia e validação analítica. Muito obrigada por tudo!

RESUMO

ALVES, Michele Campos. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de formas farmacêuticas contendo chá verde (*Camellia sinensis*) e estudos de liberação e permeação cutânea.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

Atualmente, existe um interesse crescente nas potenciais atividades de proteção à saúde do chá verde (*Camellia sinensis*), que é caracterizado pela presença de grandes quantidades de polifenóis, sendo a maioria deles representados por catequinas. Galato de epigallocatequina (EGCG) é o componente mais abundante e ativo, sendo geralmente utilizado como biomarcador junto com a cafeína (CAF) e o ácido gálico (AG). EGCG é pouco absorvido no trato gastrointestinal e está sujeito ao metabolismo de primeira passagem pelo fígado quando administrado por via oral, forma mais comumente utilizada para o chá verde. Um sistema transdérmico poderia então ser um mecanismo de liberação alternativo. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo: desenvolver e validar métodos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação simultânea de EGCG, CAF e AG em cápsulas e emulsões contendo extrato seco de chá verde e determinar na emulsão a liberação de EGCG *in vitro* e sua permeação cutânea em pele humana, utilizando modelo *ex vivo*. Os métodos utilizaram CLAE de fase inversa e detecção em arranjo de fotodiodo. A separação foi atingida utilizando as seguintes condições: coluna octadecilsilano; fase móvel composta por água, etanol, acetato de etila e ácido acético (84:12:3:1, v/v/v/v); temperatura do compartimento para a coluna de 35 °C; e um sistema de fluxo por gradiente, alternando o fluxo entre 0.7 e 1.4 mL.min⁻¹. Os compostos foram separados em 35 min. Os métodos foram simples, seletivos, precisos, exatos e rápidos; e mostraram a confiabilidade necessária para que fossem utilizados no controle de qualidade das formulações testadas. O método para a emulsão provou ser adequado para os ensaios de liberação *in vitro* e de permeação *ex vivo*. A taxa de liberação *in vitro* de EGCG foi de 8896.01 mg.cm⁻², seguindo o modelo de pseudo-primeira ordem, também conhecido como modelo de Higuchi. O teste de permeação *ex vivo* mostrou que EGCG não é capaz de exercer suas atividades biológicas sistemicamente quando utilizado a partir da emulsão testada, permanecendo apenas no estrato córneo.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*. Controle de Qualidade. Cromatografia em Fase Líquida. Validação. Liberação do Fármaco *In Vitro*. Permeação Cutânea.

ABSTRACT

Currently, there is an increased interest in potential health-protective activities of green tea (*Camellia sinensis*), which is characterized by the presence of polyphenols huge amounts, being the majority of them catechins. Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) is the most abundant and active component, been generally used as biomarker together with caffeine (CAF) and gallic acid (GA). EGCG is poorly absorbed in the gastrointestinal tract and is subject to first-pass metabolism by the liver when administered orally, the most widely used forms of green tea. A transdermal system could then be an alternative delivery mechanism. In this light, the present work aimed: to develop and validate high performance liquid chromatography (HPLC) methods for simultaneous quantification of EGCG, CAF and GA in emulsions and capsules containing dry extract green tea and to determine in emulsion the *in vitro* EGCG release and its human skin cutaneous permeation using *ex vivo* model. The methods used reversed phase HPLC and photodiode array detection. Separation was achieved using the follow conditions: octadecylsilyl column; mobile phase composed by water, ethanol, ethyl acetate and acetic acid (84:12:3:1, v/v/v/v); column temperature of 35 °C; and flow gradient system, alternating flow between 0.7 and 1.4 mL.min⁻¹. The compounds were separated within 35 min. The methods were simple, selective, precise, accurate and fast; and provide the reliability required for them to be used for quality control of tested formulations. The emulsion method proved to be suitable both for *in vitro* release and *ex vivo* permeation. EGCG *in vitro* release rate was found to be 8896.01 µg.cm⁻², following pseudo-first-order model, also known as Higuchi's model. *Ex vivo* permeation testing showed that EGCG is not able to exert its biological activities systemically when used from tested emulsion, remaining only in the stratum corneum.

Keywords: *Camellia sinensis*. Quality Control. Chromatography, Liquid. Validation. *In Vitro* Drug Release. Cutaneous Permeation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Espécie de <i>Camellia sinensis</i>	16
Figura 2 –	Produtos formados a partir da oxidação e polimerização de catequinas.....	17
Figura 3 –	Estruturas dos principais compostos presentes no chá verde.....	19
Figura 4 –	Estrutura básica dos flavonoides.....	20
Figura 5 –	Biossíntese das catequinas.....	22
Figura 6 –	Cromatogramas obtidos a partir de métodos de análise para a determinação simultânea de componentes do chá verde por CLAE de fase inversa.....	31
Figura 7 –	As camadas da pele e suas vias de penetração.....	33
Figura 8 –	Célula de difusão de Franz.....	40
Figura 9 –	Manipulação da emulsão de chá verde.....	43
Figura 10 –	Diluições realizadas para a obtenção das soluções padrão e amostra nas concentrações de 80, 90, 100, 110 e 120%.....	44
Figura 11 –	Montagem da parte superior da célula de Franz.....	54
Figura 12 –	Limpeza da pele humana.....	56
Figura 13 –	Cromatogramas tridimensionais das soluções dos padrões, obtidos através da varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm (A) e 245 a 400 nm (B).....	58
Figura 14 –	Perfis cromatográficos obtidos no teste de especificidade do método para cápsula.....	61
Figura 15 –	Perfis cromatográficos obtidos no teste de especificidade do método para emulsão.....	62
Figura 16 –	Soluções obtidas a partir do extrato seco e dos produtos A, B e C analisados.....	66
Figura 17 –	Cromatogramas obtidos a partir das análises dos produtos A, B e C.....	67
Figura 18 –	Soluções obtidas durante a seleção do meio receptor.....	68
Gráfico 1 –	Perfil de liberação de EGCG. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n = 6).....	69
Gráfico 2 –	Balanço de massas da permeação de EGCG.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resumo de métodos utilizados para a determinação simultânea de componentes do chá verde por CLAE de fase inversa.....	30
Tabela 2 –	Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental realizado na otimização dos métodos para cápsula e emulsão	47
Tabela 3 –	Composição dos meios biorelevantes utilizados para os testes de liberação e de permeação de EGCG.....	52
Tabela 4 –	Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições analíticas do método para cápsula.....	59
Tabela 5 –	Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições analíticas do método para emulsão.....	59
Tabela 6 –	Condições estabelecidas para os métodos de análise de cápsula e emulsão.....	60
Tabela 7 –	Resultados para os testes de linearidade, LD e LQ.....	63
Tabela 8 –	Resultados para os testes de precisão e exatidão.....	64
Tabela 9 –	Fatores do planejamento experimental conduzido para o estudo da robustez e seus respectivos efeitos e erros-padrão calculados para o teor de EGCG.....	64
Tabela 10 –	Resultados para o teste de estabilidade das soluções analíticas	65
Tabela 11 –	Teores calculados para todos os produtos testados e as especificações para cada analito.....	66
Tabela 12 –	Resultados da solubilidade máxima de EGCG nos meios receptores logo após o preparo.....	68
Tabela 13 –	Modelagem matemática para a cinética de liberação <i>in vitro</i> de EGCG.....	69
Tabela 14 –	Balanço de massas da permeação de EGCG.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona sintase
CoA	Coenzima A
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
C	Catequina
C18	Octadecilsilano
CAF	Cafeína
CG	Galato de catequina
DAD	Detector de arranjo de fotodiodo
EC	Epicatequina
EGC	Epigallocatequina
ECG	Galato de epicatequina
EGCG	Galato de epigallocatequina
EUA	Estados Unidos da América
GC	Galocatequina
GCG	Galato de galocatequina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
SQT	Substância Química de Trabalho
TR	Tempo de retenção
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
PAL	Fenilalanina amônia liase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Chás	15
2.1.1	Chás obtidos a partir de <i>Camellia sinensis</i>	15
2.1.1.1	Chá verde e seus constituintes	18
2.1.1.1.1	A bioquímica das catequinas	20
2.1.1.1.2	Atividades farmacológicas	23
2.1.1.1.3	Efeitos adversos	25
2.2	Controle de qualidade de fitoterápicos	26
2.2.1	Métodos analíticos para a quantificação dos componentes químicos do chá verde	27
2.2.1.1	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência	27
2.3	A pele como via de administração tópica para os fármacos	32
2.3.1	A pele	32
2.3.2	A absorção de fármacos na pele	34
2.3.3	Liberação <i>in vitro</i>	38
2.3.4	Permeação <i>ex vivo</i>	39
3	OBJETIVO	41
3.1	Geral	41
3.1	Específicos	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Reagentes, padrões de referência e amostras do mercado	42
4.2	Manipulação das formas farmacêuticas cápsula e emulsão	42
4.3	Desenvolvimento dos métodos analíticos	44
4.3.1	Preparo das soluções padrão e amostra	44
4.3.2	Condições cromatográficas	45
4.3.2.1	Método para cápsula	46
4.3.2.2	Método para emulsão	46
4.4	Validação dos métodos analíticos	47
4.4.1	Especificidade	48
4.4.2	Linearidade	48

4.4.3	Limites de detecção e de quantificação.....	48
4.4.4	Precisão.....	49
4.4.5	Exatidão.....	49
4.4.6	Robustez.....	50
4.5	Análise de amostras do mercado.....	52
4.6	Seleção do meio receptor para os testes de liberação e de permeação.....	52
4.7	Teste de liberação <i>in vitro</i> de EGCG.....	53
4.8	Preparo da pele humana.....	55
4.9	Estudo de permeação cutânea de EGCG.....	56
4.9.1	Retenção de EGCG na pele.....	56
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Desenvolvimento dos métodos analíticos.....	58
5.2	Validação dos métodos analíticos.....	60
5.3	Análise de amostras do mercado.....	65
5.4	Seleção do meio receptor para os testes de liberação e de permeação.....	67
5.5	Teste de liberação <i>in vitro</i> de EGCG.....	68
5.6	Estudo de permeação cutânea de EGCG.....	69
6	DISCUSSÃO.....	71
6.1	Desenvolvimento dos métodos analíticos.....	71
6.2	Validação dos métodos analíticos.....	74
6.3	Análise de amostras do mercado.....	77
6.4	Seleção do meio receptor para os testes de liberação e de permeação.....	77
6.5	Teste de liberação <i>in vitro</i> de EGCG.....	78
6.6	Estudo de permeação cutânea de EGCG.....	80
7	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A.....	94
	ANEXO B.....	95

1 INTRODUÇÃO

O chá verde é produzido por secagem das folhas de *Camellia sinensis* (Theaceae), um arbusto verde cultivado principalmente na China, Índia, Japão e Sri Lanka (DEWIK, 2009). É caracterizado pela presença de grandes quantidades de polifenóis, em sua maioria, representados por catequinas (PEKAL et al., 2012). Atualmente, evidências científicas associam essas substâncias com as atividades antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana (YANG; HWANG; LIN, 2007), antiviral e antifúngica (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012); prevenção à obesidade, hipertensão e diabetes (PEKAL et al., 2012); redução do risco de doenças cardiovasculares; proteção contra a radiação ultravioleta solar (YANG et al., 2012); e outros.

As catequinas presentes no chá verde são: (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-galato de catequina (CG), (-)-galato de epicatequina (ECG), (-)-galato de galocatequina (GCG) e (-)-galato de epigalocatequina (EGCG) (SANDER et al., 2011). EGCG é a principal catequina presente (50-80% das catequinas totais) (SANG et al., 2011; WEI et al., 2011) e é geralmente utilizada como biomarcador do chá verde (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013). O conteúdo de cafeína (CAF) (aproximadamente 2.5 a 3.5% do peso seco do chá) (YANG; HWANG; LIN, 2007) é também um importante parâmetro de qualidade, uma vez que está associado com a resposta diurética (WANG et al., 2011) e atua sinergicamente com as catequinas, aumentando o gasto calórico e a oxidação de lipídios (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). O ácido gálico (AG), ácido fenólico presente no chá verde (KHALAF et al., 2008) é um produto de degradação de catequinas galoiladas que deve ter o seu conteúdo limitado (USP, 2011). Outros componentes podem estar presentes, em menor quantidade, incluindo os ácidos cumárico e cafeico (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2010), teobromina, teofilina e proxifilina, o aminoácido teanina (KHALAF et al., 2008), os flavonoides kaempferol, quercetina e miricetina, saponinas, taninos e outros (SCHONTHAL, 2011).

Catequinas são substâncias que possuem estruturas químicas muito semelhantes, requerendo métodos de separação com alto poder de resolução para discriminá-los (UYSAL et al., 2009). Diversos métodos analíticos foram

desenvolvidos para identificar e quantificar os constituintes do chá verde. A cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) de fase inversa, com detecção por absorvância no ultravioleta (UV) vem sendo utilizada como método de escolha para as análises (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013; SANDER et al., 2011; SANG et al., 2011). As atuais publicações priorizam a otimização do tempo de análise para as amostras, as condições de extração, a detecção e as características dos polifenóis encontrados nas infusões e em matrizes biológicas (YANG; HWANG; LIN, 2007; NEILSON et al., 2006; SAITO et al., 2006; SHARMA et al., 2005; NISHITANI; SAGESAKA, 2004). Contudo, os trabalhos atuais apresentam vários inconvenientes como: a utilização de grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos na fase móvel, eluições complexas por gradiente com baixa repetibilidade, longos tempos de retenção, linhas de base irregulares e baixa resolução dos picos (BI; LI; ROW, 2011). Portanto, o desenvolvimento de um método cromatográfico confiável é fundamental.

Bebidas, suplementos e extratos padronizados vêm sendo desenvolvidos para a pesquisa e fins comerciais, com o propósito de fornecer quantidades uniformes de catequinas e/ou EGCG (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). Embora sejam as formas mais utilizadas para o chá verde, estudos mostram que EGCG (CHEN; LEE; YANG, 1997) e catequinas, quando administrados por via oral, são sujeitos ao metabolismo de primeira passagem e são pouco absorvidos no trato gastrointestinal. Estudos em ratos mostram que somente 0.1% de EGCG torna-se biodisponível após a sua administração intragástrica. Neste contexto, um sistema transdérmico poderia trazer ao consumidor uma opção de formalizar a dose, através de um mecanismo de liberação alternativo (BATCHELDER et al., 2004).

As catequinas são pouco permeáveis à pele devido a sua natureza hidrofílica e à interação química com a bicamada lipídica. Sua passagem através da pele poderia ser melhorada pela incorporação em veículos como emulsões e pomadas (WISUITIPROT et al., 2011). Por isso, o chá verde tem sido alvo da indústria para o desenvolvimento de novos produtos e formulações (HARVEY, 2008; WHITE; TRIBOUT; BARON, 2012). Durante esses estudos, é necessário realizar a avaliação da qualidade do produto. Dentre os testes específicos requeridos para verificar a qualidade de emulsões (BAERT et al., 2010) existem os estudos de liberação e de permeação *in vitro*, no qual requer um método de quantificação pré-validado.

Com o intuito de solucionar alguns dos problemas apresentados, o presente trabalho propõe um novo método de análise por CLAE para cápsulas e emulsões contendo chá verde. Baseando-se na quimiometria e nos princípios da química verde, os métodos foram desenvolvidos e validados para a quantificação simultânea de AG, CAF e EGCG. O trabalho ainda propõe como objetivo, verificar a qualidade da emulsão através do estudo de liberação *in vitro* de EGCG e estudar a sua permeação em pele humana através de modelo *ex vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Chás

O uso de plantas com a finalidade medicinal é considerado uma das primeiras formas de cuidado com a saúde utilizada pelo homem e está relacionado aos primórdios da medicina. Ao longo dos séculos, os produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diversas enfermidades (CARVALHO; SILVEIRA, 2010).

Muitas plantas são tradicionalmente consumidas como chás, ou seja, as folhas ou outras partes das plantas são misturadas, geralmente, com água quente para extrair os seus princípios ativos (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2010). O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo (KIM; WELT; TALCOTT, 2011). No Brasil, o seu consumo está relacionado a práticas curativas, com origem em culturas indígenas, negras e europeias, convivendo constantemente com o comércio de espécies medicinais em feiras e o plantio em quintais para o consumo familiar. Embora a infusão mais consumida no país seja a de mate, destacam-se outros chás de espécies de plantas consideradas terapêuticas, como: carqueja, boldo, camomila, erva-cidreira, erva doce e hortelã (SOUZA, 2007). No mundo, as infusões mais consumidas são aquelas derivadas da espécie *Camellia sinensis* (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2010), variando apenas as formas de consumo entre os países, sendo o chá consumido puro, com açúcar, leite ou limão (SOUZA, 2007).

2.1.1 Chás obtidos a partir de *Camellia sinensis*

Camellia sinensis é um arbusto verde, pertencente à família Theaceae, cultivado principalmente na China, Índia, Japão e Sri Lanka (Figura 1). Suas folhas e seus brotos são utilizados para o preparo de chá (DEWIK, 2009).



Figura 1. Espécie de *Camellia sinensis*. Fonte: CAMELLIUS-R-US, 2012; HARDY, 2012.

Cerca de 300 diferentes tipos de chás são produzidos a partir de *Camellia sinensis*, por diferentes processos. Chá preto, chá oolong e chá verde são os principais produtos obtidos desta planta, diferenciando-se pelo processo de fermentação (SANG et al., 2011). No entanto, este termo não reflete a realidade, uma vez que o processo não envolve atividade microbológica, mas apenas a inativação de enzimas (SOUZA, 2007) como a polifenol oxidase e a peroxidase, responsáveis pela oxidação e polimerização de polifenóis conhecidos como catequinas (SANG et al., 2011). O chá preto é fermentado (sem inativação enzimática), o chá oolong semifermentado (inativação enzimática parcial) e o chá verde não fermentado (inativação enzimática total) (CHACKO et al., 2010). As diferentes formas de processamento fazem com que esses chás apresentem diferenças nas características organolépticas e na composição química (PEKAL et al., 2012).

Existem três principais grupos responsáveis pelos efeitos biológicos do chá: xantinas, óleos essenciais e polifenóis. Desses componentes, os polifenóis recebem destaque porque possuem diversas funções fisiológicas na planta e afetam significativamente a saúde humana (YANG et al., 2012).

No chá verde, os polifenóis são predominantemente representados pelas catequinas (KIM; WELT; TALCOTT, 2011), membros de uma classe de flavonoides, os flavan-3-óis. No chá oolong estão representados principalmente por teasinensinas, galocatequinas diméricas, ligadas por ligações carbono-carbono

(Figura 2A). No chá preto, o predomínio é de teorubiginas (Figura 2B) e teoflavinas (Figura 2C), formadas pela oxidação e polimerização de monômeros das catequinas durante a fermentação (SANG et al., 2011). Apesar da grande ocorrência de teorubiginas no chá preto, são produtos de oxidação complexos cuja química ainda é pouco compreendida, sendo pouco caracterizados (HARBOWY; BALENTINE, 1997; HASLAM, 2003; KUHNERT, 2010).

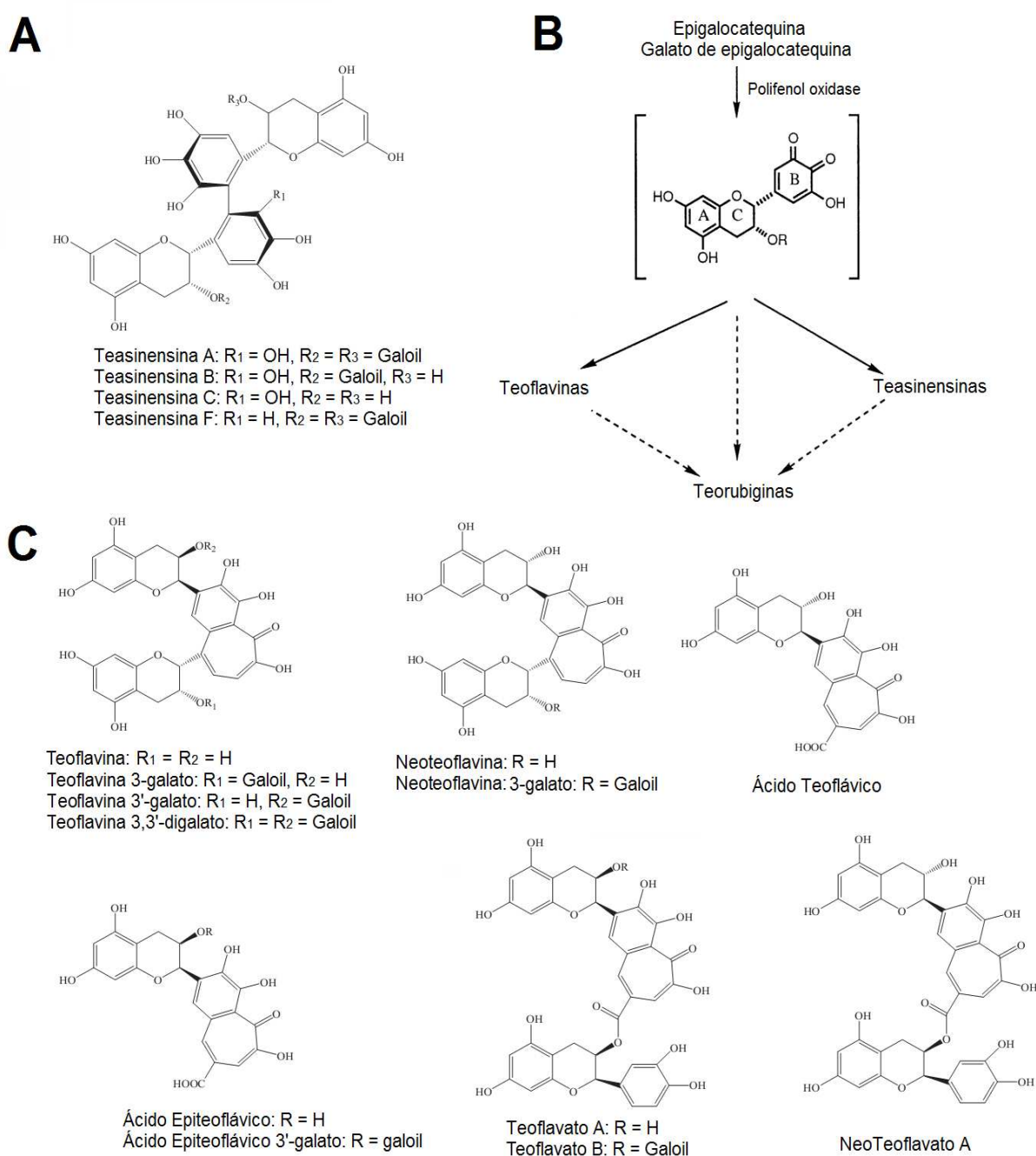


Figura 2. Produtos formados pela oxidação e polimerização de catequinas. (A) Tesinensinas; (B) Possível via de síntese de teorubiginas; (C) Teoflavinas. Adaptado de: HASLAM, 2003; SANG et al., 2011.

2.1.1.1 Chá verde e seus constituintes

O chá verde foi levado do Japão para a China por sacerdotes budistas há milhares de anos atrás (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012). É especialmente popular nos países da Ásia (KIM; WELT; TALCOTT, 2011). É produzido por secagem das folhas logo após a coleta para evitar a oxidação, produzindo um produto seco e estável (CHACKO et al., 2010; DEWIK, 2009).

É caracterizado pela presença de grandes quantidades de catequinas (Figura 3) (PEKAL et al., 2012), sendo estas representadas por: C, EC, GC, EGC, CG, ECG, GCG e EGCG (SANDER et al., 2011). Contém outros polifenóis, em menor quantidade, como AG, ácido cumárico e ácido cafeico (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2010). Proxifilina, CAF, teobromina e teofilina representam aproximadamente 4% do peso seco do chá. Outros componentes podem estar presentes, incluindo o aminoácido teanina (KHALAF et al., 2008), os flavonoides kaempferol, quercetina e miricetina, saponinas e taninos. Além disso, o chá verde ainda pode conter vestígios de pesticidas como organoclorados, organofosforados e piretrinas (SCHONTHAL, 2011).

As catequinas representam 70 a 80% dos polifenóis do chá (YANG et al., 2012), sendo responsáveis pela cor (MORAIS et al., 2009) e pelo sabor amargo e adstringente (YANG; HWANG; LIN, 2007). Representam cerca de 10-15% da massa de folhas secas, enquanto os extratos secos comerciais podem apresentar níveis de aproximadamente 75% (SANDER et al., 2011). EGCG é a principal catequina presente (50-80% das catequinas totais) (SANG et al., 2011; WEI et al., 2011) e é geralmente utilizado como biomarcador do chá verde (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013).

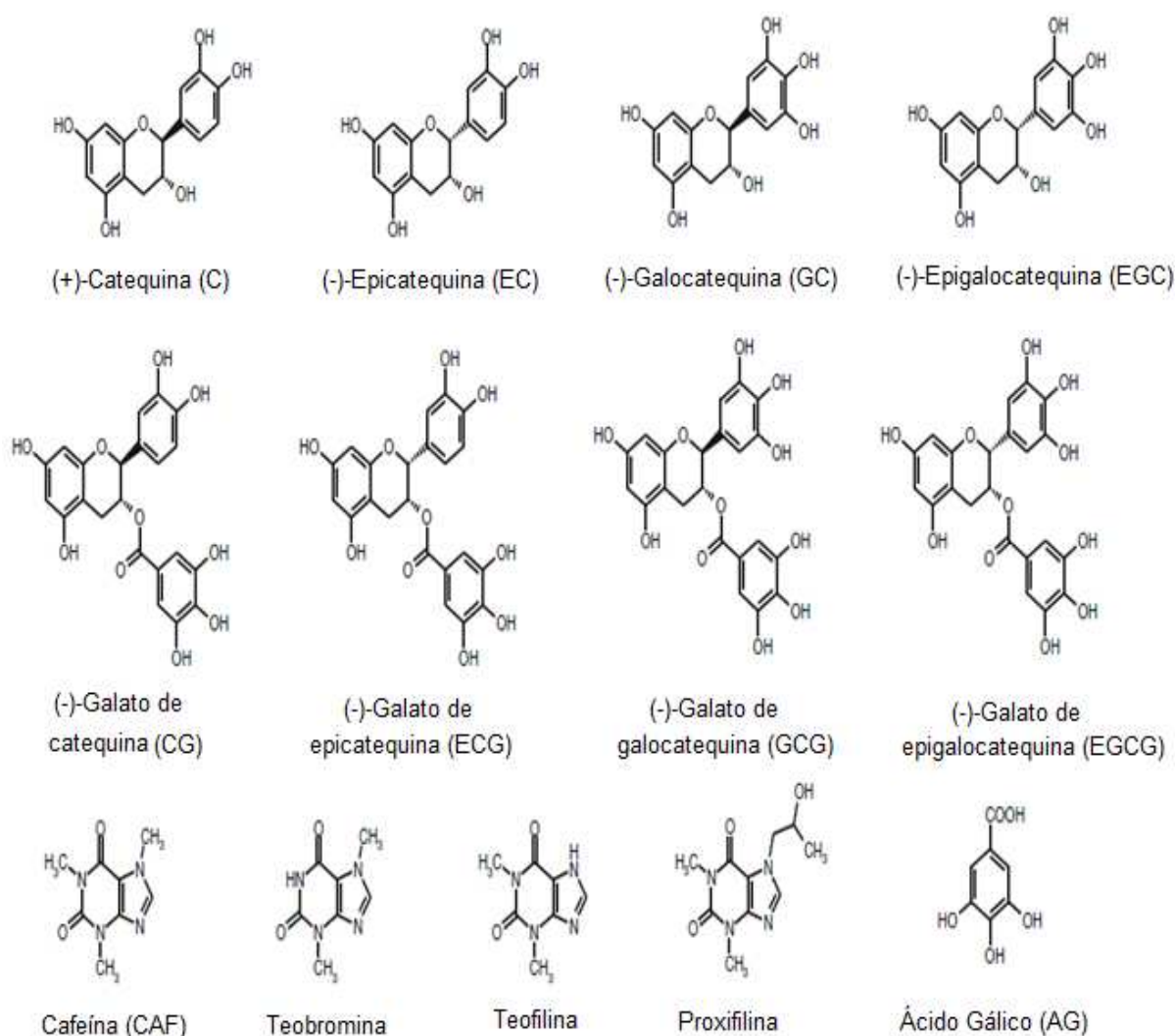


Figura 3. Estruturas dos principais compostos presentes no chá verde. Adaptado de SANDER et al., 2011.

Algumas etapas realizadas no método de preparo, como o tempo de infusão, a temperatura da água e a quantidade de material da planta utilizada, afetam o conteúdo de princípios ativos do chá (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). O preparo com água a frio (a 25 °C por 2 horas), por exemplo, faz com que o chá torne-se menos amargo e apresente menores quantidades de CAF. Enquanto isso, o preparo com infusões em altas temperaturas (85 a 100 °C) faz com que o chá apresente níveis mais altos de catequinas, CAF e AG (YANG; HWANG; LIN, 2007).

Bebidas, suplementos e extratos padronizados vêm sendo desenvolvidos para a pesquisa e fins comerciais, com o propósito de fornecer quantidades uniformes de catequinas e/ou EGCG. A maioria desses produtos possui quantidade de catequinas equivalente a três ou mais porções de chá verde (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011).

A indústria possui um crescente interesse no desenvolvimento de produtos a partir de recursos naturais já tradicionalmente utilizados (HARVEY, 2008). Miyazaki (2007) pesquisou o número de patentes existentes para o chá verde e encontrou 152 na base europeia Espacenet, 7 na base dos Estados Unidos da América (EUA), Uspto, e 5 na base brasileira, INPI, totalizando 164 patentes. Com relação ao objeto das patentes, a principal tecnologia aplicada é na obtenção de cosméticos para os cuidados com a pele, sendo explorada a sua capacidade regeneradora, empregada para o embelezamento. Aproximadamente 65% das patentes correspondem a cosméticos para cuidados com a pele, 13% para o tratamento capilar, 18% para a higiene oral e 4% são para a obtenção do produto. O Japão é o principal detentor da tecnologia na preparação de cosméticos (87 patentes) e a empresa norte-americana Procter & Gamble é a que possui o maior número (10 patentes).

2.1.1.1.1 A bioquímica das catequinas

A biossíntese das catequinas (flavan-3-óis) é realizada através da formação dos flavonoides (SINGH et al., 2009). Estruturalmente, os flavonoides consistem de um núcleo fundamental com três anéis, sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B), ligados a uma cadeia heterocíclica (anel C) (Figura 4) (VIEYRA et al., 2009). Em geral, são produzidos por plantas através da formação mista entre a via do chiquimato e a via do acetato-mevalonato (DORNAS et al., 2007; RANI et al., 2012; WANG et al., 2012).

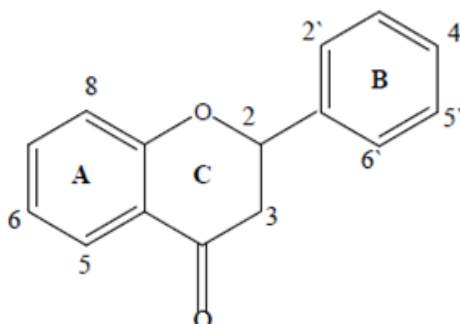


Figura 4. Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: DORNAS et al., 2007.

Sintetizada a partir da via do ácido chiquímico, a fenilalanina é a molécula iniciadora da síntese de fenilpropanóides em plantas (Figura 5, A). Na presença de fenilalanina amônia liase (PAL), sofre deaminação para ácido *trans*-cinâmico, com subsequente oxidação a ácido *p*-cumárico pela cinamato 4-hidroxilase (C4H) e ativação com coenzima A (CoA), na presença de 4-cumaroil CoA ligase. A enzima chalcona sintase (CHS) é então responsável pela ligação de *p*-cumaroil-CoA a três unidades extensoras de malonil-CoA. A cadeia policetílica é estendida com ânions enolatos, através de reações de Claisen. A ciclização do tetracetídeo gera o segundo anel aromático da estrutura da chalcona (Figura 5, B) (CHENIANY; EBRAHIMZADEH; MASOUDI-NEJAD, 2012; YU; JEZ, 2008).

A enzima chalcona isomerase (CHI) catalisa a isomerização estereoespecífica de chalcona para as correspondentes flavanonas. A partir das flavanonas, a via diverge em diferentes caminhos, resultando em diferentes classes de flavonoides. A flavanona 3-hidroxilase catalisa uma hidroxilação estereoespecífica na posição 3 da flavanona (RANI et al., 2012). A dihidroflavonol redutase converte o dihidroflavonol formado em leucoantocianidina (Figura 5, C). Esta é transformada pela leucoantocianidina redutase em (+)-catequina. Alternativamente, a antocianidina sintase e a antocianidina redutase convertem as leucoantocianidinas em (-)-epicatequinas, o epímero de (+)-catequina (Figura 5, D) (YU; JEZ, 2008).

Flavan-3-óis diferem entre si pela estereoquímica em C-3 e pelo padrão de hidroxilação no anel B (SERRANO et al., 2009). São divididos em catecol e galoflavanóis com base no número de grupos hidroxila no anel B (KIM; WELT; TALCOTT, 2011). A produção dos mesmos é geneticamente controlada, sendo que a dihidroquercetina e a dihidromiricetina são os dihidroflavonóis antecessores às catequinas dihidroxiladas e trihidroxiladas, respectivamente (WEI et al., 2011).

Flavan-3-óis são monômeros que podem sofrer polimerização e gerar taninos condensados (YU; JEZ, 2008). Esses monômeros, por vezes, podem estar esterificados com uma molécula de AG (SERRANO et al., 2009). O AG também pode vir a ser formado a partir de fenilalanina e, estando na presença da enzima flavan-3-ol galato sintase, pode ser introduzido nos monômeros gerando catequinas do tipo éster galato (ASHIHARA et al., 2010). Os monômeros mais encontrados são os diastereoisômeros C/EC e GC/EGC (SERRANO et al., 2009).

A biossíntese de flavonoides frequentemente aumenta em resposta a fatores de estresse externos como luz UV excessiva, baixas temperaturas e infecção por patógenos (WANG et al., 2012). Também sofre variação por peculiaridades das espécies e fatores agrônômicos tais como a aplicação de fertilizantes e poda. O efeito do clima durante a formação de folhas jovens é o fator mais importante, afetando fortemente a qualidade e o valor do chá durante todo o ano. EGCG, por exemplo, pode ter sua formação favorecida em condições como umidade elevada e exposição à luz solar por curto tempo (WANG et al., 2011; WEI et al., 2011).

2.1.1.1.2 Atividades farmacológicas

Cientistas, em busca de alternativas para a prevenção e o tratamento de doenças, reconheceram os efeitos benéficos do chá verde (WHITE; TRIBOUT; BARON, 2012). Atualmente, evidências indicam que os seus componentes possuem efeitos específicos. Muitos mecanismos de ação do chá verde e de seu principal constituinte (EGCG) são reconhecidos (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012).

Os polifenóis, em especial as catequinas, possuem atividade antioxidante (BORNHOEFT et al., 2012; KIM; WELT; TALCOTT, 2011; SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011). Substâncias antioxidantes são capazes de inibir ou retardar a oxidação de substratos oxidáveis, evitando os danos causados por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EDEAS, 2011; VALKO et al., 2007; MORAIS et al., 2009). Dessa forma, desempenham um papel importante na quimioprevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, como: osteoporose, doenças inflamatórias (SANDUKJI et al., 2011), doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, diabetes e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (VALKO et al., 2007).

Em geral, plantas com substâncias com estruturas aromáticas possuem efeito antioxidante devido à presença de grupamentos hidroxilas nos compostos fenólicos. Os fenóis possuem características de oxi-redução, sendo considerados agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio singlete. As hidroxilas, em particular, podem doar elétrons, estabilizando-se através de ressonâncias no sistema aromático (DORNAS et al., 2007; MORAIS et al., 2009).

Pesquisas mostram que o chá verde aumenta a atividade da insulina *in vitro* e melhora a sensibilidade à insulina em ratos e humanos. É capaz de reduzir a expressão intestinal de enzimas atuantes na gliconeogênese. Esses resultados sugerem que o seu consumo poderia contribuir potencialmente para estratégias nutricionais na prevenção e no tratamento de *diabetes mellitus* tipo 2 (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012).

Existem mais de 795 estudos publicados na literatura mostrando os seus efeitos no câncer, principalmente os quimiopreventivos. Os polifenóis inibem células proliferativas (SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011; YU; JEZ, 2008), sendo apresentada a hipótese de indução a apoptose por produção de peróxido de hidrogênio, principalmente por EGCG (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012). Com base em dados de ensaios pré-clínicos e clínicos, vários estudos em animais revelaram que o tratamento com EGCG inibe a incidência e a multiplicidade de tumor em diferentes órgãos tal como pele, pulmão, fígado, mama, próstata, estômago, cólon e glândula mamária (SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011).

A quantidade de CAF presente também é um parâmetro importante de qualidade, uma vez que este constituinte está associado com a resposta diurética (WANG et al., 2011), influencia na atividade do sistema nervoso e atua sinergicamente com as catequinas, aumentando o gasto calórico e promovendo a oxidação de lipídios (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). Suplementos dietéticos contendo chá verde são comumente comercializados como auxiliares na perda de peso (SANDER et al., 2011). As catequinas, em especial, podem afetar o balanço energético, aumentar a regulação de enzimas envolvidas no metabolismo hepático de lipídios e diminuir a absorção de nutrientes (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011).

Estudos epidemiológicos indicaram que o consumo de chá verde está associado com baixa prevalência de déficit cognitivo em humanos e que a teanina regula as funções nervosas, aumentando a síntese de fatores de crescimento de nervos e de neurotransmissores (SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012).

Outro estudo revela que a administração regular de EGCG aumenta a dose mínima de radiação necessária para induzir o eritema, sugerindo que EGCG é capaz de inibir os danos causados por radiações UVB. Em geral, pesquisas em animais e humanos, com preparações orais e tópicas, têm mostrado efeitos significativos. Entretanto, a aplicação tópica na forma de pomada hidrofílica demonstrou melhor propriedade fotoprotetora em ratos (WHITE; TRIBOUT; BARON, 2012).

Alguns autores associam as catequinas às atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica (YANG; HWANG; LIN, 2007; SUZUKI; MIYOSHI; ISEMURA, 2012). Possuem efeito inibidor sobre a infecção por *Helicobacter pylori* (TAKABAYASHI et al., 2004), contra os vírus da gripe e *Herpes simplex* (CHACKO et al., 2010) e auxiliam, quando associadas a antifúngicos, no tratamento contra *Candida albicans* (HIRASAWA; TAKADA, 2004). EGCG ainda é capaz de limitar o crescimento bacteriano e atuar em sinergismo com os antibióticos β -lactâmicos. Reverte também a resistência de estafilococos à tetraciclina (ROCCARO et al., 2004).

Para o uso em cosméticos, suas principais aplicações são: antiinflamatória; antioxidante, combatendo os radicais livres responsáveis pelo envelhecimento precoce; estimula o sistema de defesa celular da pele contra os raios UV do tipo B; adstringente, promovendo a limpeza de pele e de cabelos oleosos e regeneradora (MIYAZAKI, 2007).

2.1.1.1.3 Efeitos Adversos

Existem indicações de que o uso abundante de infusões de chá verde e de extratos concentrados é capaz de gerar efeitos adversos, embora, muitas vezes, não sejam comprovados por evidências científicas (SCHONTHAL, 2011). Seus efeitos nocivos são devido a três principais fatores: o seu teor de cafeína, à presença de alumínio e o efeito dos polifenóis sobre a biodisponibilidade do ferro (CHACKO et al., 2010).

Altas concentrações de CAF podem causar ansiedade, aumento dos batimentos cardíacos e da pressão arterial, dor de cabeça, nervosismo e insônia (YANG; HWANG; LIN, 2007). O uso concomitante do chá com outros fármacos deve ser controlado devido ao efeito diurético da CAF (CHACKO et al., 2010).

Algumas plantas possuem a capacidade de acumular altos níveis de alumínio, sendo esse aspecto importante para os pacientes com insuficiência renal. A ingestão de chá verde deve ser controlada pelos pacientes uma vez que o alumínio presente pode se acumular no organismo, resultando em doenças neurológicas (COSTA; GOUVEIA; NOBREGA, 2002).

As catequinas possuem afinidade pelo ferro e podem causar diminuições significativas da biodisponibilidade do mesmo a partir da dieta (MOHAMED; CHABCHOUB; HEDHILI, 2003). Causam também dano oxidativo ao DNA do pâncreas e do fígado de *hamsters* (TAKABAYASHI et al., 2004) e EGCG exerce citotoxicidade aguda em células do fígado de ratos (SCHMIDT et al., 2005). Além disso, doses elevadas de chá verde (5% da dieta, durante 13 semanas) podem modificar as concentrações plasmáticas de hormônios tireoidianos e induzir o aumento da tireóide em ratos (SATO et al., 2002).

2.2 Controle de qualidade de fitoterápicos

Os medicamentos devem ser comercializados como formulações seguras e terapeuticamente ativas, com desempenho consistente e previsível. Dessa forma, o controle de qualidade se torna essencial para a indústria farmacêutica. Sua aplicação para drogas vegetais e extratos é considerada um processo árduo. A padronização de plantas oferece muitos obstáculos, ao contrário de fármacos sintéticos, que possuem estrutura e outros parâmetros analíticos definidos, assim como padrões de referência para comparação, com ensaios estabelecidos e métodos farmacopeicos. (SHINDE et al., 2009).

O controle de qualidade de extratos de plantas contendo dezenas e centenas de marcadores fitoquímicos é um desafio para o desenvolvimento de métodos robustos. As variações climáticas, as localizações geográficas, os métodos de colheita, processamento e extração, contribuem para a diferença na composição do produto final (TILTON et al., 2010). As controvérsias com relação à identidade da planta, a ocorrência de adulterações deliberadas e problemas no estoque e no transporte também devem ser considerados (SHINDE et al., 2009).

Outro quesito que está diretamente ligado ao controle de qualidade é a validação analítica. A validação do método proposto para análise deve ser obrigatória na implementação de um sistema de controle de qualidade em qualquer laboratório (SOUZA et al., 2009). A aplicabilidade da validação é sempre evidenciada, mas muito pouco utilizada para medicamentos fitoterápicos (SHINDE et al., 2009).

2.2.1 Métodos analíticos para a quantificação dos componentes químicos do chá verde

A determinação de compostos fenólicos é de especial relevância. Em princípio, uma variedade de métodos de análise pode ser utilizada para determinar compostos naturais, porém, é importante considerar a complexidade da matriz que geralmente os contém (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2010). As catequinas presentes no chá verde, por exemplo, possuem estruturas químicas muito semelhantes, diferenciando-se uma das outras pela presença ou pela posição de grupos hidroxila (Figura 3). Isso torna obrigatória a utilização de métodos analíticos eficientes para discriminar esses compostos (UYSAL et al., 2009).

Atualmente, muitos métodos de análise são desenvolvidos para a quantificação de catequinas em chá verde e produtos alimentícios. A CLAE e a eletroforese capilar são as técnicas mais citadas para a sua separação, identificação e quantificação. Técnicas adicionais como cromatografia em fase gasosa, cromatografia em camada delgada, cromatografia em papel, quimiluminescência, ressonância magnética nuclear e espectroscopia por infravermelho também são reportadas (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013).

2.2.1.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

Os sistemas de cromatografia em fase líquida citados na literatura para a análise de catequinas são tipicamente acoplados com ultravioleta-visível (UV-Vis), detector com arranjo de fotodiodo (DAD), eletroquímica, espectrometria de massa, quimiluminescência e fluorescência. Entretanto, o método de escolha para a análise é tradicionalmente a cromatografia em fase líquida de fase inversa, com eluição por gradiente e detecção por absorvância no UV (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013; SANDER et al., 2011; SANG et al., 2011).

A CLAE de fase inversa é a técnica de separação mais amplamente utilizada em química analítica. Isto se deve a várias características como: possibilidade de uso de fases móveis de menor custo e toxicidade, rápido equilíbrio da coluna após

mudança de fase móvel, facilidade na execução de separações por gradiente e boa repetibilidade dos tempos de retenção. Além disso, possui ampla aplicação, devido à capacidade de separação de compostos com diferentes características (polaridade, massa molar e funcionalidades) (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012).

Apesar de possuir amplas aplicações, as separações são frequentemente desenvolvidas por tentativa e erro. As estratégias de desenvolvimento e a otimização do método são realizadas considerando possíveis variáveis significativas. Após a escolha das características da coluna, geralmente, a primeira variável a ser avaliada é a concentração de solvente orgânico na fase móvel, devido a sua influência no tempo de retenção. Outro parâmetro geralmente observado é a temperatura do compartimento da coluna, uma vez que o seu aumento pode diminuir a viscosidade, permitindo aumentar o fluxo e diminuir o tempo de análise. Em muitos casos, os analitos incluem compostos ionizáveis e o pH da fase móvel torna-se também uma variável relevante, podendo esta influenciar significativamente nos fatores de retenção, na seletividade e nas formas dos picos (AGRAFIOTOU et al., 2011).

A presença de um ácido na fase móvel é essencial para a completa resolução das catequinas e para a eficiência cromatográfica desses compostos (SAITO et al., 2006; WANG; HELLIWELL; YOU, 2000). Em CLAE de fase inversa, a seletividade desses solutos ácidos segue o seguinte comportamento: quando o pH da fase móvel é pelo menos duas unidades menor que o pKa do soluto, o mesmo se encontra protonado, aumentando a sua ligação à fase estacionária por interações hidrofóbicas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de distribuição entre as duas fases (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012). Em geral, as catequinas mostram ótima estabilidade em soluções ácidas, e são extremamente instáveis e sujeitas a processos de degradação em condições alcalinas. Quase todos os analitos presentes possuem valores de pKa entre 8 e 9, estando na forma protonada em pH ácido (UYSAL et al., 2009).

As atuais publicações sobre métodos analíticos com CLAE para chá verde priorizam a otimização do tempo de análise para as amostras, as condições de extração, a detecção e as características dos polifenóis encontrados nas infusões e em matrizes biológicas. Alguns trabalhos utilizam a ultra CLAE, com colunas recheadas com partículas de 2 μ m, trazendo benefícios no tempo de análise (SANG et al., 2011). Guilharme e colaboradores (2010) exemplificam o uso de ultra

cromatografia, com a separação de oito padrões de polifenóis do chá, sendo estes separados em aproximadamente 30 segundos, com espectrômetro de massa acoplado.

Ainda assim, os atuais trabalhos pertinentes à separação de catequinas por CLAE de fase inversa apresentam vários inconvenientes como: a utilização de grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos na fase móvel, eluições complexas por gradiente com repetibilidade baixa, tempos longos de retenção, linhas de base irregulares e resolução baixa dos picos (BI; LI; ROW, 2011). Essas características podem ser observadas nos trabalhos revisados e apresentados na Tabela 1 e na Figura 6.

Existe um método oficial, presente na *United States Pharmacopeia* (USP), aplicado ao extrato seco de chá verde descafeinado. O tempo de corrida é de 90 minutos e são consideradas as seguintes especificações: é permitido no máximo 1% de AG, não mais que 0,1% de CAF, no mínimo 40% de EGCG. Por outro lado, a quantidade de EGCG presente deve representar, no mínimo, 70% do total de catequinas do extrato seco (USP, 2011).

Tabela 1. Resumo de métodos utilizados para a determinação simultânea de componentes do chá verde por CLAE de fase inversa.

<i>Material analisado</i>	<i>Preparo da amostra</i>	<i>Coluna</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Deteção</i>	<i>Fase Móvel</i>	<i>Fluxo (mL.min⁻¹)</i>	<i>Eluição</i>	<i>Autor</i>
Chá verde torrado	Infusão	C18 150 mm x 4.6 mm, 5 µm	30	UV 210 nm	MeOH : H ₂ O : Ác. Fosfórico (20 : 79.9 : 0.1 v/v)	1.0	isocrática	WANG; HELLIWELL ; YOU, 2000
Droga vegetal	Infusão, rotaevaporação e diluição em DMSO	C18 150 mm x 3.0 mm, 5 µm	40	DAD 280 nm	MeOH : H ₂ O: Ac. Fórmico (19.5:82.5:0.3 v/v)	1.0	isocrática	LIN et al., 2003
Droga vegetal	Extração com água e ACN (1:1)	C18 150 mm x 3.0 mm, 5 µm	40	UV 280 nm	A) H ₂ O : MeOH : Ac. Fórmico (85 : 15 : 0.1 v/v) B) H ₂ O : MeOH : EtOAc : Ác. Fosfórico (85 : 15 : 1 : 0.1 v/v)	0.3 0.45 1.0 0.3	gradiente de fluxo e de fase móvel	NISHITANI; SAGESAKA, 2004
Droga vegetal	Extração com MeOH 70% e centrifugação	C18 250 mm x 4.0 mm, 5 µm	35	DAD 210 nm	A) ACN B) H ₂ O ácida (Ác. Fosfórico 0.1%)	1.0	gradiente de fase móvel	SHARMA et al., 2005
Chá normal e descafeinado	Infusão, diluição com ác. acético e centrifugação	C18 100 mm x 3.9 mm, 3.5 µm	35	DAD 280 nm	A) H ₂ O : ACN : TFA (919 : 80 : 1 v/v) B) H ₂ O : ACN : MeOH: TFA (699 : 270 : 30 : 1 v/v)	1.2	gradiente de fase móvel	NEILSON et al., 2006
Extrato seco	Extração com fase móvel e sonicação	C18 125 mm x 4.0 mm, 5µm	19	UV 280 nm	H ₂ O : ACN : MeOH : EtOAc : Ác. Acético (89 : 6 : 1 : 3 : 1v/v)	0.7 1.2	gradiente de fluxo	SAITO et al., 2006
Erva processada e seca	Infusão	C18 250 mm x 4.6 mm, 5µm	35	DAD 260 nm	A) H ₂ O B) MeOH	1.0	gradiente de fase móvel	SOUZA, 2007
Chá comercial	Infusão	C18 250 mm x 4.6 mm, 5µm	25	DAD 280 nm	A) ACN B) Sol. ác. acético 0,9% em água	1.0	gradiente de fase móvel	YANG; HWANG; LIN, 2007
Padrão de chá verde	Extração com solução aquosa de metanol 30% e ácido fórmico 0.05%	C18 250 mm x 4.6 mm, 5µm	25	UV 280 nm	A) Sol. ác. fórmico 0,1% em água B) Sol. ác. fórmico 0.1% em ACN	1.0	gradiente de fase móvel	SANDER et al., 2011
Padrões de catequinas	Dissolução em metanol : água (20 : 80 v/v)	C18 150 mm x 4.6 mm, 5µm	25	UV 280 nm	ACN : H ₂ O (12 : 88 v/v) com 1.5 mmol L ⁻¹ de β-ciclodextrina	1.0	isocrática	BI; LI; ROW, 2011
Extrato seco descafeinado	Dissolução em água, metanol, THF e ác. Fosfórico 85% (936.5: 50: 10: 3.5 v/v) e centrifugação	C18 250 mm x 4.6 mm, 5µm	25	UV 278 nm	A) H ₂ O : MeOH : Ác. fosfórico (946,5 : 50 : 3,5 v/v) B) ACN : MeOH (95: 5 v/v)	0.8	gradiente de fase móvel	USP 2011

T= temperatura; EtOH = etanol; MeOH = metanol; DMSO = dimetilsulfóxido; ACN = acetonitrila; EtOAc = acetato de etila; TFA = ácido trifluoroacético; THF = tetrahidrofurano.

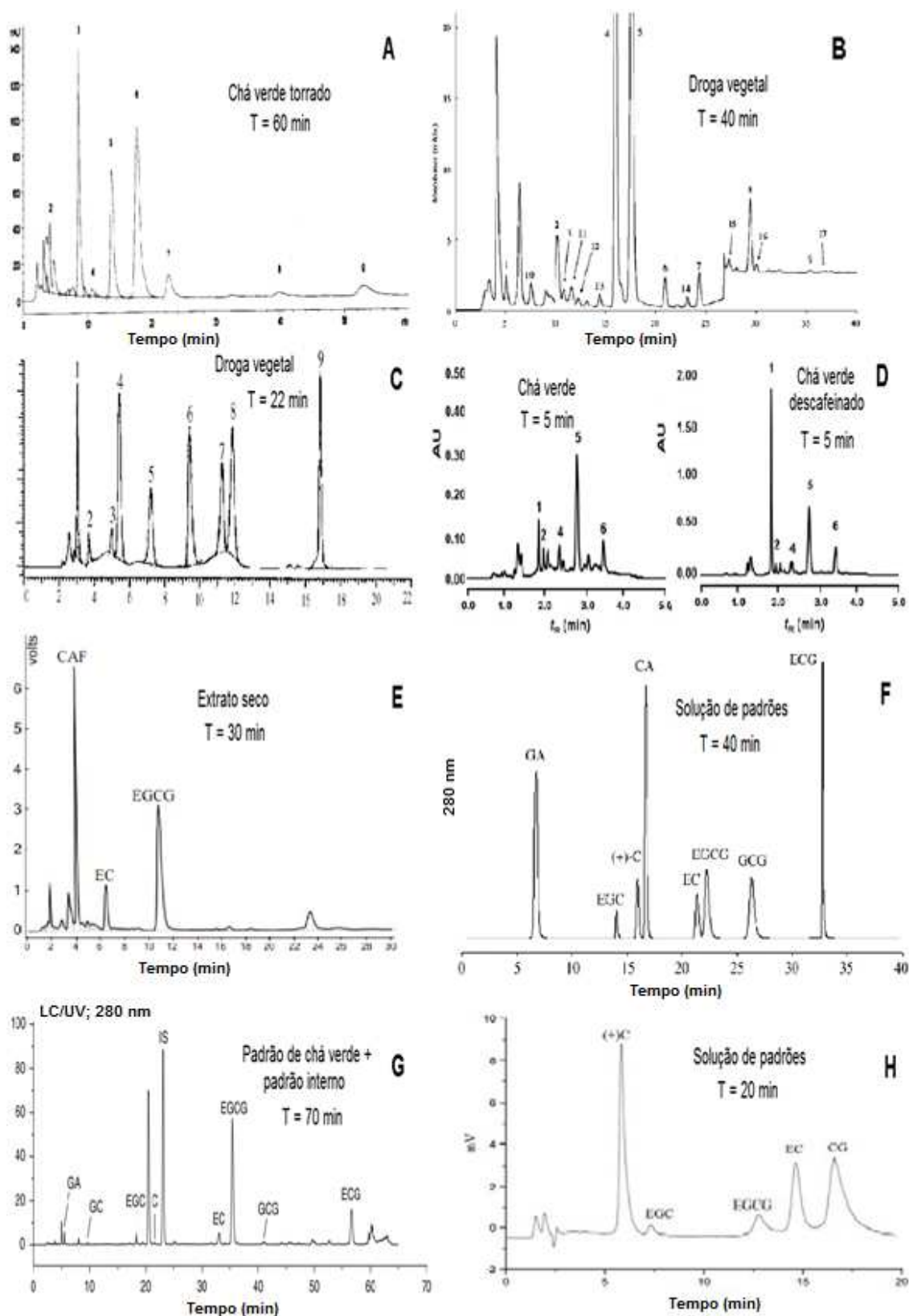


Figura 6. Cromatogramas obtidos a partir de métodos de análise para a determinação simultânea de componentes do chá verde por CLAE de fase inversa. Fonte: (A) WANG; HELLIWELL; YOU, 2000; (B) NISHITANI; SAGESAKA, 2004; (C) SHARMA et al., 2005; (D) NEILSON et al, 2006; (E) SAITO et al., 2006; (F) YANG; HWANG; LIN, 2007; (G) SANDER et al., 2011; (H) BI; LI; ROW, 2011.

2.3 A pele como via de administração tópica para os fármacos

2.3.1 A pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e corresponde a aproximadamente 5% do peso corporal total. Em adultos, pode representar uma superfície externa de 2 m² e apresenta uma espessura variável (1 a 4 mm) conforme a região considerada. É o principal órgão de comunicação com o meio externo, desempenhando diferentes funções. Atua como uma barreira protetora contra ataques físicos, químicos e microbiológicos. Além disso, mantém a temperatura corporal, impede a perda da água e possui funções sensoriais (pressão, dor, tato, calor e frio). É composta por três camadas que, se diferem com relação à sua estrutura e composição. Estas são representadas por: epiderme, derme e hipoderme (Figura 7, A) (BEMVINDO, 2006).

A epiderme é a camada mais externa da pele e pode ser dividida em duas partes distintas: a epiderme viável (camada hidrofílica contendo 70% de água) e o estrato córneo (camada hidrofóbica contendo 13% de água) (Figura 7, B). A epiderme viável (~100 µm) é formada pelo estrato basal, pela camada Malpighiana e pelo estrato granuloso (BOLZINGER et al., 2012). A camada basal é formada por células jovens colunares, em multiplicação constante, sendo responsáveis pela renovação celular da epiderme. As células da camada Malpighiana são mais poligonais e apresentam projeções citoplasmáticas que ancoram as células umas às outras, dando resistência ao atrito. As células do estrato granuloso possuem em seu citoplasma grânulos de querato-hialina que são precursores da queratina do estrato córneo (BEMVINDO, 2006). O estrato córneo (~10 µm) é a camada mais superficial, composta de células mortas, secas e alongadas, chamadas de corneócitos, produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável. Os corneócitos encontram-se inseridos numa matriz lipídica contendo ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. Para a sua manutenção, a estrutura é renovada continuamente, uma vez que está constantemente exposta a degradações químicas e físicas causadas pelo ambiente (BOLZINGER et al., 2012).

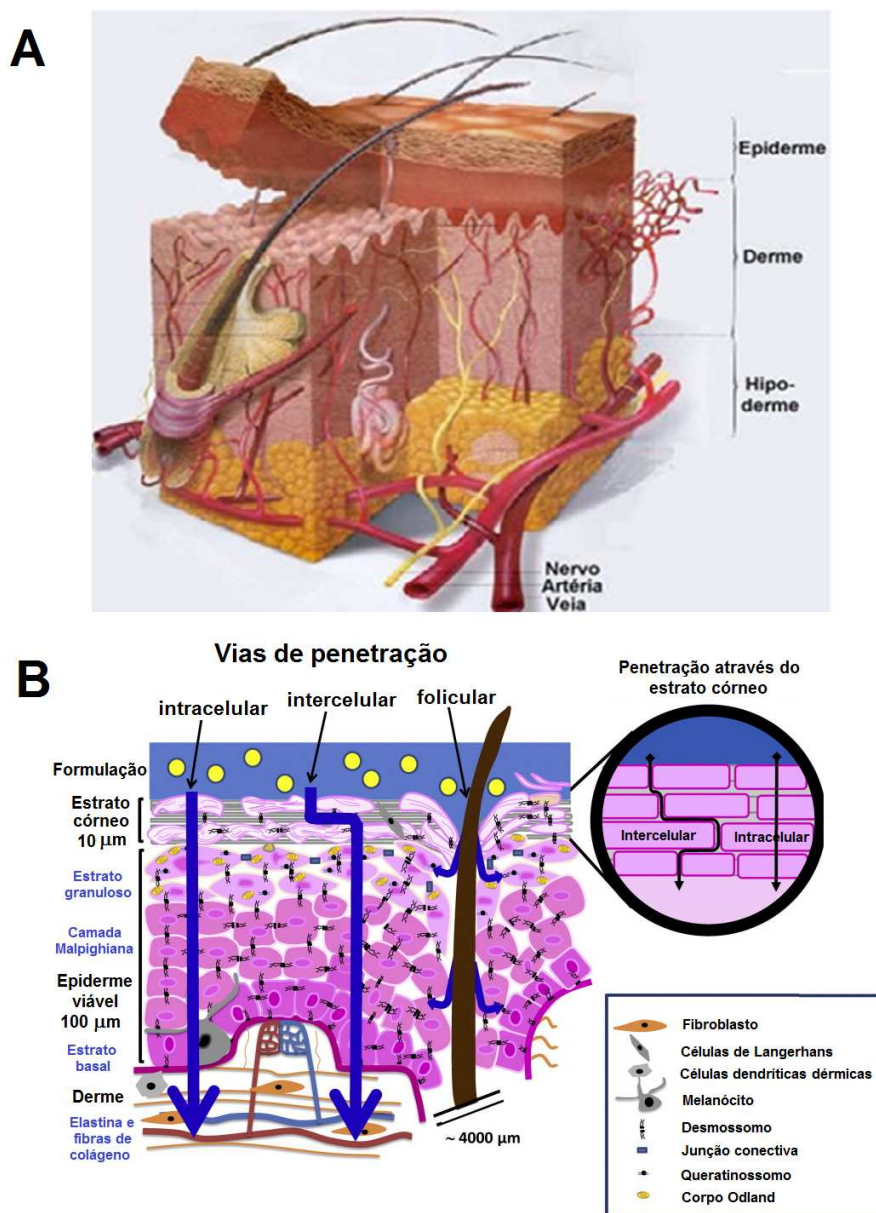


Figura 7. As camadas da pele e suas vias de penetração. A: epiderme, derme e hipoderme; B: penetração intracelular, intercelular e folicular. Adaptado de: BEMVINDO, 2006; BOLZINGER et al., 2012.

A derme é a camada intermediária da pele, sendo formada por: tecido conjuntivo, que sustenta a epiderme; elementos fibrilares como o colágeno e a elastina; e outros elementos da matriz celular, como proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, íons e água de solvatação. Na derme ainda estão presentes os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações nervosas, as glândulas sudoríparas, sebáceas e os folículos pilosos. É responsável pela flexibilidade, elasticidade e homeostase da pele (ROGGIA, 2009).

A hipoderme é a camada mais profunda e é constituída por tecido adiposo denso, com espessura variável, de acordo com as características individuais. É considerada como um isolante térmico; atua na reserva energética e na proteção contra choques mecânicos; e une a epiderme e a derme aos tecidos subjacentes, permitindo que deslizem livremente sobre as outras estruturas do organismo (ROGGIA, 2009; SIQUEIRA, 2008).

2.3.2 A absorção de fármacos na pele

O termo absorção dérmica descreve a passagem de compostos pela pele e o processo é dividido em três etapas: penetração, a introdução de uma substância em uma camada particular da pele; permeação, a penetração de uma camada para a outra; e a reabsorção, ou absorção no sistema vascular. Os mecanismos de absorção de fármacos na pele são compreendidos pela determinação macroscópica da via de permeação e dos parâmetros físico-químicos de seu transporte. As três principais vias de permeação através da camada córnea são: intercelular, intracelular e folicular (Figura 7, B). Esse modelo leva em consideração a difusão passiva, impulsionada pelo gradiente de concentração de moléculas penetrantes. A via intercelular, através dos lipídios, é a via predominante (BOLZINGER et al., 2012). Os fármacos hidrofóbicos penetram no estrato córneo por esta via e os hidrofílicos passam pela via intracelular, através dos corneócitos. A difusão também pode ocorrer através das discontinuidades da camada córnea como, por exemplo, o cabelo e as glândulas sudoríparas, proporcionando uma via folicular (BARRY, 2002). Embora esta via ocupe uma pequena área da superfície da pele e não seja considerada significativa, foi reconhecida atualmente importante para a permeação de nanopartículas (LADEMANN et al., 2007).

Na difusão passiva, a matéria se move de uma região do sistema para outra sem que haja gasto de energia. A taxa de transferência por unidade de área da substância difundida de uma seção é proporcional ao gradiente de concentração, medido perpendicularmente a esta seção. Essa taxa é expressa pela primeira lei de Fick (Equação 1):

$$J = \frac{A \cdot D \cdot K_p (c_1 - c_2)}{h} \quad (1)$$

onde, A é a área de contato, D é o coeficiente de difusão, K_p é o coeficiente de partição, C_1-C_2 é a diferença de concentração e h é a espessura da membrana. O fluxo (J) é a taxa de passagem da substância através de uma unidade de superfície de área da pele, em função do tempo (BEMVINDO, 2006).

Nesse modelo, o transporte do fármaco é controlado pelo coeficiente de difusão no interior dos lipídios, pela retenção durante a penetração na queratina dos corneócitos e pelo coeficiente de partição entre o fármaco na formulação e os lipídeos do estrato córneo. Existem então quatro parâmetros físico-químicos relacionados aos fármacos: a massa molar, que determina o coeficiente de difusão; o número de doadores e de receptores de ligações de hidrogênio, que controlam as interações com a superfície dos corneócitos; e o coeficiente de partição octanol-água ($\log P$), que representa a partição água-estrato córneo (XIANGLI; BERNARD; ALFRED, 2011). Fatores relacionados com a pele também podem alterar a permeabilidade de substâncias, como: presença de alguma patologia, idade da pele, fluxo sanguíneo, metabolismo, hidratação do estrato córneo e outros (AULTON, 2005).

O estrato córneo é a camada limitante para a permeação, determinando as propriedades de barreira da pele. Substâncias hidrofílicas não conseguem penetrar em sua camada lipídica e substâncias hidrofóbicas penetram facilmente, mas permanecem armazenadas dentro do estrato córneo, uma vez que a próxima camada é hidrofílica (BOLZINGER et al., 2012). Moléculas com lipofilicidade intermediária ($\log P_{\text{octanol, água}}$ entre 2 e 3) são consideradas ótimas para permear através da rota intercelular (BENSON; WATKINSON, 2012).

Os produtos de aplicação tópica podem ser divididos em: cosméticos, dérmicos e transdérmicos. Os cosméticos são utilizados apenas com o intuito de fazer o cuidado e a proteção da pele. Já os produtos dérmicos, possuem como sítio de ação uma das camadas da pele. Os fármacos antifúngicos, por exemplo, possuem sítio de ação no estrato córneo e os fármacos antiacne, como a isotretinoína, agem nos folículos capilares e nas glândulas sebáceas, difundindo-se até a derme para alcançar o seu sítio de ação. Os sistemas transdérmicos possuem o objetivo de

atingir a circulação sanguínea em concentrações terapêuticas, permitindo uma liberação controlada dos fármacos (BETTONI, 2009).

As formas de dosagem transdérmicas tradicionais são os adesivos transdérmicos e as formulações injetáveis. No entanto, existe um interesse crescente no desenvolvimento de emulsões que mimetizem o desempenho clínico do adesivo, reduzindo assim a incidência de irritações na pele e aumentando a adesão do paciente (LEICHTNAM et al., 2006). A forma de dosagem semissólida é atualmente uma opção farmacêutica comprovadamente eficiente e bem definida (BIRUS; KÄHLIG; VALENTA, 2007). Suas vantagens são: previne os picos dos níveis séricos, permitindo uma absorção gradual e constante; as dosagens são menos frequentes; elimina o metabolismo de primeira passagem pelo fígado; não é invasivo para o paciente; e facilita a interrupção do tratamento em caso de efeitos adversos (FOX et al., 2011; HATHOUT et al., 2010).

A incorporação do chá verde em emulsões transdérmicas poderia ser objeto de pesquisas para obter os seus efeitos sistêmicos. Embora a via oral seja a sua forma mais utilizada, estudos mostram que EGCG (CHEN; LEE; YANG, 1997) e as outras catequinas, quando administrados por esta via, são sujeitos ao metabolismo de primeira passagem ou são pouco absorvidos no trato gastrointestinal. Neste contexto, um sistema transdérmico poderia trazer ao consumidor uma opção de formalizar a dose, através de um mecanismo de liberação alternativo (BATCHELDER et al., 2004).

Os produtos tópicos de chá verde podem também vir a sofrer limitações. O metabolismo cutâneo das catequinas já foi observado. Este ocorre através da dehidroxilação e da hidrólise enzimática de grupos galoil dos compostos EGCG e ECG. Além disso, as catequinas são pouco permeáveis à pele devido à sua natureza hidrofílica e à sua interação química com a bicamada lipídica. Sua passagem através da pele poderia ser melhorada pela incorporação em formulações como emulsões e pomadas (WISUITIPROT et al., 2011). Por isso, o chá verde tem sido alvo da indústria para o desenvolvimento de novos produtos e formulações (HARVEY, 2008; WHITE; TRIBOUT; BARON, 2012). Durante esse desenvolvimento, é necessário realizar a avaliação da qualidade do produto. Dentre os testes específicos requeridos para verificar a qualidade de emulsões transdérmicas (BAERT et al., 2010) existem os estudos de liberação e de permeação do fármaco *in vitro*. Porém, ainda não existem testes farmacopeicos para o estudo *in vitro* de

formulações semissólidas. Espera-se que o mesmo seja incluído nas próximas edições da USP, por exemplo.

Existe um protocolo padrão para essas análises, conhecido como “Guia para o teste de produtos químicos: método *in vitro* para a absorção na pele”. Este foi estabelecido pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) no ano de 2004, sendo uma etapa importante na aceitação de métodos *in vitro* para a avaliação da liberação e da permeação cutânea. Este guia estabelece quais são os principais pontos a serem considerados para os testes, mas permite variações significativas nos mesmos de acordo com as condições relevantes para cada formulação ou dado do estudo (BENSON; WATKINSON, 2012). O guia estabelece, por exemplo, que o meio receptor utilizado deve, preferencialmente, mimetizar as condições fisiológicas. Porém o mesmo pode ser alterado para facilitar a solubilização do composto de interesse, desde que justificado. Essas condições fisiológicas não são muito bem esclarecidas e nem são apresentados meios que possam substituir essas condições. Outro exemplo é a agitação, que deve ser realizada, mas não existem intervalos aceitáveis disponíveis para o número de rotações por minuto (OECD, 2004).

Alguns especialistas afirmam que o guia serve apenas como uma orientação, mas que esta é imprecisa para assegurar que os dados do estudo sejam consistentes e reprodutíveis, não sendo apropriado para todas as substâncias teste (BENSON; WATKINSON, 2012).

2.3.3 Liberação *in vitro*

Atualmente, o estudo de liberação *in vitro* é uma forma de estimar a liberação de fármacos a partir de sistemas semissólidos e prever a absorção cutânea do princípio ativo aplicado topicamente. Alguns estudos podem ser conduzidos pelo teste de difusão *in vitro*, através da passagem de fármacos por membranas sintéticas. Alguns destes são: estudo cinético de liberação; estabelecimento da uniformidade de produtos tópicos; diferenciação e caracterização de formulações; avaliação comparativa entre produtos inovadores e produtos presentes no mercado e avaliação da qualidade do produto (BABY et al., 2008).

A célula de difusão de Franz é amplamente utilizada para este estudo, sendo considerada como uma metodologia simples e de fácil controle das condições experimentais (ROGGIA, 2009). As células de difusão vertical (Figura 8) possuem dois compartimentos: o doador, que contém o fármaco; e o receptor, que contém a solução em que o fármaco é solúvel (meio receptor). Estes compartimentos encontram-se separados por uma membrana artificial. O produto deve ficar em contato com a membrana, na parte de cima do compartimento doador. A passagem do princípio ativo deve ser monitorada pela quantificação do mesmo nas amostras do meio receptor, sendo estas coletadas em diferentes tempos. O gráfico da quantidade acumulada de fármaco no meio em função do tempo fornece o seu perfil de liberação (BEMVINDO, 2006).

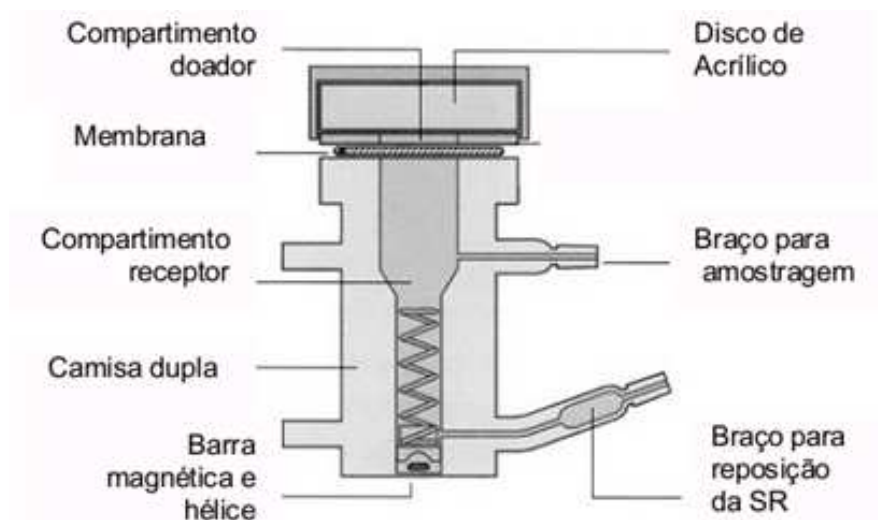


Figura 8. Célula de difusão de Franz. Fonte: BEMVINDO, 2006.

Algumas considerações devem ser feitas em relação ao protocolo de estudo. O meio receptor deve ser escolhido baseado na solubilidade do fármaco para garantir as condições *sink*, não permitindo que a solubilidade limite a difusão. Um fluido fisiologicamente favorável é preferido, embora outros possam ser utilizados, desde que justificados. Nas células, esse meio deve ser continuamente agitado (OECD, 2004).

2.3.4 Permeação *ex vivo*

Os ensaios de permeação cutânea para formulações transdérmicas são importantes para determinar a sua eficácia. Para os produtos dermatológicos, os dados de sua absorção sistêmica são importantes para controlar a segurança e evitar os possíveis efeitos adversos advindos de formulações tópicas (BEMVINDO, 2006).

Esses testes podem utilizar técnicas *ex vivo* (ou *in vitro*) e *in vivo*. As técnicas *in vitro* são realizadas em células de difusão de Franz e utilizam os mesmos princípios dos ensaios de liberação *in vitro*. Entretanto, a membrana sintética utilizada nos experimentos é substituída por um segmento de pele (SASSON, 2006). Esses estudos requerem o uso de membranas que mimetizem a função de barreira do estrato córneo *in vivo*. A pele humana é o modelo mais apropriado e considerado como padrão ouro para os experimentos. A sua disponibilidade é, muitas vezes, limitada e a utilização de peles de animais serve como uma alternativa. Animais como rato, suíno, cobra e camundongo são muito utilizados, (ROGGIA, 2009) sendo que a pele suína é considerada a mais relevante para a substituição porque apresenta propriedades histológicas e bioquímicas semelhantes à pele humana (BARBERO; FRASCH, 2009).

A pele humana pode ser obtida através de cadáveres ou de cirurgias plásticas. A espessura do estrato córneo e a densidade de folículos podem causar diferenças de permeabilidade entre diferentes regiões anatômicas. Com o intuito de minimizar a variabilidade dos resultados, deve-se padronizar o local de remoção da pele, sendo a pele do abdômen de mulheres frequentemente utilizada para o teste (BETTONI, 2009).

A determinação da penetração do princípio ativo no estrato córneo é realizada pela técnica do *tape stripping*. (ROGGIA, 2009). Esta tem como finalidade, a remoção do estrato córneo através da aplicação de fitas adesivas na pele, com pressão uniforme e remoção abrupta. Os adesivos devem ser aplicados na mesma área e, depois de retirados, devem ser tratados com solução solvente. As substâncias removidas devem ser quantificadas por um método previamente selecionado (VILLA, 2010).

Os estudos de permeação cutânea podem ser complementados pela técnica de retenção cutânea, onde a presença das substâncias é avaliada na epiderme e na derme (ROGGIA, 2009). O método clássico para separar essas camadas é imergir a pele em água a 60 °C por 2 min e “descolar” a epiderme da derme com o auxílio de uma pinça (BEMVINDO, 2006). Porém, existem controvérsias com relação a essa técnica uma vez que a alteração na viabilidade da pele após a imersão em água quente já foi comprovada (WESTER et al., 1998). Uma possível alternativa à separação pelo calor é seccionar a pele em espessuras definidas antes dos ensaios, através de um aparelho denominado dermatômetro. Uma espessura de 200 µm corresponde ao estrato córneo mais a epiderme. Após as separações, cada fragmento deve ser extraído com solvente adequado e analisado por um método analítico de quantificação (BEMVINDO, 2006).

3 OBJETIVO

3.1 GERAL

Desenvolver e validar métodos por CLAE para a quantificação simultânea de AG, CAF e EGCG em cápsulas e emulsões contendo extrato seco de chá verde e, determinar na emulsão a liberação de EGCG *in vitro* e sua permeação cutânea após a aplicação sobre a pele humana em modelo *ex vivo*.

3.2 ESPECÍFICOS

Desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação de AG, CAF e EGCG, utilizando os princípios da química verde, com baixas concentrações de solventes orgânicos, priorizando os produtos não tóxicos.

Utilizar os princípios da quimiometria, através do planejamento de experimentos, para o desenvolvimento racional dos métodos, bem como para aumentar a resolução e a especificidade dos mesmos.

Testar o método desenvolvido para cápsulas no controle de qualidade de formulações magistrais presentes no mercado.

Aplicar o método desenvolvido para a emulsão nos estudos de liberação *in vitro* e de permeação cutânea de EGCG.

Estudar a formulação testada com o intuito de verificar a sua capacidade de liberar EGCG e de agir de forma sistêmica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes, padrões de referência e amostras do mercado

Durante as análises de CLAE, os seguintes reagentes foram utilizados: etanol grau UV/CLAE (Panreac, Espanha); ácido acético glacial e acetato de etila grau analítico (Neon, Brasil). Para o preparo dos meios receptores foram utilizados: cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de magnésio, sulfato de sódio, bicarbonato de sódio, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dissódico, todos da Sigma (EUA). Água ultrapura, obtida de um sistema AquaMAX – Ultra 370 Series (Young Lin Instrument, Coréia), com resistividade em torno de 18.2 MΩcm, foi utilizada durante as análises.

Como substâncias químicas de trabalho (SQT), a CAF (Deg, Brasil), o AG e o EGCG (Sigma, USA) foram utilizados e padronizados (n = 6) contra padrões de referência da *United States Pharmacopeia* (USP) e suas potências relativas encontradas foram 101.17, 102.38 e 85.14%, respectivamente. Utilizou-se como matéria-prima o extrato seco de chá verde a 95% (Pharmanostra, Brasil). Todas as fases móveis e os meios receptores foram filtrados à vácuo em membrana de filtro de fluoreto de polivinilideno (Sartorius, Alemanha) com porosidade de 0.45 µm e degaseificados em banho de ultrassom (Cristófoli, Brasil) por 30 minutos antes do uso. Todas as vidrarias volumétricas utilizadas foram previamente calibradas.

As amostras de cápsulas magistrais analisadas (dosagem = 500 mg) foram obtidas em farmácias da cidade de Juiz de Fora – MG e foram denominadas de produtos A, B e C.

4.2 Manipulação das formas farmacêuticas cápsula e emulsão

Para os testes, cápsulas n. 00 (Deg, Brasil) foram utilizadas. Cada cápsula consistiu de: extrato seco de chá verde (500 mg – valor corrigido para 526,32 mg devido à potência do extrato) e placebo [quantidade suficiente para (qsp) 601.14

mg]. O placebo foi constituído de adjuvantes com ação: lubrificante e antiaderente - estearato de magnésio (6.010 mg) (Henrifarma, Brasil); dessecante e antiaderente - dióxido de silício coloidal (30.057 mg) (Henrifarma, Brasil); e diluente - fosfato de cálcio dibásico dihidratado (565.070 mg) (Valdequímica, Brasil). A mistura de excipientes foi homogeneizada e vertida em tamise malha n. 50.

A emulsão foi composta de: 15% de extrato seco de chá verde (150 mg – valor corrigido para 157.89 mg devido a potência do extrato); antioxidante verdadeiro - hidroxitolueno butilado (BHT) (0.5 mg) (All Chemistry, Brasil); agente redutor - metabissulfito de potássio (1 mg) (Vetec, Brasil); e Phytobase® (Fagron, Brasil) qsp para 1000 mg. Os pós foram devidamente pesados (balança digital analítica BL 120S, Sartorius, Alemanha), transferidos para um gral e homogeneizados geometricamente com a base. O produto foi passado através de moinhos de rolo (Fagron, USA), coletado e armazenado em embalagens de alumínio (Figura 9), sendo esta fechada em sua extremidade com o auxílio de uma pinça metálica.



Figura 9. Manipulação da emulsão de chá verde.

4.3 Desenvolvimento dos métodos analíticos

4.3.1 Preparo das soluções padrão e amostra

Todas as diluições realizadas para as análises (concentração de trabalho = 100%) e os procedimentos de validação analítica (concentrações de 80, 90, 100, 110 e 120%) estão representadas na Figura 10.

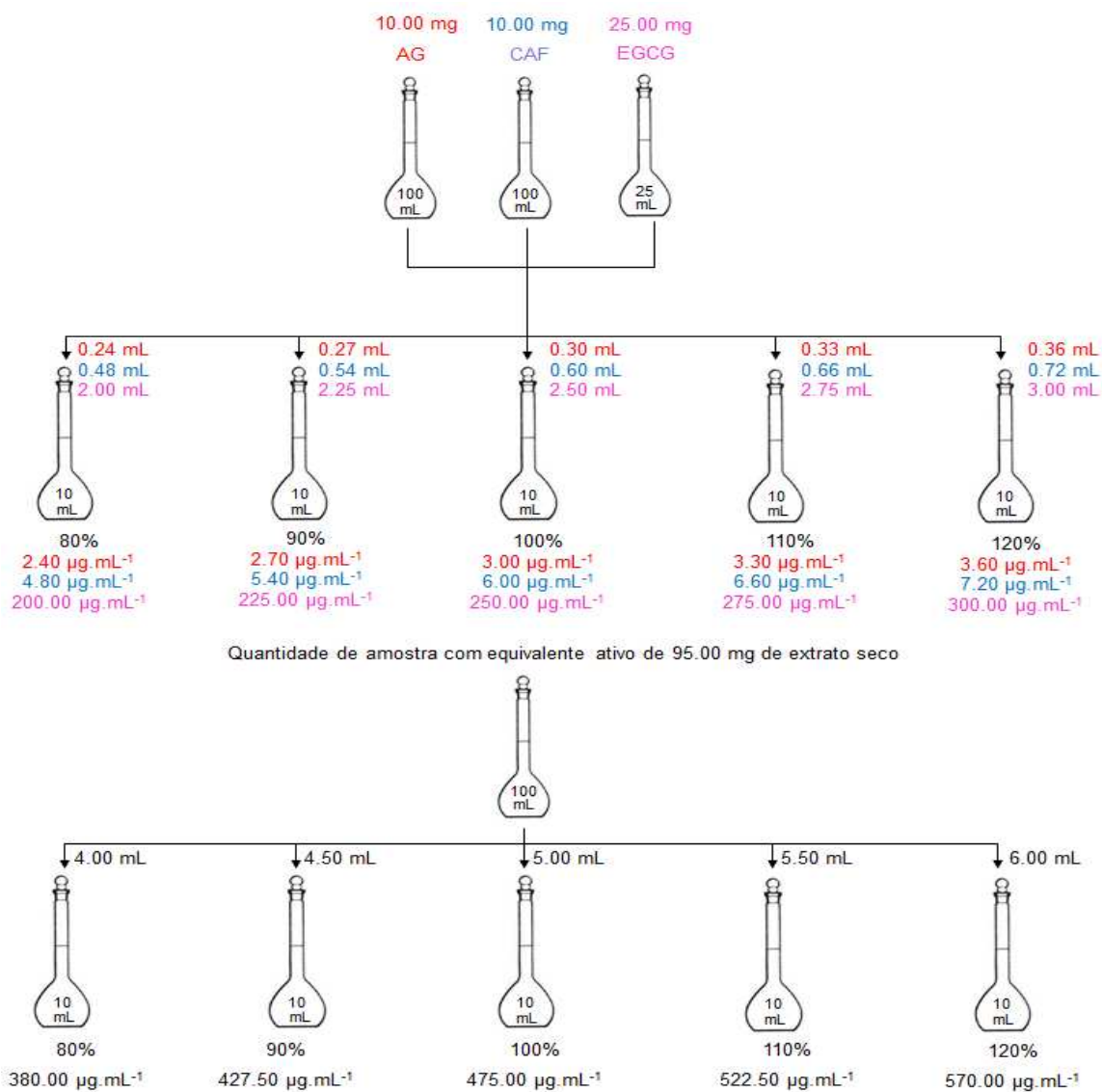


Figura 10. Diluições realizadas para a obtenção das soluções padrão e amostra nas concentrações de 80, 90, 100, 110 e 120%.

Quantidades exatamente pesadas de padrões foram dissolvidas e diluídas em diluentes apropriados para cada método (método para cápsula = água ultrapura; método para emulsão = diferentes fases móveis testadas) para obter soluções nas seguintes concentrações de trabalho: AG = $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, CAF = $6 \mu\text{g mL}^{-1}$, EGCG = $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para as amostras de cápsulas, uma quantidade de pó equivalente a 95.0 mg de extrato, presente no conteúdo de 20 cápsulas, foi submetida a infusão em água ultrapura fervente a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min e posteriormente diluída com água ultrapura a temperatura ambiente. Para a emulsão, uma quantidade de amostra com o equivalente ativo de 95.0 mg de extrato foi pesada e diluída em diferentes fases móveis testadas. A concentração de trabalho para as amostras foi de $475 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os placebos (cápsula = excipientes; emulsão = base contendo antioxidantes) foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados para as amostras.

Durante o preparo da primeira diluição, todas as soluções foram deixadas em banho de ultrassom (método para cápsulas = 15 min; método para emulsão = 30 min com aquecimento a 50°C) e filtradas em papel de filtro quantitativo. As soluções da segunda diluição foram filtradas em membrana de celulose regenerada (Macherey-Nagel, Alemanha) de $0.45 \mu\text{m}$ de porosidade e transferidas para *vials* cromatográficos para posterior injeção. Todas as soluções foram mantidas ao abrigo da luz durante as análises.

4.3.2 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatógrafo a líquido Young Lin (Coréia) calibrado e qualificado, equipado com: bomba quaternária (YL 9110), detector com DAD (YL9160), injetor automático (YL 9150), compartimento com forno para coluna (YL 9130) e sistema controlador (Clarity).

4.3.2.1 Método para cápsula

A separação cromatográfica foi atingida utilizando coluna octadecilsilano (C18) – 250 x 4.6 mm, com tamanho de partículas de 5 μm (Macherey-Nagel, Alemanha). A coluna foi conectada com uma pré-coluna C18, 4.0 x 3.0 mm, 5 μm (Phenomenex, USA). Com o intuito de minimizar tempo e reagente e otimizar os fatores do sistema cromatográfico, uma abordagem quimiométrica foi realizada, considerando o principal componente ativo (EGCG). Um planejamento experimental completo com 8 experimentos (2^3) e triplicata no ponto central foi utilizado, num total de 11 experimentos, realizados em ordem aleatória (MONTGOMERY, 2005). As variáveis consideradas foram: combinações de porcentagens de etanol (8, 10 e 12%) em fase móvel contendo 1% de ácido acético glacial, 3% de acetato de etila e água ultrapura qsp 100%; temperatura do compartimento da coluna (20, 25 e 30 $^{\circ}\text{C}$) e comprimento de onda (273, 278 e 283 nm) (Tabela 2). Durante os experimentos foram avaliados: teor de princípio ativo, capacidade da coluna, eficiência (número de pratos teóricos/metro), tempo de retenção e simetria do pico. O fluxo da fase móvel iniciou-se a 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo mantido por 12 minutos, e então aumentou linearmente para 1.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 5 min. Esse fluxo foi mantido por 11 min, e então diminuído para 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 5 min, sendo mantido por 2 min (tempo total de corrida: 35 min). O volume injetado das soluções foi de 20 μL .

4.3.2.2 Método para emulsão

O método para emulsão foi desenvolvido a partir das condições já estabelecidas para o método de cápsula. Apenas a forma de extração dos princípios ativos da formulação foi modificada de forma independente, sendo essas condições descritas no item 4.2.1. Um novo planejamento experimental completo com 8 experimentos (2^3) e triplicata no ponto central foi realizado e as variáveis consideradas foram: combinações de porcentagens de etanol (10, 12 e 14%) em fase móvel contendo 1% de ácido acético glacial, 3% de acetato de etila e água ultrapura qsp 100%; temperatura do compartimento da coluna (25, 30 e 45 $^{\circ}\text{C}$) e

tempo de ultrassom para a dissolução da amostra (20, 25 e 30 min) (Tabela 2). Durante os experimentos foram avaliados: teor de princípio ativo, capacidade da coluna, eficiência (número de pratos teóricos), tempo de retenção e simetria do pico. O fluxo da fase móvel e o volume das soluções injetadas foram realizados da mesma forma utilizada no método para cápsula.

Tabela 2. Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental realizado na otimização dos métodos para cápsula e emulsão.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Método para cápsula			
X ₁ : comprimento de onda (nm)	273	278	283
X ₂ : Temperatura do compartimento para a coluna (°C)	20	25	30
X ₃ : Etanol (%) na fase móvel	8	10	12
Método para emulsão			
X ₁ : tempo de ultrassom para a dissolução da amostra (min)	20	25	30
X ₂ : Temperatura do compartimento para a coluna (°C)	25	30	35
X ₃ : Etanol (%) na fase móvel	10	12	14

4.4 Validação dos métodos analíticos

Após o desenvolvimento e a otimização dos métodos, os testes de validação foram realizados segundo a resolução que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil, a Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Foram determinados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.

4.4.1 Especificidade

A especificidade foi obtida através da comparação entre os cromatogramas dos padrões, da amostra e do placebo. Para constatar a ausência de interferência do placebo no sinal de detecção dos constituintes bem como comparar os tempos de retenção dos padrões e da amostra, os cromatogramas foram sobrepostos.

4.4.2 Linearidade

O teste foi conduzido através da construção de três curvas analíticas cujas concentrações correspondem a 80, 90, 100, 110 e 120% da concentração das soluções de trabalho. As soluções foram preparadas em dias e horários diferentes e a curva foi construída com os valores experimentais das leituras realizadas ($n = 3$). Os dados de cada nível de concentração foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e submetidos ao método dos mínimos quadrados para determinar o coeficiente de correlação da curva analítica.

4.4.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através das curvas analíticas construídas e foram calculados a partir das Equações 2 e 3, respectivamente:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (3)$$

em que, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva analítica.

4.4.4 Precisão

O teste foi realizado para avaliar o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas. A repetibilidade (precisão intra-corrida) foi determinada pela análise de seis réplicas das soluções a 100% da concentração de trabalho, por um único analista, em um único dia. A repetibilidade intermediária (precisão inter-corrida) também foi realizada com seis réplicas, porém, por dois analistas e em dois dias. O coeficiente de variação entre os valores encontrados não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2003).

4.4.5 Exatidão

A exatidão foi realizada pelo teste de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas das SQTs na amostra. Foram obtidas as áreas dos picos da amostra e da amostra fortificada com as SQTs nas concentrações de 80, 100 e 120%, com três réplicas cada. O resultado foi expresso em porcentagem de recuperação (Equação 4), relacionando a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

$$Exatidão = \frac{\textit{concentração média experimental}}{\textit{concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

4.4.6 Robustez

Para avaliar a significância das variações realizadas deliberadamente em cada fator (X_1 , X_2 e X_3) (Tabela 2), seus efeitos foram calculados a partir do planejamento conduzido na otimização do método. A partir dos resultados obtidos para cada experimento, os coeficientes para a determinação do modelo estatístico foram calculados de acordo com a Equação 5 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010):

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y \quad (5)$$

onde, b é a matriz dos coeficientes do modelo, X é a matriz e y é o vetor. Para escrever a equação do modelo ajustado, os erros padrão dos coeficientes foram calculados a partir da Equação 6:

$$\varepsilon(b) = \sqrt{(X^t X)^{-1} \cdot \sigma^2} \quad (6)$$

onde, $\varepsilon(b)$ é a matriz cuja diagonal principal representa os erros padrão dos estimadores do modelo (b_i) e σ^2 é a variância populacional dos experimentos que pode ser estimada como S^2 , utilizando as réplicas do ponto central, a partir da Equação 7:

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \quad (7)$$

Os efeitos foram calculados na matriz pelo produto $X^t y$, onde y é um vetor coluna contendo a média dos resultados dos ensaios. Para estimar o erro-padrão de cada efeito, a raiz quadrada do valor obtido na Equação 8 foi utilizado e o erro-padrão da média foi estimado utilizando a raiz quadrada do valor obtido na Equação 9:

$$\hat{V}_{efeito} = \left(\frac{S^2}{2}\right) \quad (8)$$

$$\hat{V}_{média} = \left(\frac{S^2}{n}\right) \quad (9)$$

Com a estimativa dos erros-padrão, construíram-se intervalos de confiança para os valores dos efeitos usando a distribuição *t* de *Student's*, com 95% de confiança, pela Equação 10:

$$\hat{\eta} - t_v \cdot S_{(efeito)} < \eta < \hat{\eta} + t_v \cdot S_{(efeito)} \quad (10)$$

na qual, η representa o verdadeiro valor de um efeito (valor populacional); $\hat{\eta}$ representa o verdadeiro valor obtido a partir dos ensaios realizados no experimento; t_v a distribuição de *Student's*; $S_{(efeito)}$ o erro-padrão de um efeito.

A estabilidade das soluções analíticas foi ainda considerada como um dos critérios avaliados no estudo da robustez. As soluções das SQTs e da amostra foram construídas a 100% da concentração de trabalho, preparadas no diluente estabelecido para cada método e analisadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48h. Foram aplicadas as mesmas condições estabelecidas para os métodos, sendo o preparo das soluções e suas análises realizadas ao abrigo da luz e à temperatura de uma sala climatizada (aproximadamente 22 °C). Os resultados foram expressos em concentração de AG, CAF e EGCG, em cada tempo testado, e foram comparados com a concentração obtida na análise das soluções preparadas no tempo 0h, determinando o percentual de resposta em 48h.

4.5 Análise de amostras do mercado

Para verificar a aplicabilidade de um dos métodos estudados, foram analisadas três amostras de cápsulas magistrais de chá verde (dosagem de 500 mg). Estas foram denominadas de produtos A, B e C.

4.6 Seleção do meio receptor para os testes de liberação e de permeação

Para os testes de liberação e de permeação, foram testados meios receptores biorelevantes, com o intuito de determinar qual é o mais adequado para a solubilização de EGCG. O preparo do meio receptor foi de acordo com Baert e colaboradores (2010), e a composição exata dos mesmos (soluções aquosas) estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Composição dos meios biorelevantes utilizados para os testes de liberação e de permeação de EGCG.

Componentes	Tampão fosfato salino 0.01 M, pH 7.4 (mM)	Suor humano artificial (mM)	Fluido corporal simulado (mM)
NaCl	138.00	49.96	136.80
KCl	2.70	-	3.00
CaCl ₂	-	0.15	2.50
MgSO ₄	-	1.00	-
MgCl ₂	-	-	1.50
Na ₂ SO ₄	-	-	0.50
NaHCO ₃	-	-	4.20
KH ₂ PO ₄	1.43	7.50	1.00
Na ₂ HPO ₄	8.57	-	-

NaCl: cloreto de sódio; KCl: cloreto de potássio; CaCl₂: cloreto de cálcio; MgSO₄: sulfato de magnésio; MgCl₂: cloreto de magnésio; Na₂SO₄: sulfato de sódio; NaHCO₃: bicarbonato de sódio; KH₂PO₄: dihidrogenofosfato de potássio; Na₂HPO₄: hidrogenofosfato dissódico.

A solubilidade de EGCG foi determinada em seis diferentes meios (os meios descritos na Tabela 3 com ou sem o acréscimo de 5% de albumina sérica bovina). Foram exatamente pesados 10 mg de extrato seco de chá verde em seis diferentes tubos de vidro de 10 mL e cada meio receptor foi adicionado ao seu respectivo tubo.

Os tubos foram agitados durante 10 minutos, deixados em banho de ultrassom com aquecimento a 50 °C por 30 min e centrifugados a 890.21 g por 10 min. O sobrenadante foi diluído em meio receptor, numa proporção de 1/10, e foi transferido para *vials* cromatográficos para a quantificação de EGCG. O meio mais adequado foi definido como aquele que apresenta a melhor solubilização para EGCG. Para este meio, uma nova curva analítica foi construída a partir do extrato, utilizando as seguintes concentrações de EGCG: 20, 180, 340, 500, 660, 820, 980 e 1140 µg.mL⁻¹.

4.7 Teste de liberação *in vitro* de EGCG

O teste de liberação *in vitro* foi realizado em células de difusão vertical estáticas de 7 mL, com amostrador automático (Microette Plus[®], Hanson Research, USA). As membranas de polissulfona (25 mm de diâmetro, Tuffryn[®], Pall Corporation, EUA) foram previamente imersas em meio receptor para saturação por 30 min antes do experimento. A câmara receptora foi preenchida com o meio receptor e a membrana foi disposta na célula, evitando a formação de bolhas. Acima da membrana foi colocado um anel de teflon (150 mm de diâmetro interno) e este teve o seu orifício totalmente preenchido pela emulsão (n = 6). Uma dose infinita da formulação (300 mg) foi aplicada com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva calibrada Pos-D MR-110 (Rainin, EUA) e foi distribuída uniformemente com um bastão de vidro sobre a superfície da membrana. A área de difusão disponível foi de 1.86 cm². A formulação foi ocluída por disco de acrílico e o sistema foi fechado com uma garra metálica para evitar que o meio receptor evaporasse (Figura 11). O meio foi mantido a temperatura de 32 ± 2 °C durante todo o experimento, sob agitação (600 rpm) por meio de uma barra de agitação magnética. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos regulares de tempos (1, 2, 3, 4, 8 e 12 horas), recolhidas em vials cromatográficos e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas para o método de emulsão. Uma lavagem dos tubos de amostragem automática foi realizada com 1.5 mL do meio, 30 segundos antes de cada coleta, e a agitação foi interrompida durante esta lavagem. As alíquotas retiradas foram repostas a cada coleta com meio receptor, à mesma temperatura,

para manter o volume constante no interior das células. As concentrações correspondentes de EGCG foram corrigidas para estabelecer a quantidade real de fármaco difundida no tempo t ($Q_{real,t}$). Essa correção foi realizada considerando a Equação 11:

$$Q_{real,t} = C_{calculada} \cdot V_r \cdot V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (11)$$

onde: $C_{calculada,t}$ é a concentração da amostra determinada no tempo t , V_r é o volume da célula de difusão, V_a é o volume da alíquota e C_a é a concentração da alíquota. Os modelos matemáticos foram aplicados para determinar a cinética de difusão: quantidades cumulativas de difusão do fármaco por unidade de área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foram traçadas em função do tempo (h) para a cinética de ordem zero; quantidades cumulativas de difusão do fármaco por unidade de área ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foram traçadas em função da raiz quadrada do tempo para o modelo de Higuchi; e o logaritmo das quantidades cumulativas de difusão do fármaco por unidade de área ($\log \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi traçado em função do tempo (h) para a cinética de primeira ordem. Os coeficientes de determinação (R^2) foram calculados e aqueles modelos cujo valor foi maior que 0.99 foram considerados lineares. A partir da curva construída para o modelo que melhor representa a liberação de EGCG, foi considerado o coeficiente angular da mesma para calcular o fluxo de difusão do estado estacionário (J_s) e o seu tempo de latência (T_L) representou o tempo necessário para atingir o fluxo do estado estacionário.

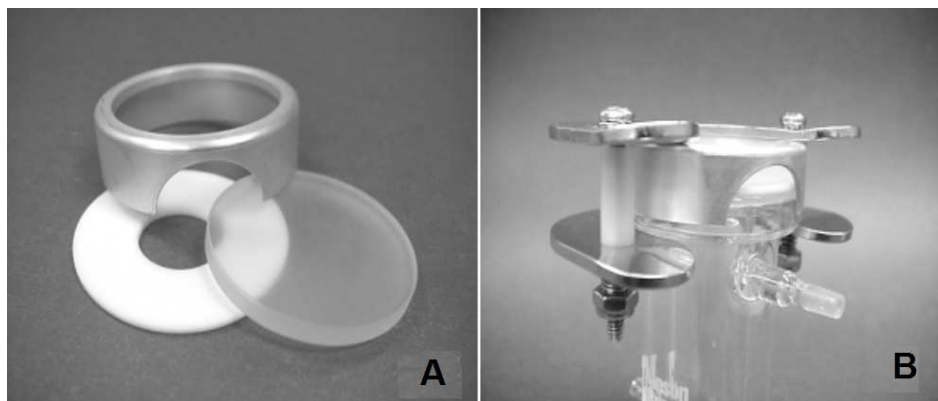


Figura 11. Montagem da parte superior da célula de Franz. A. anel de teflon branco, disco de acrílico e anel metálico para selagem. B. Célula selada com o auxílio de garra metálica. Fonte: BEMVINDO, 2006.

4.8 Preparo da pele humana

Pele humana da região abdominal foi obtida de um paciente que foi submetido à abdominoplastia (um doador: mulher de 48 anos, sem doença prévia de pele). A pele foi recolhida imediatamente após a cirurgia e inspecionada visualmente para assegurar que estava saudável e que não foi alterada pelas condições clínicas de remoção. O transporte do material foi realizado em menos de 30 min e o mesmo foi mantido em recipiente isotérmico a 4 °C. No laboratório, a gordura subcutânea e o tecido conjuntivo foram imediatamente removidos da pele com o auxílio de um bisturi (Figura 12). A pele foi lavada com água e solução salina, envolvida em Parafilm® e armazenada a -80 °C antes da utilização, num período inferior a 1 mês. A pele foi utilizada com sua espessura total. Foi retirada do freezer 10 min antes do uso para descongelar e foi cortada em forma de discos para serem encaixadas nas células de difusão vertical. Uma pré-avaliação de sua integridade foi realizada pelo controle da perda transepidermal de água (Vapometer®, Delfin, EUA). Este protocolo seguiu o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinque) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil (protocolo n. 01147112.5.0000.5147).

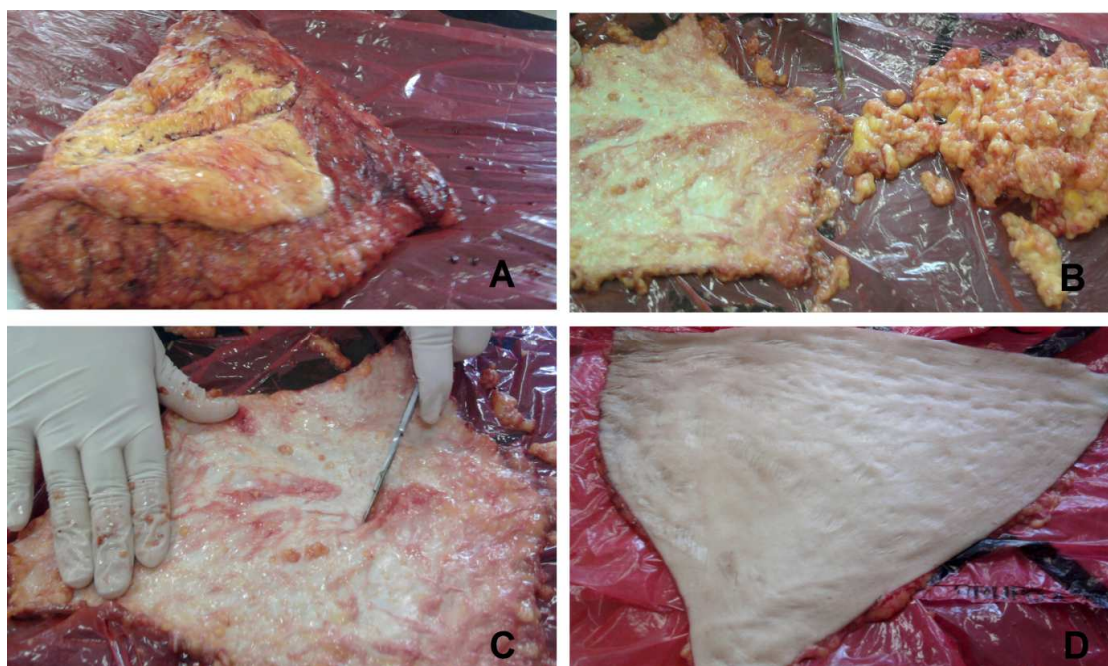


Figura 12. Limpeza da pele humana. **A.** Pele recém-obtida do procedimento cirúrgico. **B e C.** Retirada do excesso de gordura subcutânea. **D.** Segmento de pele limpo obtido.

4.9 Estudo de permeação cutânea de EGCG

As células de difusão foram montadas da mesma forma realizada no estudo de liberação *in vitro*, descrito no item 4.6. Após o descongelamento, os segmentos de pele foram adicionados à célula, com o estrato córneo (SC) faceando o compartimento doador e a derme em contato com a solução receptora, evitando-se sempre a formação de bolhas. Desta forma, a pele ficou em contato com o meio receptor por 30 min antes do experimento. O meio receptor foi mantido sob agitação (600 rpm) por meio de uma barra de agitação magnética, à temperatura de 32 ± 2 °C, durante todo o experimento. Uma dose finita da formulação (10 mg) foi aplicada com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva calibrada (n = 6) e foi distribuída uniformemente com um bastão de vidro sobre a superfície da pele. A área de difusão disponível foi de 1.86 cm². Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos regulares (1, 2, 3, 4, 8 e 12h), recolhidas em vials cromatográficos e submetidas à análise por CLAE.

Após espalhar a formulação na pele, os bastões de vidro foram mergulhados em tubos cônicos de polipropileno de 10 mL contendo 3 mL de fase móvel e deixados em banho de ultrassom por 30 min. As soluções obtidas foram filtradas em membranas de 0.45 µm e analisadas por CLAE. A dose efetiva aplicada foi determinada por subtração da quantidade de material retido a partir da dose aplicada.

4.9.1 Retenção de EGCG na pele

Após os experimentos de permeação, cada disco de pele foi retirado das células para analisar a retenção de EGCG em suas camadas. O estrato córneo foi separado do conjunto derme/epiderme utilizando a técnica do *tape stripping*. Fitas adesivas do tipo Schoth 3M (25 x 25 mm²) foram aderidas, consecutivamente, na área exposta ao produto, até que todas as camadas de células viáveis do estrato córneo fossem retiradas (aproximadamente 20 fitas). As fitas foram colocadas em tubos cônicos de polipropileno de 10 mL contendo 3 mL de fase móvel. O restante

da pele foi picotado e, da mesma forma que as fitas, foi colocado em tubos cônicos contendo 3 mL de fase móvel. Os tubos foram deixados em banho de ultrassom por 30 min e as soluções obtidas foram filtradas em membranas de 0.45 μm , transferidas para *vials cromatográficos* e analisadas por CLAE. As concentrações de EGCG foram corrigidas para todas as diluições.

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento dos métodos analíticos

Um dos parâmetros avaliados no desenvolvimento foi o comprimento de onda. A varredura realizada na região do ultravioleta em detector com arranjo de fotodiodo está esquematizada na Figura 13.

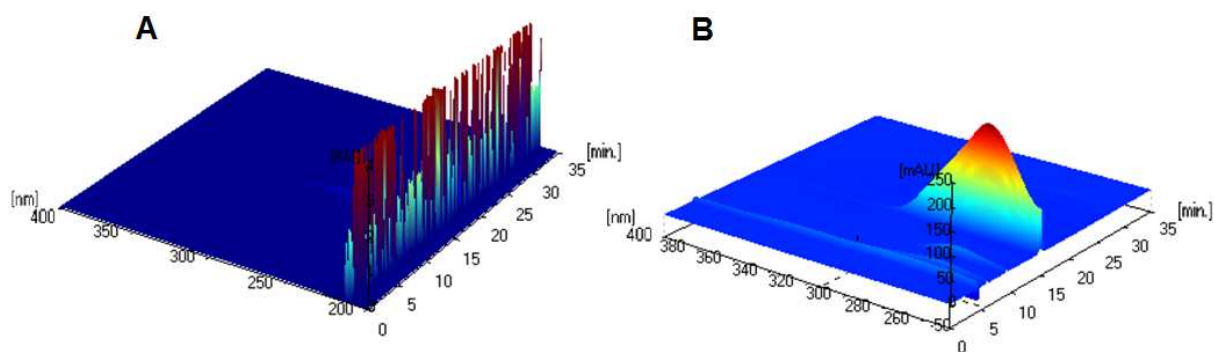


Figura 13. Cromatogramas tridimensionais das soluções dos padrões, obtidos através da varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm (A) e 245 a 400 nm (B).

Os métodos foram otimizados a partir do planejamento fatorial. A matriz X, bem como as respostas obtidas para o teor, o tempo de retenção, a eficiência (número de pratos teórico/metro), a capacidade e a simetria do pico podem ser visualizados nas Tabelas 4 e 5. As condições finais estabelecidas para os métodos após a otimização estão representadas na Tabela 6.

Tabela 4. Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições analíticas do método para cápsula.

Ensaio	Média	Matriz X							Vetores y (respostas para EGCG)				
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₁₂	X ₁₃	X ₂₃	X ₁₂₃	Teor %	TR	N	K'	S
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	40.62	31.40	48682	9.57	1.127
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	41.54	30.00	49214	9.10	1.103
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	41.04	23.60	54305	6.95	1.091
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	41.46	23.44	51392	6.89	1.091
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	42.78	18.42	43994	5.20	1.126
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	41.06	18.34	47371	5.18	1.109
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	41.55	14.67	44671	3.94	1.160
8	1	1	1	1	1	1	1	1	42.88	14.54	44833	3.90	1.158
9	1	0	0	0	0	0	0	0	40.56	21.05	48474	6.09	1.106
10	1	0	0	0	0	0	0	0	41.02	21.05	48474	6.09	1.101
11	1	0	0	0	0	0	0	0	40.45	21.06	49278	6.09	1.084

Todos os experimentos apresentaram valores dentro do esperado para a capacidade da coluna (>2.0), simetria do pico (>1.0) e eficiência da coluna (número de pratos teóricos/metro > 2000).

X₁: comprimento de onda (nm), (-1): 273; (0): 278; (+1): 283

X₂: temperatura do compartimento da coluna (°C), (-1): 20; (0): 25; (+1): 30.

X₃: Etanol (%) na fase móvel, (-1): 8; (0): 10; (+1): 12.

TR: tempo de retenção (min).

N.: número de pratos teóricos/metro.

K': fator capacidade da coluna.

S: simetria do pico.

Tabela 5. Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as condições analíticas do método para emulsão.

Ensaio	Média	Matriz X							Vetores y (respostas para EGCG)				
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₁₂	X ₁₃	X ₂₃	X ₁₂₃	Teor %	TR	N	K'	S
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	32.87	21.85	38641	6.36	1.239
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	36.54	20.09	44168	5.76	1.163
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	35.94	16.80	63731	4.66	1.245
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	38.29	16.94	60827	4.70	1.207
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	34.96	16.67	27497	4.61	1.344
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	39.68	16.67	28265	4.61	1.352
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	35.68	12.36	22258	3.16	1.206
8	1	1	1	1	1	1	1	1	38.48	12.43	20714	3.19	1.219
9	1	0	0	0	0	0	0	0	39.75	15.33	48782	4.16	1.337
10	1	0	0	0	0	0	0	0	39.91	15.33	48803	4.16	1.259
11	1	0	0	0	0	0	0	0	40.10	15.26	49339	4.14	1.271

Todos os experimentos apresentaram valores dentro do esperado para a capacidade da coluna (>2.0), simetria do pico (>1.0) e eficiência da coluna (número de pratos teóricos/metro > 2000).

X₁: tempo de ultrassom para dissolução da amostra (min), (-1): 25; (0): 30; (+1):35.

X₂: temperatura do compartimento da coluna (°C), (-1): 25; (0): 30; (+1): 35.

X₃: Etanol (%) na fase móvel, (-1): 10; (0): 12; (+1): 14.

TR: tempo de retenção.

N.: número de pratos teóricos/metro.

K': fator capacidade da coluna.

S: simetria do pico.

Tabela 6. Condições estabelecidas para os métodos de análise de cápsula e emulsão.

Métodos	Condições finais selecionadas para os métodos
Cápsula	
Preparo das soluções das SQT	Diluyente: água ultrapura (15 min em banho de ultrassom)
Preparo das soluções da amostra	Diluyente: 5 min de infusão com água ultrapura fervente a 95 °C e diluição com água ultrapura em temperatura ambiente (15 min em banho de ultrassom).
Emulsão	
Preparo das soluções das SQT e da amostra	Diluyente: fase móvel (30 min em banho de ultrassom com aquecimento a 50 °C).
Cápsula e emulsão	
Concentração de trabalho das soluções obtidas	AG: 3 µg.mL ⁻¹ ; CAF: 6 µg.mL ⁻¹ ; EGCG: 250 µg.mL ⁻¹ ; Amostra: 475 µg.mL ⁻¹
Coluna cromatográfica	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Temperatura do compartimento da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	283 nm
Composição da fase móvel	Água: etanol: acetato de etila: ácido acético (84: 12: 3: 1, v/v/v/v)
Fluxo da fase móvel	O fluxo inicia a 0.7 mL.min ⁻¹ e é mantido por 12 min, e então aumenta linearmente para 1.4 mL.min ⁻¹ em 5 min. Este fluxo é mantido por 11 min, diminuído para 0.7 mL.min ⁻¹ em 5 min e mantido por mais 2 min.
Tempo total de corrida	35 minutos

5.2 Validação dos métodos analíticos

A especificidade dos métodos pode ser avaliada através da análise dos cromatogramas representados nas Figuras 14 e 15.

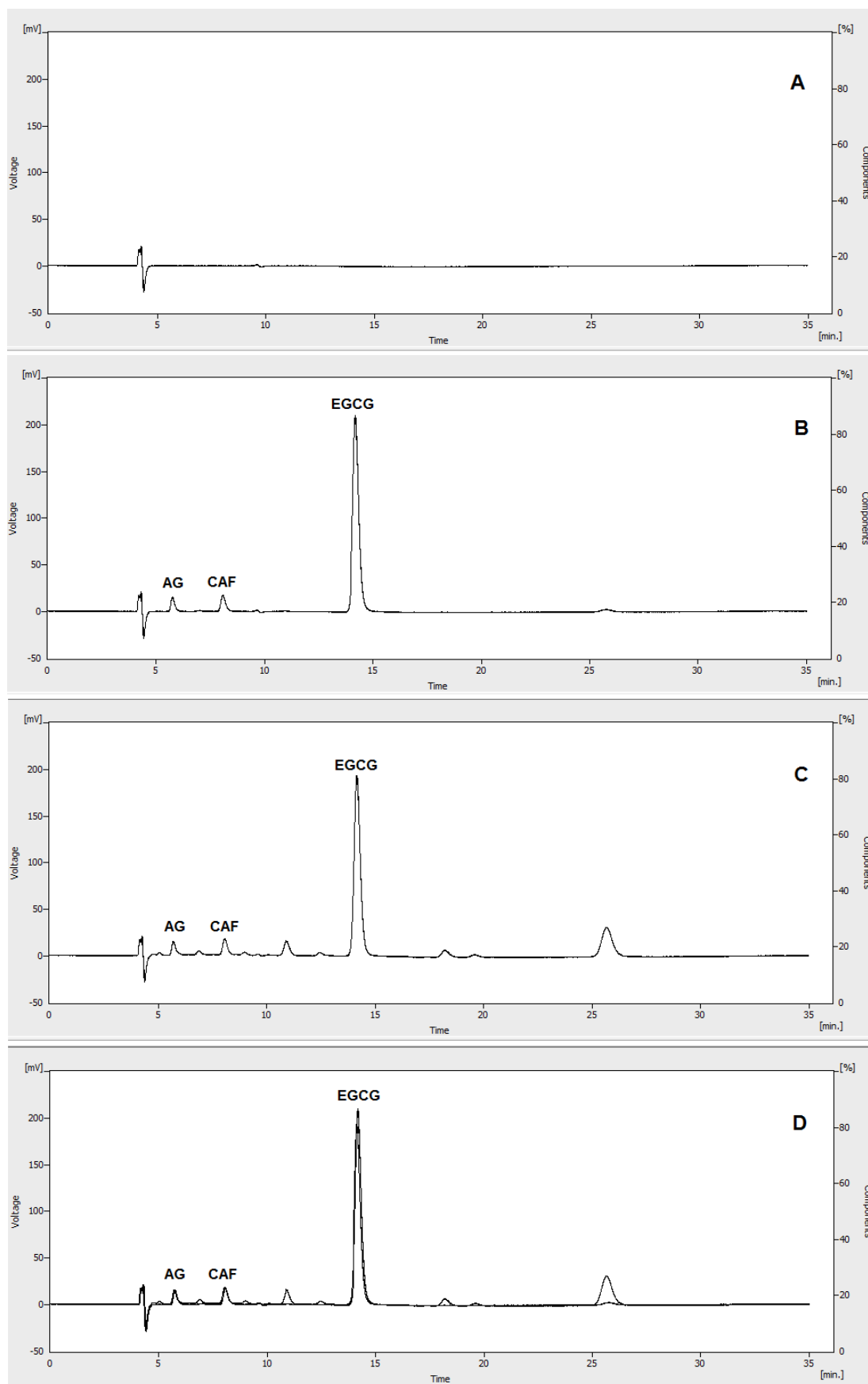


Figura 14. Perfis cromatográficos obtidos no teste de especificidade do método para cápsula. Perfis cromatográficos de: A, placebo; B, SQTs AG, CAF e EGCG; C, amostra e D, sobreposição de SQTs e amostra.

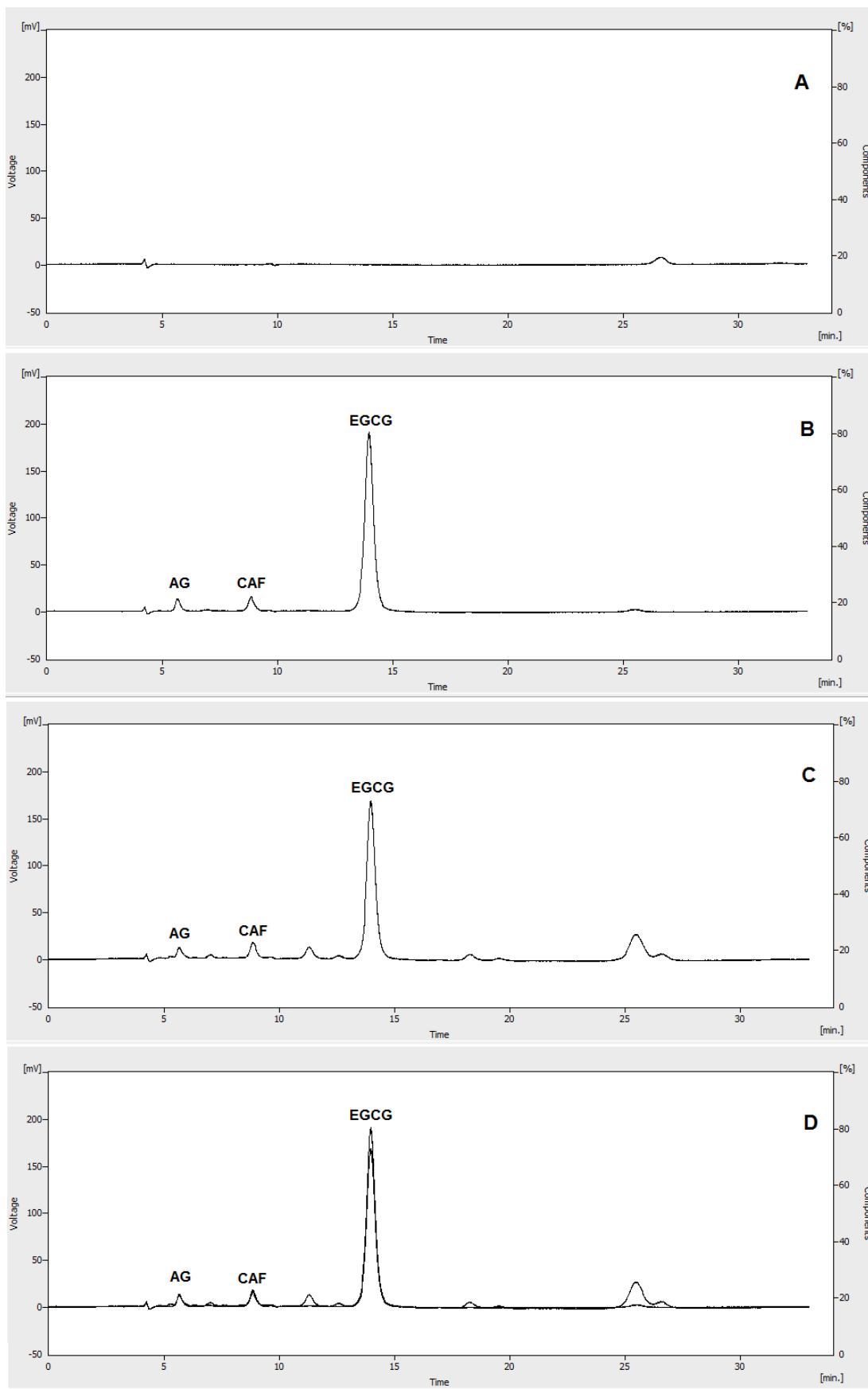


Figura 15. Perfis cromatográficos obtidos no teste de especificidade do método para emulsão. Perfis cromatográficos de: A, placebo; B, SQTs AG, CAF e EGCG; C, amostra e D, sobreposição de SQTs e amostra.

Os dados obtidos para as curvas analíticas/linearidade dos métodos e da liberação de EGCG *in vitro*, bem como os limites de detecção e de quantificação calculados encontram-se na Tabela 7, enquanto os resultados para os testes de precisão e exatidão são apresentados na Tabela 8.

Tabela 7. Resultados para os testes de linearidade, LD e LQ.

Componente	Equações da regressão linear	R ²	F _{cal} Regressão	F _{cal} Falta de ajuste	LD (µg.mL ⁻¹)	LQ (µg.mL ⁻¹)
Cápsulas						
<u>Padrão</u>						
AG ^a	y = 53282.89x+30448.09	0.991	1489.21 ^e	1.71 ^g	0.64	2.14
CAF ^b	y =47856.08x-18038.47	0.995	2659.99 ^e	3.70 ^g	0.62	2.06
EGCG ^c	y =26919.07x-1395514.21	0.992	1565.53 ^e	3.40 ^g	15.87	52.90
<u>Amostra</u>						
AG ^a	y = 39262.81x+47493.60	0.994	2177.97 ^e	1.65 ^g	0.32	1.08
CAF ^b	y =29324.67x+69236.50	0.993	1915.95 ^e	2.46 ^g	1.05	3.50
EGCG ^c	y =20339.75x-164871.00	0.995	2819.47 ^e	0.95 ^g	10.66	35.52
Emulsão						
<u>Padrão</u>						
AG ^a	y =83903.95x-68808.96	0.994	2077.62 ^e	0.47 ^g	0.54	1.80
CAF ^b	y =52061.58x-32364.14	0.992	1572.66 ^e	3.63 ^g	0.67	2.22
EGCG ^c	y =25479.36x-645646.20	0.994	2045.60 ^e	3.70 ^g	6.84	22.78
<u>Amostra</u>						
AG ^a	y =53992.44x-7001.74	0.991	1496.37 ^e	2.57 ^g	0.20	0.65
CAF ^b	y =66620.62x-27290.56	0.993	1987.30 ^e	0.39 ^g	0.88	2.95
EGCG ^c	y =24206.79x-304016.95	0.994	2198.98 ^e	2.77 ^g	11.30	37.65
Liberação do fármaco <i>in vitro</i>						
EGCG ^d	y =28128.12x-669142.36	0.997	7412.93 ^f	1.91 ^h	5.15	17.17

n=3; R²= coeficiente de determinação.

Intervalo (µg.mL⁻¹): ^a(2.4-3.6), ^b(4.8-7.2), ^c(200-300), ^d(20-1140).

ANOVA: F_{crítico} da regressão ^e(4.67), ^f(4.30); F_{crítico} da falta de ajuste ^g(3.71); ^h(2.74).

Tabela 8. Resultados para os testes de precisão e exatidão.

Parâmetro		Valor						Especificação
		Cápsulas			Emulsão			
		AG	CAF	EGCG	AG	CAF	EGCG	
Precisão								
CV (%) Intra-dia, Primeiro dia	n = 12	1.48	1.14	0.39	1.75	1.09	1.36	
CV (%) Intra-dia, Segundo dia	n = 12	2.35	1.05	2.34	1.94	1.91	0.67	CV ≤ 5%
CV (%) Inter-dias	n = 24	2.86	1.24	1.96	2.04	2.39	1.44	
Exatidão								
Recuperação média (%)	n = 15	99.61	98.39	101.17	99.26	99.25	98.82	98.0-102.0%

CV: coeficiente de variação.

O estudo conduzido para a robustez está apresentado na Tabela 9 através dos valores calculados para os principais efeitos e o efeito da interação entre os fatores do planejamento experimental. Na Tabela 10 encontram-se os resultados para os testes de estabilidade das soluções analíticas.

Tabela 9. Fatores do planejamento experimental conduzido para o estudo da robustez e seus respectivos efeitos e erros-padrão calculados para o teor de EGCG.

	EGCG cápsula	EGCG emulsão
Média:	41.359 ± 0.091	37.473 ± 0.053
Principais efeitos:		
X ₁ Comprimento de onda (cápsulas)		
Tempo de ultrassom (emulsão)	0.234 ± 0.214	3.385 ± 0.124
X ₂ temperatura do forno	0.238 ± 0.214	1.085 ± 0.124
X ₃ Etanol (%) na fase móvel	0.901 ± 0.214	1.290 ± 0.124
Interações de dois fatores:		
X ₁₂	0.637 ± 0.214	-0.810 ± 0.124
X ₁₃	-0.432 ± 0.214	0.375 ± 0.124
X ₂₃	0.062 ± 0.214	-1.325 ± 0.124
Interações de três fatores:		
X ₁₂₃	0.887 ± 0.214	-0.150 ± 0.124
t_v x S(efeito)	0.922	0.533

Os números em negrito representam efeito estatístico significativo.

Tabela 10. Resultados para o teste de estabilidade das soluções analíticas

Análitos	Concentração em solução ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					% Resposta em relação ao tempo 0h	Teor em 0h (%)	Teor em 48h (%)
	0h	6h	12h	24h	48h			
Cápsulas								
<u>SQTs</u>								
AG	4.14	4.04	3.63	4.38	4.70	113.57	-----	-----
CAF	6.78	6.70	6.65	6.54	6.53	96.42	-----	-----
EGCG	211.52	210.12	201.76	199.86	201.23	95.14	-----	-----
<u>Amostra</u>								
AG	5.90	5.65	4.87	6.20	6.70	113.58	0.75	0.75
CAF	8.86	6.57	8.48	8.31	8.04	90.69	1.35	1.30
EGCG	210.91	208.47	197.86	193.82	194.92	92.42	42.70	42.04
Emulsão								
<u>SQTs</u>								
AG	3.69	3.72	3.72	3.87	3.94	106.74	-----	-----
CAF	6.76	6.75	6.69	6.56	6.36	94.11	-----	-----
EGCG	179.02	179.08	178.83	178.14	178.65	99.80	-----	-----
<u>Amostra</u>								
AG	4.55	4.50	4.30	4.58	4.96	108.88	0.66	0.66
CAF	4.87	4.86	4.79	4.70	4.53	92.92	1.28	1.27
EGCG	198.34	183.31	183.26	182.66	182.27	91.90	39.50	39.36

5.3 Análise de amostras do mercado

As soluções obtidas a partir do extrato e das cápsulas magistrais (Produtos A, B e C), bem como o aspecto do pó de seu conteúdo podem ser observados na Figura 16. Os teores de AG, CAF e EGCG nas amostras analisadas e as especificações encontram-se na Tabela 11 e os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 17.



Figura 16. Soluções obtidas a partir do extrato seco e dos produtos A, B e C analisados.

Tabela 11. Teores calculados para todos os produtos testados e as especificações para cada analito.

Analitos	Extrato validado	Produto A	Produto B	Produto C	Especificações USP	Especificações do fabricante do extrato validado
AG	0.80 %	nd	0.24 %	Nd	$\leq 1\%$	-----
CAF	1.54 %	0.88%	7.91 %	Nd	$\leq 0.1\%^*$	$\leq 2\%$
EGCG	42.88 %	0.61%	13.64 %	Nd	$\geq 40\%$	$\geq 40\%$

*Especificação para extrato seco de chá verde descafeinado. nd = não detectado.

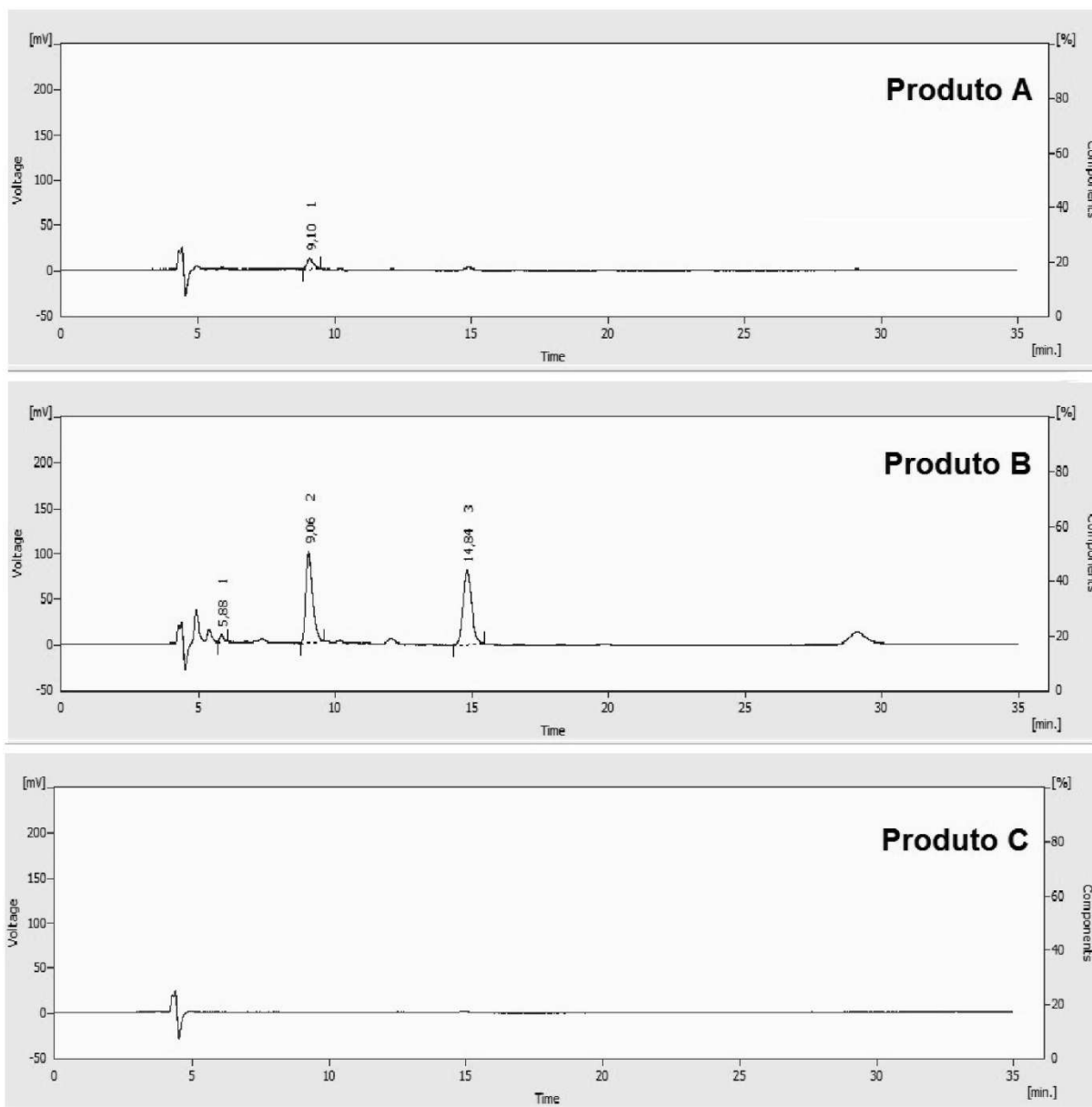


Figura 17. Cromatogramas obtidos a partir das análises dos produtos A, B e C.

5.4 Seleção do meio receptor para os testes de liberação e de permeação

A solubilidade máxima obtida para EGCG em cada meio receptor e o aspecto das soluções obtidas durante a seleção do meio podem ser observados na Tabela 12 e na Figura 18, respectivamente.

Tabela 12. Resultados da solubilidade máxima de EGCG nos meios receptores logo após o preparo

Meio receptor	Solubilidade de EGCG ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solubilidade de EGCG (%)
Tampão fosfato salino pH 7.4	99.42	47.02
Tampão fosfato salino pH 7.4 + 5% albumina sérica bovina	140.99	67.95
Suor humano artificial	216.92	100.68
Suor humano artificial + 5% albumina sérica bovina	173.01	85.86
Fluido corporal simulado	38.01	18.87
Fluido corporal simulado + 5% albumina sérica bovina	8.11	3.73

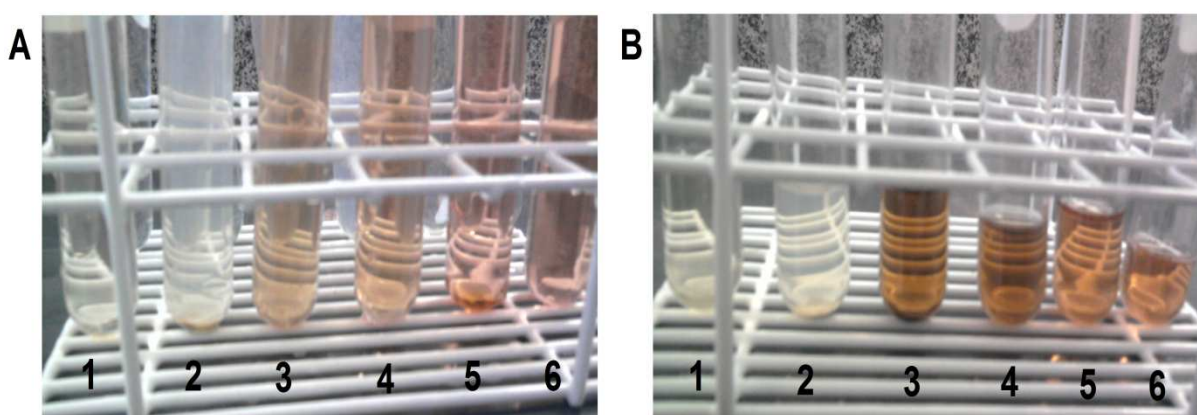


Figura 18. Soluções obtidas durante a seleção do meio receptor. A: após o preparo; B: 12 h após o preparo; 1: Suor humano artificial; 2: . Suor humano artificial + 5% albumina sérica bovina; 3: Fluido corporal simulado; 4: Fluido corporal simulado + 5% albumina sérica bovina; 5. Tampão fosfato salino pH 7.4; 6. Tampão fosfato salino pH 7.4 + 5% albumina sérica bovina.

5.5 Teste de liberação *in vitro* de EGCG

O teste de liberação *in vitro* foi avaliado pelo perfil de liberação de EGCG (Gráfico 1) e pela cinética de difusão determinada pelos modelos matemáticos aplicados (Tabela 13).

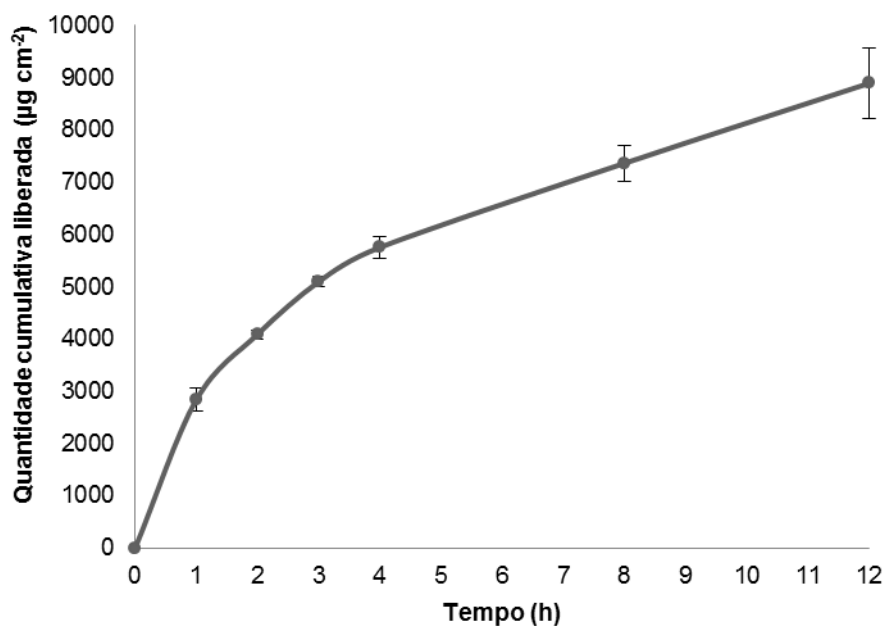


Gráfico 1. Perfil de liberação de EGCG. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$).

Tabela 13. Modelagem matemática para a cinética de liberação *in vitro* de EGCG

Formulação	Modelo Matemático	Equação	R ²	J _s (µg cm ⁻² h ⁻¹)	T _L (h)
Emulsão	Ordem zero	$y = 509.11x + 3127.8$	0.945	2382.8	0.09
	Higuchi	$y = 2382.8x + 733.38$	0.991		
	Primeira ordem	$y = 0.0389x + 3.5301$	0.839		

R²: coeficiente de determinação. J_s: fluxo de difusão do estado estacionário. T_L: tempo de latência. Resultados expressos como média de seis réplicas.

5.6 Estudo de permeação cutânea de EGCG

No presente trabalho, os valores referentes à distribuição de EGCG durante a permeação estão descritos na Tabela 14, sendo o balanço de massas ilustrado na Gráfico 2.

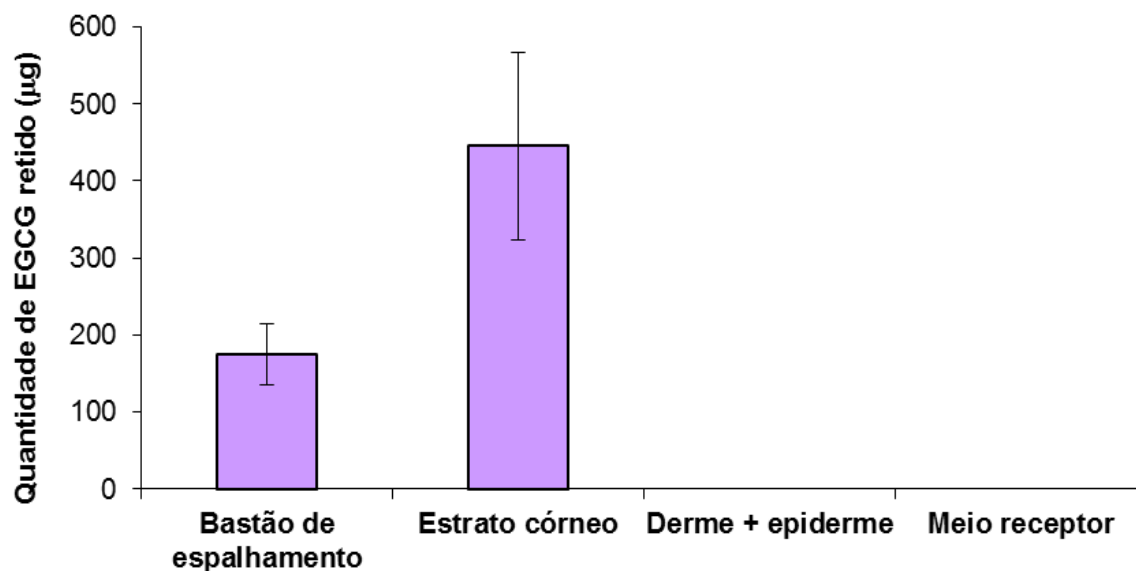


Gráfico 2. Balanço de massas da permeação de EGCG.

Tabela 14. Balanço de massas da permeação de EGCG.

Parâmetro	EGCG
Quantidade teórica de EGCG aplicada na pele (μg) ^a	600
Quantidade de EGCG retida no bastão de espalhamento	174.91
Quantidade de EGCG real aplicada na pele (μg) ^b	425.09
Quantidade total permeada após 12 h (μg) ^c	0
EGCG retido no estrato córneo (μg) ^d	445.52
Porcentagem de permeação por dose (%) ^e	0
Total de recuperação (%) ^f	103.41

^a Quantidade total de EGCG presente na formulação aplicada no compartimento doador (5.38 mg. cm^{-2}).

^b Quantidade teórica total (*a*) menos a quantidade retida no bastão de espalhamento.

^c EGCG no meio receptor + derme + epiderme.

^d EGCG no estrato córneo.

^e Estimativa matemática do total de EGCG que poderia permear a pele de acordo com a quantidade aplicada $[(c/b) \times 100]$

^f Razão entre EGCG quantificado no bastão de espalhamento, na pele e no meio receptor pela quantidade total aplicada (*a*).

6 DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento dos métodos analíticos

Para verificar a viabilidade de alguns métodos presentes na literatura, as condições utilizadas por Wang, Helliwel e You (2000); Souza (2007); Yang, Hwang e Lin (2007); Sander e colaboradores (2011) e USP (2011) (Tabela 1, pág. 30) foram testadas, mas nenhuma delas foi reprodutível. Após esses testes, foi realizado o desenvolvimento de um novo método analítico.

O desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização de várias etapas assim como o preparo da amostra para a separação e a quantificação dos constituintes. Parâmetros como coluna cromatográfica, fase móvel, fluxo e comprimento de onda de detecção devem ser pré-selecionados com discricção (GROSSI et al., 2013).

A primeira etapa do desenvolvimento foi representada pelo estudo da solubilidade das amostras. O extrato de chá verde foi facilmente solúvel em água. Uma vez que infusões a temperaturas entre 85 e 100 °C são consideradas como a melhor forma de extração de EGCG, CAF e AG a partir do chá (YANG; HWANG; LIN, 2007), o conteúdo das cápsulas foi preparado a partir de infusões com água ultrapura fervente a 95 °C por 5 min, mimetizando, assim, a real forma de preparo dos chás. Apenas 15 min em banho de ultrassom foram necessários para a extração dos princípios ativos. Contudo, para a emulsão, a extração dos constituintes de interesse foi considerada adequada somente após a solubilização da formulação em fase móvel, com subsequente uso do banho de ultrassom com aquecimento a 50 °C por 30 min. Esta extração foi avaliada através de uma análise visual das soluções e da quantificação dos constituintes a cada tentativa de extração realizada (tempos de 5, 10, 15 e 20 min em banho de ultrassom, com ou sem o aquecimento).

As separações cromatográficas foram atingidas utilizando fase inversa, com coluna de sílica ligada quimicamente a grupos C18. Acetonitrila e metanol são os solventes mais comumente utilizados em CLAE de fase inversa, sendo frequentemente reportados para as análises de catequinas no chá verde

(NISHITANI; SAGESAKA, 2004; SAITO et al., 2006; YANG et al., 2007), mas possuem vários inconvenientes do ponto de vista ambiental e toxicológico (GONZALEZ-RUIZ et al., 2011).

A acetonitrila não é um recurso renovável e é considerada pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA como uma substância química tóxica tanto na forma líquida quanto de vapor. Além disso, requer um tratamento químico especial para os seus resíduos. Tentativas têm sido realizadas para trocar a acetonitrila na fase móvel por metanol, mas este ainda é altamente tóxico para os seres humanos e provoca efeitos nocivos na vida aquática (ROJANARATA, 2012).

Diante desses problemas, é necessário considerar a substituição da acetonitrila e do metanol por solventes mais seguros e ecologicamente aceitos. O etanol, por exemplo, é reconhecido por ser “eco-friendly” devido à sua biodegradabilidade e à origem de sua biomassa, sendo esta obtida a partir de matérias-primas agrícolas. Ele é menos prejudicial ao meio ambiente bem como para a saúde humana, e a gestão de seus resíduos é mais fácil e menos onerosa (CLARK; TAVENER, 2007).

Alternativamente, uma fase móvel mais ecologicamente correta foi proposta, empregando o etanol como um solvente orgânico menos tóxico, em maior proporção de água. Uma mistura de etanol: água (10:90, v/v) foi usada como teste inicial para a fase móvel. Esta condição promoveu uma separação razoável das substâncias de interesse, mas alguns picos não foram completamente separados até a acidificação da fase móvel com 1% de ácido acético glacial (pH entre 2.5 e 3.0). Ao sistema etanol, água e ácido acético, foram então adicionados 3% de acetato de etila, uma vez que este é considerado um dos solventes orgânicos industriais menos tóxicos, que atualmente pode ser obtido a partir do etanol (WINOTAPUN et al., 2013). Esta condição diminuiu o tempo de corrida de 160 para 90 min e melhorou a resolução dos picos.

As condições citadas anteriormente foram testadas considerando uma temperatura do forno de 25 °C e um sistema de eluição isocrática com um fluxo de 0.7 mL.min⁻¹. Fluxos maiores que este foram testados, mas provocavam a co-eluição de substâncias no início da corrida cromatográfica. O fluxo foi então otimizado para diminuir o tempo de corrida. Esse foi aumentado para 1.4 mL.min⁻¹ durante a análise, sendo diminuído novamente para 0.7 mL.min⁻¹ no final da corrida. Criou-se assim, um gradiente de fluxo e um tempo de corrida de 55 min.

Os comprimentos de onda entre 210 e 230 nm ou entre 270 e 280 nm são geralmente utilizados para a detecção de catequinas e CAF em amostras de chá verde (NISHITANI; SAGESAKA, 2004). Uma varredura espectrofotométrica entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm foi realizada (Figura 13, pág. 58). Nos comprimentos de onda entre 210 e 230 nm, AG, CAF e EGCG mostraram forte absorção. Contudo, a linha de base dos cromatogramas também aumentou, mostrando alta absorção da fase móvel. Dessa forma, foi inicialmente selecionado o comprimento de onda de 278 nm para a detecção. Este foi o comprimento de absorção máxima para EGCG, sendo também utilizado pelo método oficial da USP. Uma vez que AG, CAF e EGCG demonstraram boa absorção para a análise entre os comprimentos de 273 e 283, esta faixa (278 ± 5 nm) foi selecionada para fazer alterações no método para cápsula durante o planejamento experimental (Tabela 2, pág. 47).

As seguintes condições iniciais foram definidas para a otimização do método para cápsula: pré-coluna e coluna C18; volume de injeção = 20 μ L; fase móvel contendo 10% de etanol, gradiente de fluxo, temperatura do forno de 25 °C e detecção por espectrofotometria em 278 nm. O planejamento experimental realizado baseou-se em variações de cada parâmetro testado para obter o melhor resultado para EGCG. De acordo com a Tabela 4 (pág. 60), os experimentos 5 e 8 apresentaram as melhores respostas para o teor de EGCG (maior que 42%), porém, 8 apresentou o menor tempo de retenção, maior eficiência e melhor simetria, sendo as suas condições escolhidas para o método de cápsulas.

O método para emulsão foi então desenvolvido a partir do método selecionado para cápsula e as condições iniciais utilizadas para a otimização foram: pré-coluna e coluna C18; volume de injeção = 20 μ L; fase móvel contendo 12% de etanol, gradiente de fluxo, temperatura do forno de 30 °C e detecção por espectrofotometria em 283 nm. De acordo com o novo planejamento experimental realizado (Tabela 5, pág. 60), os experimentos 6, 9, 10 e 11 apresentaram as melhores respostas para o teor de EGCG (maior que 39%). Porém, os experimentos do ponto central (9, 10 e 11) apresentaram o menor tempo de retenção e a melhor eficiência.

Após a seleção das melhores condições apresentadas nos experimentos, os métodos foram definidos de acordo com as informações presentes na Tabela 6 (pág. 61).

A USP recomenda que o extrato seco de chá verde contenha não menos que 40% de EGCG e não mais que 1% de AG e o fabricante do extrato recomenda que o conteúdo de CAF não seja maior que 2%. O extrato encontra-se dentro das especificações recomendadas (42.88% de EGCG, 0.80% de AG e 1.54% de CAF) e, de acordo com a porcentagem de extrato utilizado na manipulação (15%), podemos dizer que a emulsão apresenta os seguintes valores rotulados: 64.32 mg, 1.2 mg e 2.31 mg de EGCG, AG e CAF, respectivamente, em cada 1000 mg de emulsão. O método desenvolvido foi capaz de quantificar 59.88 mg, 1.05 mg e 1.86 mg, isto é, 93.1, 87.50 e 80.52% dos valores rotulados de EGCG, AG e CAF, respectivamente.

6.2 Validação dos métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico necessita ser avaliado para estimar a sua eficiência durante a rotina laboratorial. Dessa forma, faz-se necessária a sua validação para garantir a eficiência dos resultados emitidos durante as análises e gerar confiança na aprovação ou reprovação de amostras (ROSA et al., 2012). Para assegurar a confiabilidade nos resultados, o método deve apresentar especificidade, linearidade, LD e LQ, precisão, exatidão, robustez e os constituintes de interesse devem ser estáveis às condições estabelecidas pelo método no tempo necessário para as análises (BRASIL, 2003).

Utilizando as condições estabelecidas, os estudos de validação foram realizados. Com relação à especificidade, os resultados são representados pelas Figuras 13 e 14 (pág. 61 e 62). A resposta do placebo e o pico do solvente não interferem na detecção de AG, CAF e EGCG uma vez que não apresentam picos nos tempos de retenção desses constituintes. Nos cromatogramas **D**, observamos que há sobreposição de picos das SQTs e da amostra e coincidência nos tempos de retenção de AG, CAF e EGCG, confirmando que existe especificidade para os métodos.

Os resultados para a linearidade estão presentes na Tabela 7 (pág. 64). Através dos métodos propostos, foram construídas curvas analíticas ($x = \mu\text{g.mL}^{-1}$, $y = \text{mV}$) dos compostos de interesse ($n = 3$). O estudo da linearidade foi sujeito ao método dos mínimos quadrados e foram obtidos coeficientes de determinação maiores que 0.99. Os dados foram avaliados através da ANOVA. O teste de significância da regressão gerou valores de $F_{\text{calculado}}$ maiores que $F_{\text{crítico}}$ e o teste de falta de ajuste valores de $F_{\text{calculado}}$ menores que $F_{\text{crítico}}$. Pode-se afirmar, com 95% de confiança, que existe uma relação linear entre as variáveis e que não existe falta de ajuste no modelo para a faixa de concentração estudada. Dessa forma, quando se utiliza a equação modelo para prever as concentrações de AG, CAF e EGCG na formulação, encontram-se resultados muito próximos aos valores reais da amostra.

Os LD e LQ (Tabela 7, pág. 64) foram calculados a partir das curvas analíticas. Estes são importantes dentro do contexto de testes de liberação e de permeação uma vez que não se pode prever a quantidade de fármaco que passará através das membranas sintéticas ou das camadas da pele para ser quantificada no meio receptor. Dessa forma, a linearidade, o LD e o LQ foram também determinados quando EGCG foi diluído no meio receptor. Esses resultados confirmam que o método de emulsão pode ser utilizado tanto para o controle de qualidade de produtos semissólidos quanto para ensaios de liberação e de permeação.

Os resultados para a precisão e a exatidão podem ser observados na Tabela 8 (pág. 65). Todos os coeficientes de variação encontrados estão dentro do limite preconizado pela legislação ($\leq 5\%$), comprovando a capacidade do método de proporcionar resultados próximos para uma série de medidas para a mesma amostra, em diferentes intervalos. Para a exatidão, as recuperações médias estão dentro do critério de aceitação de 98 a 102%, enfatizando a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Para avaliar a robustez dos métodos na determinação do principal constituinte (EGCG), foram considerados os planejamentos 2^3 com triplicata no ponto central realizados. Os valores calculados, com 95% de confiança, para os principais efeitos e suas interações, estão representados na Tabela 9 (pág. 65). Nenhum dos fatores avaliados afetou significativamente a recuperação do princípio ativo no método para cápsula. Entretanto, o teor de EGCG no método para emulsão foi afetado por todos os fatores, incluindo a interação entre alguns deles (X_{12} e X_{23}). Por isso, esses

parâmetros devem ser mantidos estritamente fixados, com o intuito de evitar a alteração nos resultados.

Para avaliar se os analitos mantiveram-se quimicamente inalterados nas soluções analíticas preparadas, sob as condições específicas para cada método, foi realizado o teste de estabilidade das mesmas. Este ainda é um parâmetro pouco descrito em normas de validação de metodologia analítica (ISAAC et al., 2008), mas é essencial para gerar resultados confiáveis e reproduzíveis. Frequentemente, em equipamentos automatizados, as corridas cromatográficas são realizadas no período noturno para que haja o melhor aproveitamento do tempo e das análises de um laboratório. Esta prática faz com que a estabilidade das soluções seja essencial (RIBANI et al., 2004).

A estabilidade do analito deve ser realizada considerando-se a temperatura de armazenamento das soluções e o tempo do teste deve ser superior ao esperado para a duração das análises, devido à possibilidade de ocorrer circunstâncias não previstas como a necessidade de novas injeções ou o mau funcionamento do sistema cromatográfico (CASSIANO et al., 2009).

Considerando que o tempo de preparo das soluções não ultrapasse 2 h, que o sistema cromatográfico já esteja em perfeitas condições de uso e que o tempo de corrida para os métodos desenvolvidos é de 35 minutos, o tempo avaliado (48 h) pela estabilidade excede 25% do tempo máximo já utilizado para as análises contínuas deste trabalho (36h).

De acordo com a Tabela 10 (pág. 66), em um período de 48 h, a concentração de todos os analitos permanece maior que 90% da concentração das soluções inicialmente preparadas. O AG apresenta um discreto aumento em sua concentração no decorrer do tempo, coincidindo com um leve decréscimo na concentração de EGCG. Isso demonstra a possibilidade do AG ser um produto de degradação de catequinas galoiladas e reforça a importância imposta ao mesmo pela USP, uma vez que esta estabelece que o AG deve ter o seu teor limitado na matéria prima de chá verde. Porém, essa diferença na concentração não foi capaz de causar diferenças significativas no teor dos analitos.

Levando em conta esses dados e os demais parâmetros da validação, podemos dizer que, do ponto de vista prático, os métodos são considerados válidos para os objetivos pretendidos.

6.3 Análise de amostras do mercado

Cápsulas magistrais na dosagem de 500 mg foram analisadas (Tabela 11, pág. 67). O produto A apresentou teores de CAF e EGCG menores que 1%; o produto B apresentou AG, CAF e EGCG, porém, alguns valores encontram-se fora do especificado e o produto C não apresentou concentrações dos constituintes que fossem detectáveis (abaixo dos limites de detecção). Isso demonstra que as matérias primas utilizadas pelas farmácias não possuem o padrão de qualidade esperado para esse fitoterápico.

Atualmente, existe uma diversidade de formulações cuja composição contém o extrato seco. Alguns produtos prometem em seus rótulos inovações a partir do efeito antioxidante dos constituintes do chá verde, mas estão sujeitos a não apresentarem valores adequados dos mesmos quando utilizam matérias primas sem o devido controle de qualidade.

Um dos principais impedimentos para que os produtos fitoterápicos sejam mundialmente aceitos no mercado é a falta de métodos e monografias em compêndios oficiais para a realização de seu controle de qualidade (SHINDE et al., 2009). Dessa forma, é necessário um contínuo estudo na área para que os fitoterápicos sejam introduzidos no mercado de forma segura e sejam devidamente controlados pela vigilância sanitária.

6.4 Seleção do meio receptor para os testes de liberação e de permeação

A seleção de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade do fármaco (SATO et al., 2007). Uma vez que o método de análise para EGCG em emulsão foi estabelecido e validado, a sua solubilidade, em meio receptor adequado, foi determinada para o estudo de liberação e de permeação (Tabela 12, pág. 69). EGCG mostrou melhores resultados quando em contato com o suor humano artificial, embora seja nitidamente solúvel em todos os meios (Figura 18, pág. 68), sendo passível de sofrer oxidação em pH maior que 7.0 (tampão fosfato salino e fluido corporal simulado, com ou sem albumina sérica bovina). Isso

ocorre devido à extrema instabilidade e ao processo de degradação de catequinas em condições alcalinas (UYSAL et al., 2009). A possível desprotonação de hidroxilas e/ou oxidação pode estar ocorrendo nos tubos 3, 4, 5 e 6. Isto se deve à mudança de coloração das soluções desde o momento do preparo. A solução do tubo 1 não apresentou mudança em sua coloração, mesmo após o tempo selecionado para os testes de liberação e de permeação (12h). EGCG apresentou menor solubilidade no tubo 2, quando comparado ao tubo 1, apresentando uma solução com aspecto turvo.

Uma concentração de 50 g.L^{-1} é frequentemente aceita como concentração média de albumina no sangue humano (VEERING et al., 1990). Uma vez que a albumina sérica contribui para o transporte e para a estabilização direta da oxidação de EGCG em condições alcalinas (MERELES; HUNSTEIN, 2011; MINODA et al., 2010; NOZAKI et al., 2009), 5% da mesma foram adicionados aos meios biorelevantes. Entretanto, a sua presença melhorou a solubilidade do analito apenas em tampão fosfato salino pH 7.4. Nos demais meios testados (fluido corporal simulado e suor humano artificial), a presença de albumina não demonstrou resultados positivos, sendo estes diferentes daqueles apresentados nos estudos de Baert et al. (2010).

A partir dos resultados, podemos dizer que o suor humano artificial sem albumina é o melhor meio para os estudos de liberação e de permeação.

6.5 Teste de liberação *in vitro* de EGCG

Uma vez que o desenvolvimento de um produto transdérmico eficiente pode aumentar a biodisponibilidade dos fármacos e que o estudo de liberação *in vitro* é uma etapa essencial no desenvolvimento da formulação, a liberação de EGCG foi avaliada a partir de uma emulsão contendo extrato seco de chá verde.

O extrato foi incorporado em PhytobaseTM, uma base creme cuja composição possui propriedades hidratantes. Isso se deve a presença de vitamina E e fitossomas que liberam triglicérides de ácidos oleico e linoleico de forma lenta (FAGRON, 2013). Os fitossomas são muito utilizados em formulações tópicas porque possui alto perfil lipídico, o que facilita a sua penetração na pele (AWASTHI; KULKARNI; PAWAR, 2010). Os principais constituintes biologicamente ativos de

plantas e extratos, assim como os flavonoides, são polares, o que limita a sua absorção tópica (TRIPATHY et al., 2013). Os fitossomas podem melhorar a absorção e os benefícios terapêuticos de substâncias polares (AMIT et al., 2007), uma vez que estas ficam ancoradas por ligações químicas à parte polar da cabeça dos fosfolipídios presentes na formulação (AWASTHI; KULKARNI; PAWAR, 2010). Esses dados expostos na literatura levaram o presente estudo a questionar a capacidade dessa base de favorecer a liberação e a permeação de EGCG a partir da formulação.

Os experimentos de liberação foram realizados considerando-se importantes requisitos necessários para fornecer dados cinéticos válidos: dose infinita; o uso de uma membrana que não limite a taxa de fluxo do compartimento doador para o receptor; e meios receptores que atuem em perfeita condição *sink* para a substância ativa e mimetizem as condições fisiológicas (GUY; HADGRAFT, 1990; REICHLING et al., 2006).

O perfil de liberação de EGCG a partir da formulação está representado no Gráfico 1 (pág. 70). Os resultados obtidos foram então tratados matematicamente para determinar a cinética de liberação, empregando o método de regressão linear. Os dados foram modelados para várias equações cinéticas, com o intuito de descobrir o mecanismo de liberação do fármaco. O perfil de liberação de EGCG não foi linear. Isso sugere que o seu perfil não segue uma cinética de ordem zero. Os dados disponíveis na Tabela 13 (pág. 70) confirmam que a emulsão obteve maior coeficiente de determinação (0.991) para o modelo de pseudo primeira ordem, também conhecido como modelo de Higuchi. Assim, o mecanismo de liberação de EGCG é um processo de difusão baseado na lei de Fick e é dependente da raiz quadrada do tempo.

A formulação foi capaz de liberar 8896.01 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de EGCG após 12 h de experimento e os dados foram complementados com a determinação do fluxo (J_s , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) e o tempo de latência (T_L , h) (Tabela 13, pág. 70). A formulação apresentou uma liberação rápida, com um tempo de latência de 5.4 min. Esta taxa de liberação é específica da formulação e pode ser utilizada para monitorar a qualidade do produto.

6.6 Estudo de permeação cutânea de EGCG

A análise da permeação cutânea foi realizada comparando-se a quantidade de EGCG detectada nos diferentes compartimentos da pele (estrato córneo e epiderme/derme) e no meio receptor das células de Franz. A quantidade de emulsão depositada nos compartimentos doadores ao início do experimento foi padronizada em 5.38 mg.cm^{-2} . A dose finita foi escolhida por ser uma condição usualmente recomendada para sistemas semissólidos (GILLET; EVRARD; PIEL, 2011).

Os experimentos foram conduzidos considerando-se uma pequena variação no protocolo convencional (OECD, 2004): a pele utilizada não foi dermatomizada, sendo utilizada com sua espessura total. À medida que a espessura empregada possui influência nos resultados dos experimentos (KLANG et al., 2012), a pele não dermatomizada ajuda a mimetizar as condições fisiológicas. Os resultados da perda transepidermal de água indicaram que os discos de pele estavam uniformes com relação ao nível de hidratação ($38.6 \pm 0.8 \text{ g}^2.\text{m}^{-2}.\text{h}^{-1}$).

Analisando-se a distribuição de EGCG durante o estudo de permeação (Tabela 14 e Gráfico 2, pág. 71), nota-se que $174.91 \mu\text{g}$ ficaram aderidos no bastão de espalhamento, durante a aplicação do produto, e que a maior parte do fármaco ($425.09 \mu\text{g}$) ficou retida no estrato córneo. A taxa de recuperação encontra-se dentro do especificado ($100 \pm 10\%$) (OECD, 2004). EGCG não foi capaz de permear uma vez que não foi quantificado no meio receptor ou no conjunto epiderme/derme. Isso indica que a formulação testada propiciou a permanência do princípio ativo na camada mais superficial da pele, não caracterizando a sua absorção sistêmica.

O teste de liberação *in vitro* demonstrou resultados contraditórios ao estudo de permeação *ex vivo* e não foi capaz de prever o fluxo de EGCG na pele humana. O fluxo de fármacos *in vitro*, em membrana artificial de polisulfona (uma barreira de difusão passiva), é importante para a determinação da liberação a partir da emulsão para o meio receptor. Entretanto, é possível que o fluxo diminua ou não ocorra quando em contato com membranas biológicas como a pele humana, uma vez que a resistência ao estrato córneo é a principal barreira a ser superada por fármacos transdérmicos (LEICHTNAM et al., 2006). Portanto, o uso da membrana sintética deve ser avaliado de forma criteriosa, uma vez que não possui as mesmas propriedades anatômicas e fisiológicas da pele humana. Mesmo após o estudo *ex*

vivo, deve-se ter cautela quanto à extrapolação dos resultados obtidos para as situações *in vivo*. Com a metodologia *in vitro* é possível apenas fazer uma seleção prévia das formulações antes da realização de testes clínicos (SATO et al., 2007).

A formulação testada não exerce os efeitos sistêmicos inicialmente esperados durante o tempo investigado (12 horas). Para o uso transdérmico do chá verde, novas formulações devem ser testadas. Entretanto, é uma base promissora para outras aplicações, podendo ser adequada se destinada a atuar nas camadas mais superficiais da pele.

Uma formulação que retenha o princípio ativo por um período prolongado na superfície da pele proporciona, por exemplo, o aumento do efeito protetor dos filtros solares (ROGGIA, 2009; SIQUEIRA, 2008). Esta seria uma provável aplicação a ser pesquisada, uma vez que existem estudos na literatura que relatam a ação de EGCG e do chá verde contra as radiações ultravioletas (SILVA et al., 2013; WHITE; TRIBOUT; BARON, 2012; YANG et al., 2012).

O estrato córneo apresenta-se como sítio de ação para fármacos antifúngicos (BETTONI, 2009). Desta forma, a formulação estudada poderia ser testada para tal propósito, uma vez que Hirasawa e Takada (2004) afirmam a atividade de EGCG contra *Candida albicans*. Diante dos resultados expostos, o uso da formulação com finalidade cosmética também poderia ser algo desejável, uma vez que experimentos clínicos realizados por Gianeti, Mercurio e Campos (2013) mostram que o chá verde, em formulações cosméticas, possui efeito hidratante para a pele, melhora a sua textura, reduz o aspecto áspero e dá suavidade à mesma.

7 CONCLUSÃO

- Os métodos para a determinação quantitativa de AG, CAF e EGCG nas formulações cápsula e emulsão de chá verde estão de acordo com os parâmetros de validação requeridos pela RDC 899. Os métodos foram simples, seletivos, precisos, exatos e rápidos, quando comparados a outros trabalhos descritos na literatura e apresentaram condições que favorecem a química verde, com a utilização de baixas concentrações de solventes orgânicos. Eles mostraram a confiabilidade necessária para que fossem utilizados no controle de qualidade das formulações testadas.
- A análise de cápsulas magistrais presentes no mercado demonstra que as matérias primas utilizadas pelas farmácias não possuem o padrão de qualidade esperado para esse fitoterápico, apresentando valores inadequados para os constituintes avaliados.
- O método para emulsão provou ainda ser adequado para os ensaios de liberação *in vitro* e de permeação *ex vivo*.
- Os dados mostraram que EGCG apresenta altas taxas de fluxo quando submetido ao teste de liberação em membrana sintética, mas permanece no estrato córneo da pele humana quando submetido aos ensaios de permeação em células de Franz.
- A formulação não apresentou propriedades transdérmicas diante do tempo investigado. O uso da formulação para fins cosmetológicos, bem como o uso de novas bases para a finalidade transdérmica podem ser alvos de futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS

- AGRAFIOTOU, P.; RÀFOLS, C.; CASTELLS, C.; BOSCH, E.; ROSÉS, M. Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 30, p. 4995-5009, 2011.
- AMIT, G.; ASHAWAT, M. S.; SHAIENDRA, S.; SWARNLATA, S. Phytosome: A Novel Approach Towards Functional Cosmetics. **Journal of Plant Sciences**, [S.l.], v. 2, n. 6, p. 644-649, 2007.
- ANANINGSIH, V. K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. **Food Research International**, Barking, v. 50, n. 2, p. 469-479, 2013.
- ASHIHARA, H.; DENG, W.-W.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 71, n. 5-6, p. 559-566, 2010.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 677p.
- AWASTHI, R.; KULKARNI, G. T.; PAWAR, V. K. Phytosomes: an approach to increase the bioavailability of plant extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 1-3, 2010
- BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. Influence of urea, isopropanol, and propylene glycol on rutin in vitro release from cosmetic semisolid systems estimated by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.35, n. 3, 272-282, 2009.
- BAERT, B.; BOONEN, J.; BURVENICH, C.; ROCHE, N.; STILLAERT, F.; BLONDEEL, P. BOXCLAER, J. V.; SPIEGELEER, B. D. A New Discriminative Criterion for the Development of Franz Diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 218-230, 2010.
- BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.
- BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Kidlington, v. 54, n. 1, p. S31-S40, 2002.

BATCHELDER, RACHEL J.; CALDER, RICHARD J.; THOMAS, CHRIS P.; HEARD, CHARLES M. In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of camellia sinensis. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 6, n. 6, p. 45-51, 2004.

BEMVINDO, C. S. **Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BENSON, H. A. E.; WATKINSON, A. C. **Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice**. 1. ed. New Jersey: Wiley, 2012. 446p.

BI, W.; LI, S.; ROW K. H. Eco-friendly separation of catechins using cyclodextrins as mobile phase additives in RP-HPLC. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 23, n. 4, p. 308-314, 2011.

BIRUS, B.; KÄHLIG, H.; VALENTA, C. Evaluation of na eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, n. 2, p. 142-151, 2007.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O Desafio de Analisar Solutos Básicos por Cromatografia Líquida em Modo Reverso: Algumas Alternativas para Melhorar as Separações. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 993-1003, 2012.

BORNHOEFT, J.; CASTANEDA, D.; NEMOSECK, T.; WANG, P.; HENNING, S. M.; HONG, M. Y.. The Protective Effects of Green Tea Polyphenols: Lipid Profile, Inflammation, and Antioxidant Capacity in Rats Fed an Atherogenic Diet and Dextran Sodium Sulfate. **Journal of Medicinal Food**, [S.l.], v. 15, n. 8, p. 726-732, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 17 abril 2012.

CAMELLIAS-R-US. Disponível em:
<<http://www.camelliasrus.com.au/images/content/species/large/Sinensis.jpg>>.
Acesso em: 20 de março de 2012.

CARVALHO, A.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, Brasília, v. 48, n. 2, p. 219-237, 2010.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em Métodos Cromatográficos para Análises de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHACKO, S. M.; THAMBI, P. T.; KUTTAN, R.; NISHIGAKI, I. Beneficial effects of green tea: A literature review. **Chinese Medicine**, London, v. 5, n. 13, p. 1-9, 2010.

CHEN, LAISHUN; LEE, MAO-JUNG; YANG, CHUNG S. Absorption, Distribution, and Elimination of Tea Polyphenols in Rats. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v. 25, n. 9, p. 1045-1050, 1997.

CHENIANY, M.; EBRAHIMZADEH, H.; MASOUDI-NEJAD, A. Expression of chalcone synthase influences flavonoid content and frequency of rhizogenesis in microshoots of *Juglans regia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 1, p. 51-59, 2012.

CLARK, J. H; TAVENER, S. J. Alternative Solvents: Shades of Green. **Organic Process Research & Development**, Washington, v. 11, n. 1, p. 149-155, 2007.

COSTA, L. M.; GOUVEIA, S. T.; NOBREGA, J. A. Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 18, n. 3, p. 313-318, 2002.

DEWIK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. United Kingdom: Wiley, 2009. 539p.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; DORES, Rodrigues das; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

EDEAS, M. Strategies to Target Mitochondria and Oxidative Stress by Antioxidants: Key Points and Perspectives. **Pharmaceutical research**, New York, v. 28, n. 11, p. 2771-2779, 2011.

FAGRON. Phytobase: Base Premium para Peles Lesadas [São Paulo]: Brasil. Disponível em: <http://www.fagron.com.br/Content/fm/Docs/Produto/Lancamento/PHYTOBASE_LA MINA.pdf>. Acesso em: 11 de junho de 2013.

FARMACOPEIA Brasileira, v.1, 5. ed. Brasília: Fiocruz, 2010.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 4ª ed., v. 1, 410 p.

FOX, L. T.; GERBER, M.; PLESSIS, J.; HAMMAN, J. H. Transdermal Drug Delivery Enhancement by Compounds of Natural Origin. **Molecules**, Postfach, v. 16, n. 12, p. 10507-10540, 2011.

GIANETI, M. D.; MERCURIO, D. G.; CAMPOS, P. M. G. M. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient. **Dermatologic Therapy**, [S.l.], v. 26, n. 3, p. 267-271, 2013.

- GILLET, A.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposomes and parameters affecting their skin penetration behavior. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 35-42, 2011.
- GONZALEZ-RUIZ, V.; LEON, A. G.; OLIVES, A. I.; MARTIN, M. A.; MENENDEZ, J. C. Eco-friendly liquid chromatographic separations based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives. **Green chemistry**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 115-126, 2011.
- GROSSI, L. N.; POLONINI, H. C.; ALVES, M. C.; FERREIRA, A. O.; LEITE, M. N.; OLIVEIRA, M. A. L.; RAPOSO, N. R. B.; BRANDÃO, M. A. F. Medroxyprogesterone Acetate in Capsules: a Chemometrical Approach. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 32, n. 3, p. 378-383, 2013.
- GUILHARME, D.; CASETTA, C.; BICCHI, C.; VEUTHEY, J.-L. High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 44, p. 6882-6890, 2010.
- GUY, R.; HAFGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. R1-R3, 1990.
- HARBOWY, M. E.; BALENTINE, D. A. Tea chemistry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 16, n. 5, p. 415-480, 1997.
- HARDY, C. Theaceae: *Camellia sinensis*. Disponível em: <http://www.plantsystematics.org/imgs/chardy/r/Theaceae_Camellia_sinensis_23574.html>. Acesso em: 20 de março de 2012
- HARVEY, A. L. Natural products in drug Discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 13, n. 19/20, 2008.
- HASLAM, E. Thoughts on thearubigins. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 61-73, 2003.
- HATHOUT, R. M.; WOODMAN, T. J.; MANSOUR, S.; MORTADA, N. D.; GENEIDI, A. S.; GUY, R. H. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 188-196, 2010.
- HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 225-229, 2004.
- HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; GÓMEZ-ROMERO, M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidante phenolic compounds from plant

food material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 53, n. 5, p. 1130-1160, 2010.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

KHALAF, N. A.; SHAKYA, A. K.; AL-OTHMAN, A.; EL-AGBAR, Z.; FARAH, H. Antioxidant Activity of Some Common Plants. **Turkish Journal of Biology**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 51-55, 2008.

KIM, Y.; WELT, B. A.; TALCOTT, S. T. The Impact of Packaging Materials on the Antioxidant Phytochemical Stability of Aqueous Infusions of Green Tea (*Camellia sinensis*) and Yaupon Holly (*Ilex vomitoria*) during Cold Storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 59, n. 9, p. 4676-4683, 2011.

KLANG, V.; HABERFELD, S.; HARTL, A.; VALENTA, C. Effect of γ -cyclodextrin on the *in vitro* skin permeation of a steroidal drug from nanoemulsions: impact of experimental setup. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 423, n. 2, p. 535-542, 2012.

KUHNERT, N. Unraveling the structure of the black tea thearubigins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 501, n. 1, p. 37-51, 2010.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.-M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles: An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 66, n. 2, p. 159-164, 2007.

LEICHTNAM, M. L.; ROLLAND, H.; WÜTHRICH, R. H.; GUY, R. H. Formulation and evaluation of a testosterone transdermal spray. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 95, n. 8, p. 1693-1702, 2006.

LIN, Y.-S.; TSAI, Y.-J.; TSAY, J.-S.; LIN, J.-K. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n. 7, p. 1864-73, 2003.

MERELES, D.; HUNSTEIN, W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises?. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 12, n. 9, p. 5592-5603, 2011.

MIYAZAKI, S. F. Utilização do Chá Verde em Cosméticos. **Cadernos de Prospecção**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 10-13, 2008.

MINODA, K.; ICHIKAWA, T.; KATSUMATA, T.; ONOBORI, K.-I.; MORI, T.; SUZUKI, Y.; ISHII, T.; NAKAYAMA, T. Influence of the Galloyl Moiety in Tea Catechins on Binding Affinity for Human Serum Albumin. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 56, n. 5, p. 331-334, 2010.

MOHAMED, H. H.; CHABCHOUB, S.; HEDHILI, A. Iron bioavailability and weight gains to iron-deficient rats fed a commonly consumed Tunisian meal 'bean seeds ragout' with or without beef and with green or black tea decoction. **Journal of trace elements in medicine and biology**, Stuttgart, v. 17, n. 3, p. 159-164, 2003.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 6. ed. New York: Wiley, 2004. 643 p.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.

NEILSON, A. P.; GREEN, R. J.; WOOD, K. V.; FERRUZZI, M. G. High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1132, n. 1-2, p. 132-140, 2006.

NISHITANI, E.; SAGESAKA, Y. M. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, n. 5, p. 675-85, 2004.

NOZAKI, A.; HORI, M.; KIMURA, T.; ITO, H.; HATANO, T. Interaction of Polyphenols with Proteins: Binding of (-)-Epigallocatechin Gallate to Serum Albumin, Estimated by Induced Circular Dichroism. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 224-228, 2009.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD): Skin absorption: in vitro method, test guideline No 428. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, OECD, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2004.

PEKAL, A.; DRÓZDZ, P.; BIESAGA, M.; PIRZYNSKA, K. Screening of the antioxidante properties and polyphenol composition of aromatised green tea infusions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, n. 11, p. 2244-2249, 2012.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, 2008.

RAINS, T. M.; AGARWAL, S.; MAKI, K. C. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.22, n. 1, p. 1-7, 2011.

RANI, A.; SINGH, K.; AHUJA, P. S.; KUMAR, S. Molecular regulation of catechins biosynthesis in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze], **Gene**, Amsterdam, v. 495, n. 2, p. 205-210, 2012.

REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K. H.; SCHAEFER, U. F. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 64, n. 2, p. 222-228, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. J.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCCARO, A. S.; BLANCO, A. R.; GIULIANO, F.; RUSCIANO, D.; ENEA, V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 6, p. 1968-1973, 2004.

ROGGIA, Isabel. **Avaliação da Estabilidade, Liberação e Permeação Cutânea de Nanocápsulas Contendo Benzofenona-3**. 2009. Dissertação (Mestrado em Nanociência) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

ROJANARATA, T. Eco-Friendly, Operator-safe and Cost-effective RP-HPLC Method for Stability-indicating Assay of Prednisolone Tablets Using Ethanol: Water as Mobile Phase. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S.I.], v. 4, n. 1, p. 444-448, 2012.

ROSA, H. B.; TOLOTTI, R. C.; MIRON, D. S.; SOUZA, K. C. B. Desenvolvimento e validação de método para o doseamento de tibolona em cápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1030-1035, 2012.

SAITO, S. T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E. S.; BUENO, F. A Method for Fast Determination of Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin (C) and Caffeine (CAF) in Green Tea Using HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.2, p. 394-400, 2006.

SANDER, L. C.; BEDNER, M.; TIMS, M. C.; YEN, J. H.; DUEWER, D., L.; PORTER, B.; CHRISTOPHER, S. J.; DAY, R. D.; LONG, S. E.; MOLLOY, J. L.; MURPHY, K. E.; LANG, B. E.; LIEBERMAN, R.; WOOD, L. J.; PAYNE, M. J.; ROMAN, M. C.; BETZ, J. M.; NGUYENPHO, A.; SHARPLESS, K. E.; WISE, S. A. Development and certification of green tea-containing standard reference materials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 402, n. 1, p. 473-487, 2011.

SANDUKJI, A.; AL-SAWAF, H.; MOHAMADIN, A.; ALRASHIDI, Y.; SHEWEITA, SA. Oxidative stress and bone markers in plasma of patients with long-bone fixative surgery: Role of antioxidants. **Human and Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 30, n. 6, p. 435-442, 2011.

SANG, S.; LAMBERTB, J. D.; HOC, C.-T.; YANGD, C. S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. **Pharmacological research**, London, v. 64, n. 2, p. 87-99, 2011.

SASSON, C. S. **Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.

SATOH, K.; SAKAMOTO, Y.; OGATA, A.; NAGAI, F.; MIKURIYA, H.; NUMAZAWA, M.; YAMADA, K.; AOKI, N. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral Administration in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 925-933, 2002.

SCHMIDT, M.; SCHMITZ, H. J.; BAUMGART, A.; GUEDON, D.; NETSCH, M. I.; KREUTER, M. H.; SHMIDLIN, C. B.; SCHRENK, D. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 307-314, 2005.

SCHONTHAL, A. H. Adverse effects of concentrated green tea extracts. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 55, n. 6, p. 874-885, 2011.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIA, R.; DAUER, A.; AURA, A.-M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 53, n. 2, p. 310-329, 2009.

SHARMA, V.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S. D.; KUMAR, V. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 18, n. 6, p. 583-594, 2005.

SHINDE, V. M.; DHALWAL, K.; POTDAR, M.; MAHADIK, K. R. Application of quality control principles to herbal drugs. **International Journal of Phytomedicine**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 4-11, 2009.

SILVA, A. R.; SEIDL, C.; FURUSHO, A. S.; BOENO, M. M. S.; DIEAMANT, G. C.; WEFFORT-SANTOS, A. M. *In vitro* evaluation of the efficacy of comercial green tea extracts in UV protection. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 35, n. 1, p. 69-77, 2013.

SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011.

SINGH, K.; KUMAR, S.; YADAV, S. K.; AHUJA, P. S. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. **Plant Biotechnology Reports**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 95-101, 2009.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SOUSA, J. P. B.; FILHO, A. A. S.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; FURTADO, N., A. J. C.; JORGE, R. F. A Validated Reverse-phase HPLC Analytical Method for the Quantification of Phenolic Compounds in *Baccharis dracunculifolia*.

Phytochemical Analysis, Sussex, v. 20, n. 1, p. 24-32, 2009.

SOUZA, R. A. M. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SUZUKI, B. Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M. Health-promoting effects of green tea. **Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and Biological Sciences**, Tokyo, v. 88, n. 3, p. 88-101, 2012.

TAKABAYASHI, F.; HARADA, N.; YAMADA, M.; MUROHISA, B.; OGUNI, I. Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 61-63, 2004.

TILTON, R.; PAIVA, A. A.; GUAN, J.-Q.; MARATHE, R.; JIANG, Z.; EYNDHOVEN, W. V.; BJORAKER, J.; PRUSOFF, Z.; WANG, H., LIU, S.-H.; CHENG, Y.-C. A comprehensive platform for quality control of botanical drugs (PhytomicsQC): a case study of *Huangqin Tang* (HQT) and PHY906. **Chinese Medicine**, London, v. 5, n. 30, p. 1-15, 2010.

TRIPATHY, S.; PATEL, D. K.; BARO, L.; NAIR, S. K. A review on phytosomes, their characterization, advancement & potential for transdermal application. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 147-152, 2013.

UNGER, M. Capillary Electrophoresis of Natural Products: Current Applications and Recent Advances. **Planta medica**, Stuttgart, v. 75, n. 7, p. 735-745, 2009.

USP – The United States Pharmacopeia. 34. ed. Baltimore: United Book Press, 2011.

UYSAL, U.; ATURKI, Z.; RAGGI, M. A.; FANALI, S. Separation of catechins and methylxanthines in tea samples by capillary electrochromatography. **Journal of separation science**, Weinheim, v. 32, n. 7, p. 1002-1010, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VIEYRA, F. E. M.; BOGGETTI, H. J.; ZAMPINI, I. C.; ORDOÑEZ, R. M.; ISLA, M. I.; ALVAREZ, R. M. S.; ROSSO, V.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. **Free Radical Research**, London, v. 43, n. 6, p. 553-564, 2009.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechin, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, London, v. 68, n. 1, p. 115-121, 2000.

WANG, L. Y.; WEI, K.; JIANG, Y. W.; CHENG, H.; ZHOU, J.; HE, W.; ZHANG, C. C. Seasonal Climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 233, n. 6, p. 1049-1055, 2011.

WANG, Y.; GAO, L.; LIU, Y.; TIAN, Y.; XIA, T. Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 141, [s.n], p. 7-16, 2012.

WEI, K.; WANG, L.; ZHOU, J.; HE, W.; ZENG, J.; JIANG, Y.; CHENG, H. Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. **Food Chemistry**, London, v. 125, n. 1, p. 44-48, 2011.

WESTER, R. C.; CHRISTOFFEL, J.; HARTWAY, T.; POBLETE, N.; MAIBACH, H. I.; FORSELL, J. Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: Storage and detrimental effects of heat-separation and freezing. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 15, n. 1, p. 82-84, 1998.

WHITE, P. O.; TRIBOUT, H.; BARON, E. Protective Mechanisms of Green Tea Polyphenols in Skin. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S.l.], v. 2012, [s.n.], p. 1-8, 2012.

WINOTAPUN, W.; OPANASOPIT, P.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. **Enzyme and Microbial Technology**. No prelo 2013.

WISUITIPROT, W.; SOMSIRI, A.; INGKANINAN, K.; WARANUCH, N. *In vitro* human skin permeation and cutaneous metabolism of catechins from green tea extract and green tea extract-loaded chitosan microparticles. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 33, n. 6, p. 572-579, 2011.

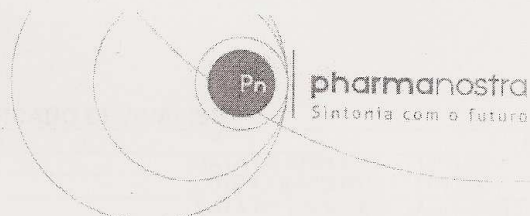
XIANGLI, L.; BERNARD, T.; ALFRED, F. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. **Pharmaceutical research**, New York, v. 28, n. 5, p. 962-977, 2011.

YANG, D.-J.; HWANG, L. S.; LIN, J.-T. Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1156, n. 1-2, p. 312-320, 2007.

YANG, D.; LIU, Y.; SUN, M.; ZHAO, L.; WANG, Y.; CHEN, X.; WEI, C.; GAO, L.; XIA, T. Differential gene expression in tea (*Camellia sinensis* L.) calli with different morphologies and catechin contents. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 2, p. 163-175, 2012.

YU, O.; JEZ, J. M. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. **Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 750-762, 2008.

ANEXO A



CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:	CHÁ VERDE 95%			Pág 1
ORIGEM/PROCEDENCIA:	CHINA/CHINA	DATA DE ANÁLISE:	12/01/2011	
LOTE PHARMA NOSTRA:	10124958B	LOTE FABRICANTE:	FP100801	
DATA DE FABRICAÇÃO:	Agosto/2010	DATA DE VALIDADE:	Agosto/2012	
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	TEMPERATURA ENTRE 15°C a 25°C			
OBS 1:	Nome Comum: Chá Verde			
OBS 2:	Parte Usada: Folha			
OBS 3:	Nome Científico: Camelia sinensis			
OBS 4:	Proporção do extrato: 20:1			
DATA DE EMISSÃO:	00/00/0000	NF:	000.000	ORDEM FRACIONAMENTO: 106-11
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS	
Descrição*	Pó marrom a amarelo claro	Pó marrom	Fabricante	
Perda por Dessecação*	≤ 6,0%(2 horas / 105°C)	3,92%	Fabricante	
Metais Pesados*	≤ 10 ppm	< 10 ppm	Fabricante	
Teor HPLC	Catequinas	73,8%	Fabricante	
	EGCG: ≥ 40,0%	42,8%		
	Cafelina: ≤ 2,0%	1,4%		
Arsênico	≤ 2ppm	Conforme	Fabricante	
Teor Polifenóis (UV) *	≥95,0%	95,76%	Fabricante	
TESTES MICROBIOLÓGICOS				
Contagem total de bactérias*	≤ 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante	
Fungos e leveduras*	≤ 100 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante	
Escherichia coli*	Negativo	Negativo	Fabricante	
Salmonella*	Negativo	Negativo	Fabricante	
TESTES ADICIONAIS				
Densidade Aparente*	Informativo (Sem compactação)	0,49 g/mL	Met.Geral FB IV	

*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANAPOLIS). Os demais foram transcritos conforme o certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ Pharma Nostra).

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado

D. Rocha
Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
Danielle Rocha Barbosa - CRF-GO Nº 7093

Uf
Responsável Técnico
Amin Gabriel Gebrim - CRF-GO Nº 1829

Magistral 0800 707 07 06

Indústria 0800 727 48 80

Matriz - RJ

Filial - SP

Filial - GO

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do fluxo de permeação cutânea de fármacos administrados por via transdérmica

Pesquisador: NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01147112.5.0000.5147

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia (UFJF)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 151.275

Data da Relatoria: 22/11/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto possui pertinência e valor científico.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão claros e são passíveis de serem executados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios estão bem caracterizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem valor acadêmico e científico e foi bem estruturada na sua metodologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta o termo de responsabilidade com os gastos do estudo.

Recomendações:

Rever o cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atender o item recomendado.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto.

JUIZ DE FORA, 22 de Novembro de 2012

Assinador por:
Paulo Cortes Gago
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N

Bairro: SAO PEDRO

CEP: 36.036-900

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)2102-3788

Fax: (32)1102-3788

E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br