## Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

DANIELLY CUNHA ARAÚJO FERREIRA

FORMULAÇÃO À BASE DE EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO,

DERIVADA DO CHÁ VERDE, DESENVOLVIDA PARA USO ENDODÔNTICO:

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO

### DANIELLY CUNHA ARAÚJO FERREIRA

# FORMULAÇÃO À BASE DE EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO, DERIVADA DO CHÁ VERDE, DESENVOLVIDA PARA USO ENDODÔNTICO: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANDIARA DE ROSSI

## **AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO**

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

## Ferreira, Danielly Cunha Araújo

Formulação à base de Epigalocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico. Ribeirão Preto, 2015.

129p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão - Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: De Rossi, Andiara

1. Epigalocatequina-3-galato 2. Análise físico-química 3. Compatibilidade Tecidual 4. Medicação intracanal

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferreira DCA. Formulação à base de Epigalocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

	Banca Examinadora	
Prof. Dr		
Julgamento	Assinatura	

Data da defesa: / /

## DANIELLY CUNHA ARAÚJO FERREIRA

## Dados Curriculares

**Nascimento** 05 de outubro de 1986 – Uberlândia/MG

Filiação Evandro Araújo Ferreira (in memorian)

Marta da Cunha

**2004-2008** Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia – FOUFU

**2009-2011** Curso de Especialização em Odontopediatria

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia – FOUFU – Monografia intitulada "Técnicas de gerenciamento comportamental em Odontopediatria: atitudes dos pais de crianças com e sem necessidades especiais"

**2011-2012** Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico à Pacientes Especiais

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

**2011-2013** Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP – Dissertação intitulada "Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema para liberação intracanal da Epigalocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes." (Bolsa CNPQ)

2013-2015 Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP – Tese intitulada "Formulação à base de Epigalocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico." (Bolsa CNPQ)

## À Deus, pela minha vida!

Obrigada por Senhor por tudo que proporcionaste em minha vida.

Agradeço pelos momentos de felicidade e também por aqueles momentos difíceis, pois estes me permitiram crescer e superar os meus obstáculos.

Tú es presença constante em minha caminhada!

Muito Obrigada por mais essa conquista!

À Maria, por passar à frente da minha vida, guiando e iluminando a minha trajetória!

Agradeço por nunca desviar Vosso olhar benigno e proteger a mim e a todos que contribuíram de alguma para que este trabalho pudesse acontecer.

A minha mãe **Marta da Cunha**, pelo amor incondicional! Mãe muito obrigada por estar sempre ao meu lado, me orientando com seus conselhos oportunos. Agradeço por ser meu alicerce e me dar o suporte necessário para eu pudesse tomar as decisões mais acertadas. Você é meu exemplo de vida!

Aos meus queridos avós Ambrosina Araújo Ferreira, Lourdes Jacinta da Cunha e Synval Amaro da Cunha, que estão sempre ao meu lado, torcendo e vivenciando cada etapa da minha vida. Obrigada por me incentivarem a sempre continuar aprimorando meus conhecimentos. Amo vocês!

Ao Vinicius Rodrigues de Oliveira, meu noivo, pela compreensão e carinho!

A todos os familiares e amigos que sempre torceram por mim e me deram carinho!



À minha orientadora **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Andiara De Rossi Daldegan**, agradeço pela Amizade! Obrigada pelo constante esforço em transmitir seus conhecimentos! Sou grata a tudo que fez por mim durante esse tempo que permanecemos juntas. Obrigada pelos ensinamentos e dedicação! Você é um exemplo de Orientadora!

"Elogie em público e corrija em particular. Um líder corrige sem ofender e orienta sem humilhar"

Mario Sergio Cortela

À **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Léa Assed Bezerra da Silva**, agradeço por todos os ensinamentos transmitidos, pela dedicação e compreensão nos momentos difíceis. A senhora é um exemplo de força e determinação. Obrigada por acreditar na minha capacidade, por me tratar com tanto carinho e atenção e pelo incentivo constante ao aprendizado e à pesquisa. Serei eternamente grata por tudo o que me proporcionou!

Ao **Prof**. **Dr**. **Paulo Nelson-Filho**, pela forma carinhosa que tanto me recebeu, sempre disposto a ajudar, ensinar e orientar da melhor maneira possível. Obrigada pelos conselhos nos momentos oportunos e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelo exemplo de ética, profissionalismo e dedicação ao ensino e a pesquisa.

À **Prof<sup>a</sup>**. **Dr<sup>a</sup>**. **Raquel Assed Bezerra da Silva**, obrigada pelo apoio, incentivo colaboração e compreensão que sempre me ofereceu. Agradeço pela sua colaboração e atenção na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Borsatto, agradeço pela atenção e amizade! Cris, obrigada pelas conversas e pela disponibilidade em ajudar e ensinar.

À **Prof<sup>a</sup>**. **Dr<sup>a</sup>**. **Alexandra Mussolino de Queiroz**, agradeço pela forma carinhosa com que sempre me acolheu. Danda, obrigada pela dedicação e participação no meu aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, agradeço pela amizade e dedicação com que sempre me apoiou e ajudou! Obrigada pelos conselhos e por compartilhar suas experiências profissionais.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aldevina Campos de Freitas, grande exemplo de dedicação, paciência, determinação e amor à profissão. Professora, muito obrigada pelos conhecimentos teóricos e clínicos transmitidos durante esta trajetória. A senhora será sempre um exemplo a seguir!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kranya Victoria Diaz Serrano, agradeço pela forma carinhosa com que sempre me acolheu.

Ao **Prof. Dr. Roberto Santana da Silva**, agradeço pela forma como me orientou no desenvolvimento deste trabalho. De forma tão paciente, soube me transmitir a essência e a importância do meu trabalho. Agradeço pela sua dedicação, apoio e atenção, com que sempre me recebeu no laboratório.

À **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Juliana Cristina Biazotto de Moraes**, agradeço, por tudo que fez por mim. Sua participação no desenvolvimento desse trabalho foi fundamental. Muito obrigada pela forma carinhosa, paciente, educada e alegre com que sempre me recebeu e sempre me orientou.

À **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Erika Calvano Küchler**, agradeço pela amizade e carinho. Obrigada por estar sempre disposta a passar seus ensinamentos e não medir esforços para ajudar.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Maia de Castro Prado e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Sodré de Oliveira, agradeço pela minha formação e por despertarem em mim a vontade de seguir na carreira acadêmica. Obrigada pela amizade, carinho, atenção e respeito. Adoro vocês!

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e da Vice-Diretora **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Léa Assed Bezerra da Silva e da Vice-Coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Assed Bezerra da Silva.

Aos Professores da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Adílson Thomazinho, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete Sasso Stuani e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, pela convivência, pelas conversas atenciosas e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Maria da Conceição Pereira Saraiva**, professora da Disciplina de Epidemiologia, pela atenção e pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

- **Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, obrigada pelas orientações nas clínicas e por estar sempre disponível a colaborar com nosso aprendizado.
- **Dr**<sup>a.</sup> **Carolina Paes Torres Mantovani**, obrigada pela forma atenciosa e alegre que sempre me acolheu, pela disposição em ajudar sempre.
- **Dr**<sup>a.</sup> **Marília Pacífico Lucisano**, obrigada pela amizade, pelas conversas descontraídas e pela forma carinhosa que sempre me ajudou.

Fátima Aparecida Jacinto e Marco Antônio dos Santos, obrigada pela convivência, pela colaboração nos trabalhos que desenvolvi ao logo desse período no departamento.

Nilza Letícia Magalhães, minha amiga, obrigada pela participação em trabalhos desenvolvidos durante esse período. Obrigada por dividir suas experiências comigo e por estar sempre disposta a me ajudar. Nilza a sua alegria contagia a todos a sua volta. Te agradeço pelas conversas e pelos desabafos. Obrigada pela eterna amizade!

Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Micheli Cristina Leite Rovanholo obrigada pela alegre convivência, pela forma simpática e carinhosa que sempre nos recebe diariamente.

Aos meus amigos e colegas de turma do Mestrado e Doutorado, por compartilhar momentos maravilhosos, por dividir experiências e dificuldades, pelo companheirismo, amizade, pela agradável convivência e pelas conversas divertidas e pelos momentos compartilhados.

Aos funcionários do Biotério Antônio Sérgio Aparecido Mesca, Aline Aparecida Ferraresi Tiballi, pela gentileza e simpatia com que me receberam diariamente. Obrigada por terem sido atenciosos e pelo cuidado com os animais.

Aos funcionários da Clínica I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **José Aparecido Neves do Nascimento, Karina Dadalt Quaglio eVera do Nascimento Scandelai**, obrigada pela atenção em me atender, pela alegre convivência, pelo apoio e carinho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Isabel Cristina Galino Sola, Leandro Marin Silva, Mary Possani Carmessano, Regiane Cristina Moi Sacilloto, pela atenção, pelo carinho e por estarem sempre à disposição.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa concedida em 2013.

#### **R**ESUMO

Ferreira, DCA. Formulação à base de Epigalocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico. Ribeirão Preto, 2015. 129p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.

O chá verde, obtido da Camellia sinensis, é uma das bebidas mais populares em todo o mundo e, recentemente, tem sido foco de pesquisas científicas por apresentar efeitos benéficos na saúde geral. Estudos laboratoriais e epidemiológicos sugerem que, dentre os polifenóis que compõem o chá verde, a Epigalocatequina-3-galato (EGCG) é o mais bioativo e responsável por sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, inativadora de LPS bacteriano, anticarcinogênica, antitumoral, anti-angiogênica, anti-hipertensiva e reparadora tecidual, podendo atuar na prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, hepáticas e renais. Em diversas doenças ósseas, a EGCG também desempenha um importante papel protetor, atuando na indução da mineralização e inibição da osteoclastogênese. No entanto, seus possíveis efeitos na inflamação e na reabsorção óssea associadas à lesão periapical ainda não foram avaliados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma formulação para uso endodôntico à base de EGCG com propriedades físico-químicas e biológicas que permitam seu uso como curativo de demora entre sessões. As formulações testadas incluíram: EGCG diluída em água e diferentes concentrações de EGCG (1,25; 5; 10 e 20 mg/mL) veiculadas em polietilenoglicol 400 (PEG). O óxido de zinco foi utilizado como agente radiopacificador. Em função da possível degradação dos produtos fenólicos em função do ambiente e do tempo, uma solução obtida por meio do contato prolongado da EGCG com o dente também foi avaliada (produto da degradação). Inicialmente, foi realizada a caracterização físico-química da formulação de EGCG por meio de espectrofotometria em Ultravioleta/Visível (UV/Vis), em contato com soluções contendo zinco, óxido de zinco e acetato de zinco. Os estudos biológicos foram realizados para avaliar sua compatibilidade tecidual no tecido subcutâneo de camundongos, por meio da avaliação do extravasamento plasmático após 24 horas e da análise de aspectos macroscópicos e microscópicos aos 7, 21 e 63 dias após a inserção de tubos de polietileno contendo as formulações. Neste estudo, uma pasta a base de hidróxido de cálcio (Calen®) foi utilizada como controle. Na análise macroscópica, realizada por meio de fotografias, foram atribuídos escores aos parâmetros de ulceração epitelial, vascularização, necrose e edema. Na análise microscópica, realizada em microscopia de luz convencional e de fluorescência, foram avaliados os parâmetros de infiltrado inflamatório, vascularização, focos de abscessos, cápsula fibrosa, edema e necrose. Os escores dos resultados biológicos foram submetidos à análise estatística utilizando o teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher e para análise dos resultados quantitativos do extravasamento plasmático foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. Os estudos físico-químicos mostraram que a EGCG manteve seu comprimento de onda original em 274 nm quando associada ao óxido de zinco, tendendo à formação de uma banda de absorção em 325 nm. A associação da EGCG com acetato de zinco ocasionou diminuição da banda de absorção em 274 nm e formação de uma nova banda em 323 nm. Os estudos biológicos mostraram, nos parâmetros macroscópicos que, em todos os períodos avaliados, todas as formulações apresentaram compatibilidade tecidual, com ausência de ulceração epitelial, presença de leve necrose tecidual superficial, edema e vascularização, não havendo diferença significante entre os grupos avaliados (p>0,05). Na análise microscópica, em todos os períodos foi verificada ausência de focos de abscesso, edema e necrose e presença de suave ou moderado infiltrado inflamatório, cápsula fibrosa e neovascularização, semelhante entre todos os grupos (p>0,05). A avaliação dos espécimes corados com HE em microscopia de fluorescência favoreceu a visualização dos vasos sanguíneos e de fibras colágenas, constituindo metodologia adicional para esta finalidade. Na avaliação do extravasamento plasmático, o produto da degradação da ECGG apresentou extravasamento de corante azul de Evans por grama de tecido inferior (0,0514 ±0,0220 mg/mL) às demais formulações testadas (p<0,05). Conclui-se que a formulação tópica à base de EGCG, desenvolvida para uso endodôntico, apresenta propriedades físico-químicas estáveis e compatibilidade tecidual.

**Palavras Chaves:** Epigalocatequina-3-galato, Análise físico-química, Compatibilidade Tecidual, Medicação Intracanal.

#### **A**BSTRACT

Ferreira, DCA. Formulation based on Epigallocatechin-3-gallate, derived from green tea, developed for endodontic use: physicochemical and biological study. Ribeirão Preto, 2015. 129p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.

The green tea, obtained from the Camellia sinensis, is one of the most popular drinks in the world and has recently been in the focus of scientific research due its beneficial effects on general health. Laboratory and epidemiological studies suggest that, among the polyphenols found on green tea, the epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the most bioactive and responsible for its antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial, bacterial LPS inactivation, anticarcinogenic, anti-tumoral, anti-angiogenic, anti-hypertensive and tissue repair and can act in the prevention and treatment of cancer, cardiovascular disease, neurodegenerative, liver and kidney diseases. In several bone diseases, EGCG also plays a major protective role, acting in inhibition of osteoclastogenesis and induction of mineralization. However, their possible effects on inflammation and bone resorption associated to apical periodontitis have not been evaluated. Therefore, the aim of this study was to develop a EGCG based formulation for endodontic use with physicochemical and biological properties that allow its use as intracanal dressing between sessions. The formulations tested included: EGCG diluted in water and different concentrations of EGCG (1.25, 5, 10 and 20 mg/ml) diluted in polyethylene glycol 400 (PEG). Zinc oxide was used as radiopacifier agent. Due to the possible degradation of phenolic compounds as a function of the environment and time, a solution obtained through prolonged contact with the tooth EGCG was also evaluated (degradation product). Initially, physicocharacterization of EGCG formulation was performed by spectrophotometry/Visible (UV/Vis) in contact with solutions containing zinc, zinc oxide and zinc acetate. Biological studies were conducted to evaluate its tissue compatibility with subcutaneous tissue of mice by means of the evaluation of plasma leakage after 24 hours and the examination of macroscopic and microscopic features at 7, 21 and 63 days after insertion of polyethylene tubes containing the formulations. In this study, a calcium hydroxide pastebase (Calen®) was used as control. The macroscopic analysis performed by means of photographs, assigned scores to epithelial ulceration, vascularization, necrosis and edema parameters. Microscopic examination performed in conventional and fluorescence microscopy assessed the inflammatory infiltrate, vascularization, abscesses spots, fibrous capsule, edema and necrosis parameters. The scores of biological results were statistically analyzed by the chisquare test or Fisher's exact and for the quantitative analysis of the results of plasma

extravasation the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test were used. The significance level was 5%. The physico-chemical studies showed that EGCG maintained its original wavelength at 274 nm when added to zinc oxide, tending to the formation of an absorption band at 325 nm. The combination of EGCG with zinc acetate led to decreased absorption band at 274 nm and formation of a new band at 323 nm. Biological studies showed, in the macroscopic parameters in all periods, that all formulations showed tissue compatibility, with no epithelial ulceration, presence of mild superficial tissue necrosis, edema and vascularization, with no significant difference between the groups (p > 0.05). On microscopic examination, in all periods was verified absence of abscess foci, edema and necrosis and the presence of mild or moderate inflammatory infiltrate, fibrous capsule and neovascularization, similar among all groups (p> 0.05). The evaluation of the specimens stained with HE under fluorescence microscopy enhancve the visualization of the blood vessels and collagen fibers, constituting an additional methodology for this purpose. In the evaluation of plasma extravasation, the product of degradation of ECGG presented values of Evans blue dye extravasation by gram of tissue (0.0514  $\pm$  0.0220 mg / mL) lower to the other tested formulations (p < 0.05). It is concluded that the topical formulation based on EGCG developed for endodontic use, presented stable physical and chemical properties and tissue compatibility.

## **S**UMÁRIO

1 Introdução	25
2 Proposição_	
3 MATERIAL E MÉTODOS	
4 RESULTADOS	53
5 DISCUSSÃO_	93
6 CONCLUSÃO	
Referências_	
ANEXOS	127

**I**ntrodução

## 1 Introdução

Os chás de forma geral são ricos em compostos biologicamente ativos, tais como flavonóides, catequinas, polifenóis, alcalóides, vitaminas e sais minerais, que podem contribuir na prevenção e no tratamento de diversas doenças (Trevisanato e Kim, 2000). A *Camellia sinensis* é uma planta que pode dar origem ao chá a partir de suas folhas, botões ou hastes. Dependendo do processo de fabricação, podem ser originados três principais tipos de chás, os quais podem ser diferenciados em termos de sabor, cor e composição: o chá verde, que não está sujeito à fermentação; o chá oolong, que sofre uma semifermentação, e o chá preto, que é resultante de uma plena fermentação da planta (Wierzejska, 2014).

O chá verde é uma das bebidas mais populares em todo o mundo e tem recebido atenção especial por apresentar comprovados efeitos na saúde geral (Chung et al., 2001; Pianetti et al., 2002; Chung et al., 2003; Dreger et al., 2008; Lee et al., 2009; Hodgson e Croft, 2010; Prabhakar et al., 2010; Rao e Pagidas, 2010; Yang e Wang, 2010; Subramaniam et al., 2012; Jung et al., 2012; Cai et al., 2013; Wierzejska, 2014; Fang et al., 2015; Tenore et al., 2015). Seus principais componentes químicos são flavonóides e catequinas, que correspondem a aproximadamente 26,7% do seu conteúdo. Dentre as catequinas, a Epigalocatequina-3-galato (EGCG) corresponde a 11% do seu conteúdo e é considerada o componente mais bioativo (Schmitz et al., 2005).

A EGCG vêm sendo considerada responsável pelo efeito protetor do chá verde por apresentar ação antioxidante (Cook e Samman, 1996; Yang et al., 1998; Anghileri e Thouvenot, 2000; Erba et al., 2005; Khan e Mukhtar, 2007; Sanna et al., 2014), anti-inflamatória (Nagle et al., 2006; Bahoruna et al., 2010; Heber et al., 2014), antimicrobiana (Ikigai et al., 1993; Stapleton e Taylor, 2002; Blanco et al., 2003; Rocaro et al., 2004; Jeon et al., 2014; Lee e Tan, 2015), anticarcinogênica (Lee et al., 2009; Yang e Wang, 2010; Kang et al., 2010; Rao e Pagidas, 2010; Li et al., 2014; Maruyama et al., 2014; Butt et al., 2015), anti-angiogênica (Tudoran et al., 2012; Heber et al., 2014; Koh et al., 2014), mineralizadora (Hegarty et al., 2000; Vestergaard et al., 2001; Choi et al., 2003), anti-hipertensiva (Basu e Lucas, 2007), antitumoral (Lee et al., 2009; Yang e Wang, 2010; Kang et al., 2010; Rao e Pagidas, 2010; Lemarie et al., 2013; Khan et al., 2014) e reparadora tecidual (Sinha et al., 2014).

A administração sistêmica da EGCG vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de diversas patologias, incluindo diferentes tipos de câncer (Shukla et al., 2012; Landis-Piwowar et al., 2013; Khan et al., 2014; Wang et al., 2014), artrite reumatóide (Ahmed, 2010;

Rieghsecker et al., 2013), inflamação da retina e córnea (Cavet et al., 2011; Stoddard et al., 2013), doenças cardiovasculares (Khurana et al., 2013; Adikesavan et al., 2013; Aslan et al., 2014), doenças neuronais degenerativas (Gundimeda et al., 2014), doenças hepáticas (Liu et al., 2014; Zhou et al., 2014), infecções virais (Zhao et al., 2012; Yang et al., 2014), infecções urinárias (Reygaert e Jusufi, 2013) ou na melhora nas funções cerebrais cognitivas (Srividhya et al., 2012; Walker et al., 2015). A utilização da EGCG também foi proposta em cosméticos com efeito protetor solar para a pele (Scalia et al., 2013; Yoshino et al., 2014; Chen et al., 2014) ou como aditivo de alimentos com finalidade de melhora nutricional e atividade antimicrobiana (Klančnik et al., 2014).

Na Odontologia, sugere-se que esse extrato apresente ação antimicrobiana devido ao seu elevado espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Hamilton-Miller, 2001). Estudos mostram que essa substância desempenha efeito anticariogênico decorrente de sua efetiva ação antimicrobiana contra S. mutans e S. sobrinus (Sakanaka et al., 1989; Yoshino et al., 1996; Ferrazzano et al., 2011; Tamura et al., 2011; Xu et al., 2011; Xu et al., 2012; Shumi et al., 2014; Anita et al., 2015; Sarin et al., 2015), por impedir a aderência bacteriana ao dente por meio da inibição da enzima glicosiltransferase e da amilase bacteriana (Hamilton-Miller, 2001; Subramaniam et al., 2012; Jung et al., 2012; Cai et al., 2013). Devido à sua comprovada eficácia contra os micro-organismos e na inibição de metaloproteinases, esse extrato tem sido incorporado em materiais odontológicos, tais como, adesivos dentinários (Du et al., 2012), resinas compostas (Saito et al., 2011; Mankovskaia et al., 2013) e cimentos de ionômero de vidro (Hu et al., 2013). Além disso, seu uso tem sido sugerido na redução da erosão e abrasão dentária (Magalhães et al., 2009; Kato et al., 2010), em solução para bochechos (Hirasawa et al., 2006; Jenabian et al., 2012; Neturi et al., 2014; Sarin et al., 2015), em dentifrícios (Maruyama et al., 2011; Hrishi et al., 2015) e como meio para a conservação de dentes avulsionados após traumatismos, mantendo a vitalidade das células do ligamento periodontal (Hwang et al., 2011; Jung et al., 2011; Poi et al., 2013; Ghasempour et al., 2015).

Na Periodontia, a EGCG inibiu a reabsorção óssea alveolar induzida por LPS, quando utilizada na água de consumo ou por injeção local no ligamento periodontal, sugerindo a ocorrência da inativação do mesmo. (Nakamura et al., 2010). Outro estudo realizou a administração da EGCG via gavagem em camundongos após a indução experimental da doença periodontal e observou-se que houve uma inibição de TNF, IL-6 e diminuição do número e atividade dos osteoclastos reduzindo, assim, a perda óssea alveolar (Cho et al., 2013). Estudos clínicos em humanos foram realizados utilizando-se uma formulação de tiras do extrato do chá (Kudva et al., 2011; Gadagi et al., 2013) ou em formulações à base de gel

(Rattanasuwan et al., 2014) colocadas subgengivalmente após o procedimento de raspagem e polimento radicular. Em todos esses estudos houve uma melhora significativa da condição óssea e periodontal em comparação ao grupo controle. Outros autores propuseram até mesmo o consumo diário do chá para tratamento e controle da doença periodontal (Chatterjee et al., 2012; Nugala et al., 2012).

Estudos epidemiológicos revelam que a EGCG também pode trazer benefícios para os tecidos mineralizados, aumentando a densidade mineral óssea (Hegarty et al., 2000; Vestergaard et al., 2001; Choi et al., 2003) e reduzindo os riscos de osteoporose ou fratura (Kanis et al., 2000). Diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* revelam que os benefícios ao tecido ósseo são decorrentes da ação da EGCG na inibição da osteoclastogênese (Lin et al., 2008; Lee et al., 2010; Oka et al., 2012) ou na indução da morte celular de osteoclastos por apoptose (Yun et al., 2007).

Na Cirurgia, recentemente foi realizado um estudo em cães onde foi observado melhor reparo ósseo no grupo que recebeu EGCG (Hong et al., 2014). Em estudo clínico, após a exodontia de dentes posteriores, a aplicação de compressa de gaze impregnada com EGCG sobre o alvéolo, por 5 minutos, resultou em prevenção de hemorragia e diminuição de exsudato (Soltani et al., 2014). A associação de EGCG com BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas) em membranas de titânio, também promoveu a reparação do alvéolo ao redor de implantes (Shin et al., 2014).

Especialmente na Endodontia, a administração sistêmica (intraperitoneal) de EGCG resultou em acentuada redução na extensão e severidade da reabsorção óssea periapical associada a dentes portadores de necrose pulpar, experimentalmente induzida em ratos (Lee et al., 2009). A EGCG também foi proposta como solução irrigadora de canais radiculares, por apresentar efetiva ação antimicrobiana contra E. faecalis (Prabhakar et al., 2010; Lee et al., 2015), P. gengivalis (Jung et al., 2012; Cai et al., 2013), P. aeruginosa e E. coli (Jeon et al., 2014). Esses achados são muito importantes, pois uma das maiores preocupações da Endodontia atual é o tratamento de canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical, uma vez que pesquisas envolvendo avaliações histopatológicas, microbiológicas, clínicas e radiográficas mostram que o índice de sucesso pós-tratamento, nesses dentes, atinge apenas a média de 70% (Kerekes e Tronstad, 1979; Sjögren et al., 1990; Orstavik, 1996; Valderhaug et al., 1997; Sundqvist et al., 1998; Heling et al., 2001; Siqueira Jr, 2001; Imura et al., 2007; Molander et al., 2007), mesmo quando respeitados os mais rigorosos princípios técnicos. Sabe-se que o principal objetivo do tratamento endodôntico é a redução ou eliminação da infecção microbiana do sistema de canais radiculares e região periapical, pois estes constituem o agente etiológico principal das lesões periapicais (Kakehashi et al., 1965; Tronstad, 1992). Assim, falhas nesse tratamento vêm sendo principalmente associadas à persistência de micro-organismos e seus subprodutos (Nair et al., 1990; Nair et al., 1999) devido, à inadequada desinfecção dos sistemas de canais radiculares ou obturação dos canais radiculares (Kerekes e Tronstad, 1979; Orstavik, 1996), que resultam na manutenção da reação inflamatória e da reabsorção óssea, impedindo o processo de reparação tecidual.

Apesar dos recentes avanços tecnológicos, a infecção endodôntica nos casos de periodontite apical, somente pode ser combatida com o uso de substâncias antimicrobianas, anti-inflamatórias e mineralizadoras eficazes, que devem ser utilizadas topicamente no interior do canal radicular entre sessões, denominadas curativo de demora (Byström e Sundqvist, 1985; Dalton et al., 1998; Siqueira et al., 1999; Shuping et al., 2000; Tan e Messer, 2002; Siqueira et al., 2002; Schafer e Schlingemann, 2003). Inúmeras foram as substâncias propostas para serem utilizadas no canal radicular como curativo de demora e dentre elas, os derivados fenólicos, os aldeídos e os esteróides em combinação com os antibióticos foram, durante algum tempo, amplamente pesquisados, mostrando-se insatisfatórios do ponto de vista biológico e antimicrobiano (Leonardo e Silva, 1998).

O hidróxido de cálcio, um pó branco, alcalino (pH 12,8) e pouco solúvel em água (Staehle et al., 1997), atualmente tem sido a medicação mais estudada, discutida e empregada com esta finalidade, devido ao seu baixo custo, ação antimicrobiana (Georgopoulou et al., 1993; Assed, 1994; Leonardo et al., 1995; Leonardo et al., 2000; de Souza et al., 2011; Ito et al., 2011), anti-exudativa (Heithersay, 1970; Allard et al., 1987), indutora da formação de tecido mineralizado por ativação da fosfatase alcalina e da síntese de colágeno (Schroder, 1985; De Rossi et al., 2005; Leonardo et al., 2006), biocompatibilidade (Nelson-Filho et al., 1999; Silva t al., 2010; Queiroz et al., 2011), propriedade de dissolução dos tecidos necróticos (Hasselgren et al., 1988; Türkün e Cengiz, 1997; Wadachi et al., 1998) e de promover a hidrólise da endotoxina (LPS) bacteriana *in vitro* (Safavi e Nichols, 1994; Barthel et al., 1997; Jiang et al., 2003; Guo et al., 2014), *in vivo* (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Tanomaru et al., 2003) e em estudos clínicos (Adl et al., 2015). No entanto, até o momento não existe um tratamento ideal ou uma medicação eficaz que resulte em 100% de sucesso clínico, radiográfico, microbiológico e histopatológico. Ainda, nenhum estudo foi encontrado propondo o uso da EGCG como medicação intracanal.

A escolha correta de uma medicação intracanal deve ser bastante criteriosa, pois essas podem ser capazes de controlar a infecção, mas também podem causar irritação ou destruição dos tecidos vivos (Soares e Goldberg, 2001). Por isso, a biocompatibilidade é um parâmetro com bastante enfoque quando se trata de materiais de uso endodôntico, visto que é um termo que abrange vários aspectos do material, incluindo desde suas propriedades físicas, mecânicas

e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico, mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando injúrias na função biológica (Costa, 2001; Silveira et al., 2004) e pode ser avaliada por meio de testes inflamatórios, os quais são os mais comumente utilizados. Atualmente, a biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material de desencadear uma resposta apropriada do hospedeiro frene à uma aplicação específica ou a capacidade de estar em contato com um sistema vivo, sem produzir um efeito adverso (Vert et al., 2012). Outra definição também pode ser entre a relação de um material e o organismo de tal forma que não produza efeitos indesejáveis promovendo, assim, uma resposta biológica apropriada em uma determinada aplicação (Lima et al., 2003; Silveira et al., 2004).

Muitos extratos naturais contendo polifenóis biologicamente ativos em sua composição vem sendo incorporados em formulações cosméticas ou farmacêuticas com diferentes finalidades. No entanto, o preparo de formulações para uso tópico é delicado, pois os polifenóis naturais não apresentam estabilidade ao longo do tempo, sendo muito sensíveis aos fatores ambientais, incluindo condições físico-químicas e biológicas. Estes podem oxidar rapidamente, o que leva ao aparecimento gradual de coloração castanha e indesejável, ou sofrer perda considerável de sua atividade. Além disso, os polifenóis apresentam baixa solubilidade em água (Munin e Edwards-Lévy, 2011), bem como falta de estabilidade química e falta de biodisponibilidade in vivo (Coimbra et al., 2011). Estudos in vitro revelaram que os polifenóis do chá verde apresentam eficácia antimicrobiana contra grande parte das linhagens de bactérias isoladas do canal radicular (Horiba et al., 1991), incluindo o *E. faecalis* (Prabhakar et al., 2010), espécie comumente detectada em lesões refratárias ao tratamento (Stuart et al., 2006). No entanto os benefícios dessa atividade antimicrobiana não foram sugeridos ou demonstrados in vivo após sua aplicação como curativo entre sessões, bem como a avaliação da eficácia do seu produto de degradação, após o completo processo de oxidação. Diante do exposto, verifica-se que as propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, mineralizadora, antioxidante, inibidora da reabsorção óssea induzida pelo LPS bacteriano, presentes na EGCG, que já desempenham ação sistêmica comprovada na prevenção e tratamento de diferentes doenças inflamatórias e infecciosas, também poderiam desempenhar importante papel no tratamento endodôntico.

Em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa verificou-se que a EGCG apresenta propriedades físico-químicas estáveis, permanecendo ativa em contato com o tecido dental e em pH ácido, ambiente presente em áreas de reabsorção e inflamação, e não provoca alteração de cor dental (Ferreira, 2013). No entanto, até o momento não há na literatura específica estudos avaliando *in vivo* sua compatibilidade tecidual. Assim, objetiva-se desenvolver uma nova formulação à base de EGCG que apresente viabilidade de uso clínico e

compatibilidade tecidual, utilizando um medicamento natural e biocompatível. A hipótese do presente estudo é de que a EGCG apresenta compatibilidade tecidual.



## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação tópica de EGCG com propriedades físico-químicas e biológicas que permitam sua aplicação no interior do canal radicular para uso como curativo de demora durante o tratamento endodôntico.

## 2. 1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma formulação à base de EGCG, que contenha veículo e radiopacificador para uso endodôntico;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas da EGCG e sua estabilidade na presença dos componentes da formulação para utilização intracanal;
- Analisar macroscopicamente e microscopicamente a compatibilidade tecidual da formulação à base de EGCG no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos.

# Material e Métodos

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### Material

Foi utilizada a EGCG (E41430; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), derivada do chá verde, disponível em partículas de 5  $\mu$ m, apresentadas no estado sólido. Sua estrutura química ( $C_{22}H_{18}O_{11}$ ) está ilustrada na Figura 1.

**Figura 1.** Estrutura química da EGCG (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>), massa molecular 458,37 g/mol.

Foram avaliadas formulações de EGCG, em diferentes concentrações: 1,25; 5; 10 e 20 mg/mL. A determinação dessas concentrações foi baseada em estudos prévios (Hirasawa et al., 2004; Schmitz, 2005; Lee et al., 2009; Xu et al., 2011), contendo como veículo o polietilenoglicol 400 (PEG 400 - Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil). A composição das formulações e materiais avaliados estão apresentados na Tabela 1. O veículo PEG 400 foi utilizado por manter a EGCG por tempo prolongado no canal radicular, sem alterar suas propriedades físico-químicas (Ferreira, 2013). Também, foi acrescido o óxido de zinco (OZ - S.S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por fornecer radiopacidade, permitindo sua verificação na imagem radiográfica. Uma formulação de EGCG veiculada em água destilada e deionizada (proveniente da osmose reversa - Laboratório de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo), também foi avaliada, por ser a água o solvente preconizado nas especificações do fabricante da EGCG (Tabela 1- Anexo A). Uma vez que os polifenóis sofrem degradação em função do tempo e do ambiente (Munin e Edwards-Lévy, 2011), também foi avaliada uma solução de EGCG previamente submetida a esse processo. Para a degradação da EGCG, após

sua manipulação final, foi adicionado um dente molar hígido, obtido de humano, por um período de 27 horas. O veículo, PEG 400, foi utilizado como controle.

**Tabela 1-** Composição dos materiais avaliados.

Material	Veículo	Radiopacificador	Concentração EGCG
EGCG (0,12 mg) + H <sub>2</sub> O	Água (3mL)	-	0,04 mg/mL
EGCG (0,12 mg) + PEG 400	PEG 400 (3mL)	-	0,04 mg/mL
EGCG (1 mg) + PEG 400	PEG 400 (800μL)	OZ (2g)	1,25 mg/mL
EGCG (4 mg) + PEG 400	PEG 400 (800μL)	OZ (2g)	5 mg/mL
EGCG (8 mg) + PEG 400	PEG 400 (800μL)	OZ (2g)	10 mg/mL
EGCG (16 mg) + PEG 400	PEG 400 (800μL)	OZ (2g)	20 mg/mL
Produto da Degradação da EGCG	Água (3mL)	-	0,04 mg/mL
PEG 400	PEG 400 (3mL)	-	-

PEG 400: Polietilenoglicol 400

OZ: Óxido de Zinco

EGCG: Epigalocatequina-3-galato

Todos os materiais foram manipulados e avaliados em temperatura ambiente. Para o preparo das formulações foi utilizada uma placa de vidro (1,0 cm de espessura), espátula de manipulação (n° 24), micropipeta (200  $\mu$ L) e béqueres de vidro (10 mL). Os materiais sólidos (EGCG e radiopacificador) foram pesados em balança analítica de precisão (Modelo AL500; Marte Balanças, Equipamentos e Aparelhos de Precisão Ltda., São Paulo, SP, Brasil). O preparo das formulações de EGCG (0,12 mg) com água, PEG 400 e produto de degradação, foi descrito previamente (Ferreira, 2013), onde a EGCG foi pesada e diluída nos respectivos veículos com auxílio de um béquer e uma cuba ultrassônica (Banho de Ultra-Som Modelo: USC – 1400, Indaiatuba, SP, Brasil). Para as formulações de EGCG com PEG 400 nas concentrações de 1,25; 5; 10 e 20 mg/mL, após a pesagem dos materiais sólidos, a EGCG foi misturada ao radiopacificador (em um béquer) e posteriormente depositada integralmente na placa de vidro. Com auxílio de uma micropipeta foram adicionados 800  $\mu$ L (de 200 em 200  $\mu$ L) do veículo (PEG 400) e a espatulação foi realizada até a obtenção de uma massa homogênea de consistência pastosa.

## Métodos

Inicialmente foi realizado estudo físico-químico da EGCG manipulada com o veículo viscoso (PEG 400) e com o agente radiopacificador (óxido de zinco), por meio da espectroscopia de absorção UV/Vis, visando avaliar possíveis alterações na estrutura da EGCG na presença do óxido de zinco, com base no comportamento espectral.

A seguir, foram realizados estudos biológicos de compatibilidade tecidual em camundongos, incluindo análise do extravasamento de proteínas e análises macrocópicas e microscópicas.

# 3.1. ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO

As análises físico-químicas das formulações foram realizadas no Laboratório de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e a Profa. Dra. Juliana Cristina Biazzotto de Moraes.

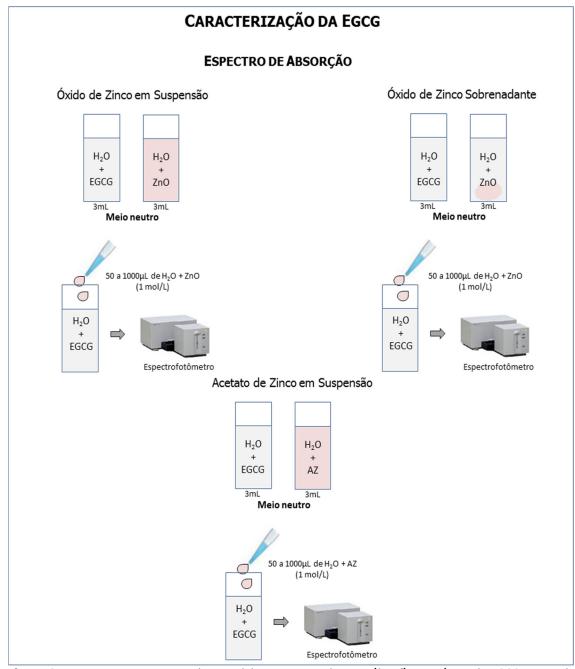
## Espectroscopia de Absorção UV/Vis

A interação da EGCG com o radiopacificador (óxido de zinco - OZ) foi avaliada por meio de espectroscopia de absorção UV/Vis com auxílio do espectrofotômetro Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States), acoplado a um sistema de computador e analisada com o software Origin 6.0 (Microcal-TM -OriginR versão 6.0; Microcal Software Inc., USA) (Figura 1). A concentração da EGCG utilizada foi calculada baseando-se no valor de  $\epsilon$  que é igual a 11920 (Pelillo et al., 2004) pela fórmula a =  $\epsilon$ .b.c, onde a= absorbância,  $\epsilon$ = coeficiente de absortividade molar, b= caminho óptico e c= concentração de mol/L, sendo diretamente proporcional à absorbância.



**Figura 2.** Espectrofotômetro Agilient 8453 acoplado ao sistema computadorizado.

Foi realizada inicialmente a caracterização da EGCG em associação com a solução de OZ que, por ser pouco solúvel, foi submetida à centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby mod. 208N FANEM, São Paulo, SP, Brasil), sendo coletada apenas a solução sobrenadante. Como controle do procedimento, foi verificado o comportamento da EGCG em solução de acetato de zinco, que é uma substância altamente solúvel, para verificar se houve algum tipo de interação entre a EGCG e o zinco. A realização do procedimento de avaliação espectral está ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Esquema representativo da metodologia empregada na análise físico-química da EGCG associada ao óxido de zinco e acetato de zinco.

## 3.2 ESTUDOS BIOLÓGICOS

O presente estudo foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA/FORP-USP), sendo aprovado (Processo nº 11.1.1405.53.8) (Anexo B). Os cuidados com o bem estar dos animais de experimentação seguiram as Normas e Princípios Éticos Adotados pela CEUA/FORP-USP, as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentados pela Constituição Federal Brasileira na Lei no 11.794 de 8 de outubro 2008. Os protocolos experimentais dos estudos biológicos em camundongos seguiram normas preconizadas pela *International Organization for Standardization* (ISO 10993-6/2007).

# 3.2.1 Compatibilidade Tecidual em Camundongos

#### **Animais**

Foram utilizados 180 camundongos isogênicos da linhagem Balb/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério I da FORP-USP, alocados em caixas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, forradas com cama de maravalha autoclavada, em temperatura (22±2°C) e umidade relativa do ar (55±10%) constantes, em um ciclo de claroescuro de 12:12 horas, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água. O comportamento e bem estar dos animais foram monitorados diariamente.

### Grupos experimentais

Os grupos experimentais, materiais testados, número de animais utilizados e tempos de avaliação estão listados na Tabela 2. Além dos materiais avaliados no estudo físico-químico, também foi utilizada a pasta Calen<sup>®</sup> (S.S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), como controle, que possui em sua composição: hidróxido de cálcio (2,5g), óxido de zinco (0,5g), colofônia (0,05g) e polietilenoglicol 400 (1,75mL) (Leonardo e Leonardo, 2012).

Tabela 2 – Materiais, distribuição do número de animais por grupo e períodos experimentais

Grupo	Material	Número de animais	Período Experimental
1	EGCG (0,12 mg) + H <sub>2</sub> O	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
2	EGCG (0,12 mg) + PEG 400	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
3	EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL)	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
4	EGCG + PEG 400 (5 mg/mL)	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
5	EGCG + PEG 400 (10 mg/mL)	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
6	EGCG + PEG 400 (20 mg/mL)	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
7	Degradação da EGCG	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
8	PEG 400 (Controle)	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias
9	Pasta Calen (Controle)	5 animais (10 tubos)	1, 7, 21 e 63 dias

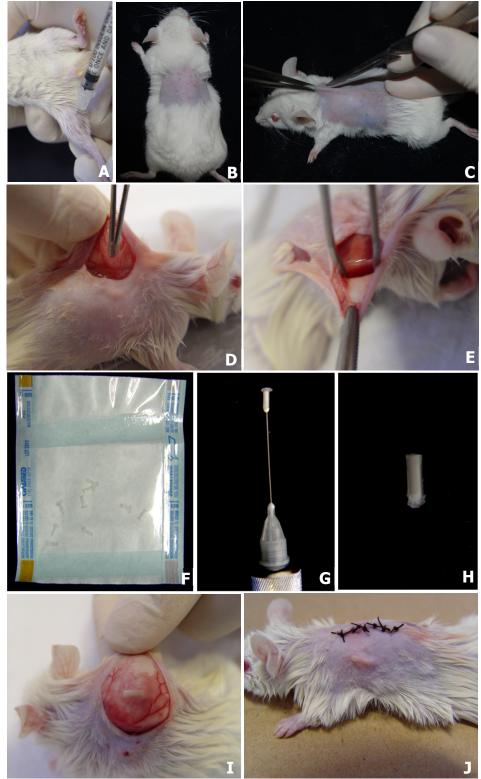
EGCG: Epigalocatequina-3-galato PEG 400: Polietilenoglicol 400

#### Procedimento operatório

Os camundongos foram anestesiados via intramuscular com ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil), na dosagem de 150 mg/kg de peso corporal, e xylasina (Dopaser, Laboratórios Calier, Barcelona, CT, Espanha), na dosagem de 7,5 mg/kg de peso, na coxa traseira (Figura 4A). Em seguida, foi realizada a tricotomia da região dorsal e antissepsia com solução de clorexidina a 2,0% (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (Figura 4B).

O procedimento cirúrgico consistiu de uma incisão de 0,5 cm, efetuada com lâmina de bisturi nº 15 (Embramac, Itajaí, SC, Brasil) na região escapular do dorso de cada animal (Figura 4C), seguida de divulsão com tesoura romba, onde foram formadas duas bolsas no tecido subcutâneo com bases a 20 mm das linhas de incisão (Figura 4D e 4E).

Os tubos de polietileno tiveram uma das extremidades seladas com o auxílio de uma pinça clínica aquecida e foram submetidos ao processo de esterilização por óxido de etileno. Os materiais foram colocados no interior de tubos de polietileno (Embramed, São Paulo, SP, Brasil) de 1,5 mm de diâmetro interno e 5 mm de comprimento, sob condições de assepsia, imediatamente antes de sua implantação (Figura 4F, 4G e 4H). Em cada bolsa foi implantado um tubo de polietileno com a formulação a ser testada, inseridos cuidadosamente para que os mesmos não ficassem paralelos à linha de incisão para evitar sua expulsão e mobilidade (Figura 4I). Após o término do ato operatório foi realizada sutura com fio de seda 4-0 (Ethicon Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4J).



**Figura 4. A.** Anestesia via intramuscular com ketamina (150 mg/kg) e xylasina (7,5 mg/kg); **B.** Tricotomia da região dorsal; **C.** Incisão na região escapular do dorso **D,E.** Divulsão com tesoura romba, formando duas bolsas no tecido subcutâneo; **F,G,H.** Preenchimento do implantes com o material a ser testado; **I.** Instalação dos implantes no tecido subcutâneo; **J.** Sutura com fio de seda.

# Avaliação do extravasamento plasmático (24 horas)

Para a avaliação do extravasamento plasmático, realizada no período de 24 horas após a cirurgia, cada animal recebeu uma injeção do corante azul de Evans 2,5%, na dosagem de 60mg/Kg peso (Garcia-Leme e Shapoval, 1975), via epicanto do olho, 2 horas antes da coleta dos tecidos (Figura 5A e 5B). Um total de 45 animais foram submetidos à eutanásia após 1 dia (24 horas), em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), com 60% de saturação, após a anestesia prévia do animal, conforme recomendação do Comitê de Ética em Pesquisas animais do Campus Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Figura 5C).

Nesse período experimental foi realizada a quantificação do extravasamento plasmático. Para a remoção das amostras foi realizada incisão e corte da área tricotomizada com tesoura romba até o tecido mucoso e divulsão para separação do tecido subcutâneo contendo os tubos, juntamente com o tecido epitelial. O corte e separação foram realizados com margem de segurança para evitar danos à região a ser analisada, sendo que os fragmentos de tecido contendo os tubos tiveram aproximadamente 1 cm² e o tubo estava presente na região central do tecido (Figura 5D).

O tecido coletado foi colocado em solução aquosa de formamida (1/1) por 48 horas a 37°C. A densidade óptica do sobrenadante contendo o corante extravasado foi determinada por meio de um espectrofotômetro (630 nm, Modelo U-2001, Hitachi, Chiyoda-ku, TYO, Japão) e a concentração do corante foi determinada por meio de regressão linear, a partir de uma curva com concentrações conhecidas do corante. Os resultados foram expressos em Densidade Óptica de Azul de Evans (µg/mL) por grama de tecido.



**Figura 5. A.** Injeção de corante Azul de Evans na região do epicanto do olho do animal; **B.** Período de 2 horas antes da eutanásia e coleta das amostras; **C.** Eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub>; **D.** Coleta da amostra dos animais.

# Avaliação Macroscópica e Microscópica

Nos períodos experimentais de 7, 21 e 63 dias os tecidos subjacentes ao implante foram submetidos à análise macro e microscópica. Os animais foram eutanasiados como descrito previamente, sendo realizada novamente a tricotomia dorsal para a remoção do tubo de polietileno juntamente com os tecidos circundantes (tecido conjuntivo subcutâneo e pele). Após a remoção dos tecidos, estes foram submetidos à avaliação macroscópica por meio de fotografias dos tecidos, com relação à ulceração epitelial, vascularização, necrose e edema. Os parâmetros e escores para a avaliação macroscópica estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3-** Parâmetros e escores macroscópicos empregados para análise da compatibilidade tecidual da EGCG, em camundongos

Parâmetros	Escores
Ulceração epitelial	0: ausente
	1: leve
	2: moderada
	3: severa
Vascularização	0: normal
	1: levemente aumentada
	2: moderadamente aumentada
	3: severamente aumentada
Necrose	0: ausente
	1: leve
	2: moderada
	3: severa
Edema	0: ausente
	1: leve
	2: moderado
	3: severo

EGCG: Epigalocatequina-3-galato

Após a análise macroscópica, as amostras foram submetidas ao processamento histotécnico para análise microscópica, sendo fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas, à temperatura ambiente. A seguir, foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (80% e 95%, 30 minutos cada; e 100%, com 4 trocas de 1 hora cada) e foram efetuados três banhos de xilol (30 minutos cada), dois banhos de parafina (2 horas cada) e inclusão em parafina, de maneira a permitir cortes histológicos da região do implante (tubo) em seu sentido longitudinal. Cortes seriados foram obtidos com 6 μm de espessura (Micrótomo Leica RM 2145, Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha) e corados com hematoxilina e eosina (HE), para análise em microscópio óptico (Axio Imager. M1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Alemanha), sob luz convencional e de fluorescência.

Para a análise descritiva foi utilizada videomicroscopia com o programa Leica Qwin v.3.2.1 (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra), em conjunto com microscópio e videocâmera Leica (DFC 300FX, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador *on-line*. Foram realizadas avaliações quanto à intensidade do infiltrado inflamatório, vascularização, presença de focos de abscesso, cápsula fibrosa, edema e necrose. Os vasos

sanguíneos foram definidos como estruturas com luz e com presença ou não de hemácias. Os parâmetros e escores utilizados na análise microscópica estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4-** Parâmetros e escores microscópicos empregados para análise da compatibilidade tecidual da EGCG, em camundongos

Parâmetros	Escores
Infiltrado inflamatório	0: ausente
	1: leve
	2: moderado
	3: severo
Vascularização	0: ausente
	1: leve
	2: moderada
	3: severa
Foco de Abscesso	0: ausente
	1: leve
	2: moderado
	3: severo
Cápsula fibrosa	0: ausente
	1: fina
	2: moderada
	3: espessa
Edema	0: ausente
	1: leve
	2: moderado
	3: severo
Necrose	0: ausente
	1: leve
	2: moderada
	3: severa

EGCG: Epigalocatequina-3-galato

# **A**NÁLISE **E**STATÍSTICA

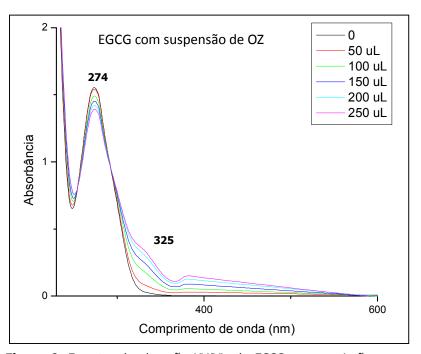
Os resultados foram analisados utilizando-se o programa estatístico Graph Pad Prims 5 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Para análise dos resultados de escores foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher e para análise dos resultados quantitativos do extravasamento plasmático foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.



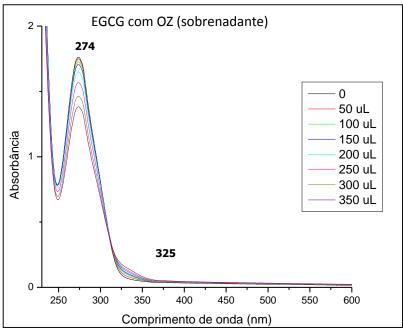
# 4. RESULTADOS

# 4.1 Estudos Físico-químicos

Visando avaliar a possível interação da EGCG com o OZ, utilizado como radiopacificador, foi caracterizado seu espectro de absorção em associação com uma solução de OZ em suspensão (Figura 6) e de seu sobrenadante (Figura 7). Em ambas as situações verificou-se manutenção de seu comprimento de onda (274 nm) e uma pequena diminuição da banda de absorção, acompanhados de discreto aparecimento de uma pequena banda de 325 nm, que foi menos expressiva na avaliação do sobrenadante.

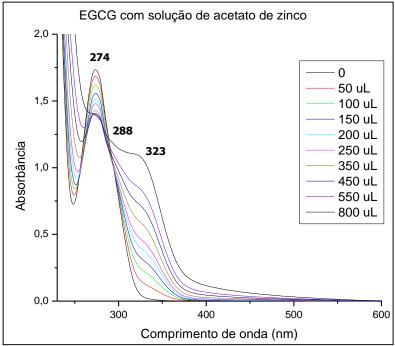


**Figura 6.** Espectro de absorção UV/Vis da EGCG em associação com a solução de óxido de zinco, com concentração da EGCG= 8,6x10<sup>-5</sup> mol/L; pH= 6,2; λ= 274 nm; absorbância= 1,5 u.a.



**Figura 7.** Espectro de absorção UV/Vis da EGCG em associação com a solução sobrenadante de óxido de zinco, com concentração da EGCG=  $8,6x10^{-5}$ mol/L; pH= 6,2;  $\lambda$ = 274 nm; absorbância= 1,5 u.a.

No estudo controle, a associação da EGCG com uma solução aquosa de acetato de zinco (Figura 8) apresentou diminuição da banda em 274 nm e formação de uma banda em 323nm, com ponto isosbéstico em 288 nm.



**Figura 8.** Espectro de absorção UV/Vis da EGCG em associação com a solução de acetato de zinco, com concentração da EGCG= 8,6x10<sup>-5</sup>mol/L; pH= 6,2; λ= 274 nm; absorbância= 1,5 u.a.

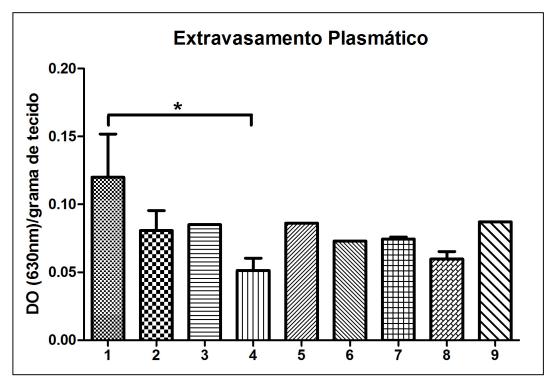
A EGCG se manteve estável na presença dos componentes presentes na formulações avaliadas.

# 4.2 Estudos Biológicos

## 4.2.1 Compatibilidade Tecidual em Camundongos

Avaliação do Extravasamento Plasmático - 24 horas

No período de 24 horas, todos os grupos apresentaram extravasamento de plasma ao redor do local do implante, com valores sem diferenças estatisticamente significantes entre si, exceto o produto da degradação, que apresentou valores inferiores (p<0,05), comparado aos demais grupos. Os valores (média  $\pm$  desvio padrão da média) de extravasamento plasmático em cada grupo avaliado estão apresentados na Figura 9. Os tecidos em contato com a pasta Calen® apresentaram valores de extravasamento (0,1200  $\pm$ 0,0778 mg/mL) semelhantes aos tecidos em contato com EGCG (0,12 mg) + H2O (0,0807  $\pm$ 0,0361 mg/mL), EGCG (0,12 mg) + PEG 400 (0,0851  $\pm$ 0,0 mg/mL), EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL) (0,0861  $\pm$ 0,0 mg/mL), EGCG + PEG 400 (5 mg/mL) (0,0730  $\pm$ 0,0 mg/mL), EGCG + PEG 400 (10 mg/mL) (0,0744  $\pm$ 0,0037 mg/mL), EGCG + PEG 400 (20 mg/mL) (0,0597 $\pm$ 0,0133 mg/mL). O produto da degradação apresentou um extravasamento de corante azul de Evans por grama de tecido menor que os demais grupos testados (0,0514  $\pm$ 0,0220 mg/mL). O aspecto macroscópico das amostras pode ser observado na Figura 10.



**Figura 9.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) da quantidade de Corante azul de Evans (OD: Densidade Óptica) encontrado por grama de tecido, medido por espectrofotometria de 24 horas após implantação dos materiais no tecido subcutâneo. **(1)** Pasta Calen (controle), **(2)** EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>O, **(3)** EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **(4)** Degradação da EGCG, **(5)** EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **(6)** EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **(7)** EGCG + PEG 400 (10 mg/mL), **(8)** EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **9)** PEG 400. \* P<0,05.

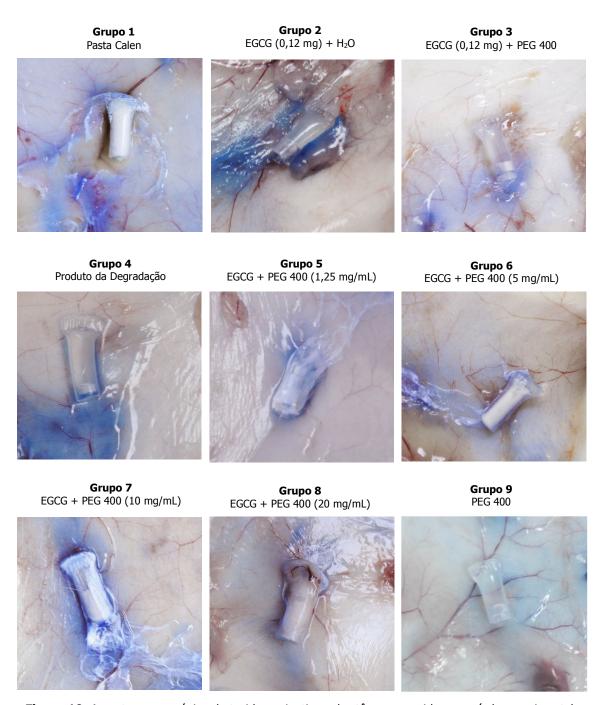


Figura 10. Aspecto macroscópico do tecido conjuntivo subcutâneo removido no período experimental de 24 horas para avaliação de extravasamento plasmático na região de implantação do tubo.
1. Pasta Calen (controle),
2. EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>0,
3. EGCG (0,12 mg) + PEG 400,
4. Degradação da EGCG,
5. EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL),
6. EGCG + PEG 400 (5 mg/mL),
7. EGCG + PEG 400 (10 mg/mL),
8. EGCG + PEG 400 (20 mg/mL),
9. PEG 400 (controle).

Avaliação Macroscópica

7 dias

Os parâmetros macroscópicos avaliados estão descritos a seguir e podem ser verificados na figura 11 e tabelas 7 e 8. De acordo com os resultados analisados aos 7 dias, todos os grupos avaliados apresentavam características semelhantes em todos parâmetros analisados, não sendo observada diferença estatisticamente significante (p>0,05).

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com presença de ulceração epitelial, necrose e edema suaves, e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada; 100% das amostras apresentavam escore 1, nos parâmetros avaliados.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras. Este grupo apresentava escore 0 em 100% das amostras como relação aos parâmetros ulceração epitelial, necrose e edema. A vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se normal.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial e edema, em 100% das amostras. A vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada e havia presença de necrose superficial suave. Os parâmetros analisados foram classificados em escore 0 e 1.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema em 100% das amostras e aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo. Na avaliação macroscópica estas amostras foram classificadas com escore 0.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial em 100% das amostras. Os parâmetros de necrose e vascularização apresentavam escore 1 e 2, sendo considerado suave a moderado. O aspecto edema foi classificado como leve (escore 1) em 100% das amostras.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, sendo classificadas com escore 0, pois apresentava ausência de ulceração epitelial, necrose e edema em 100% das amostras e aspectos de normalidade quanto à vascularização do tecido conjuntivo.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com presença de ulceração epitelial e edema leves, e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada, podendo ser classificada com escore 1. Observou-se ausência de necrose em 100% das amostras.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, foram classificadas em escore 0, devido à ausência de ulceração epitelial, necrose e edema em 100% das amostras e aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, foram classificadas em escore 0, devido à ausência de ulceração epitelial, necrose e edema em 100% das amostras e aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo.

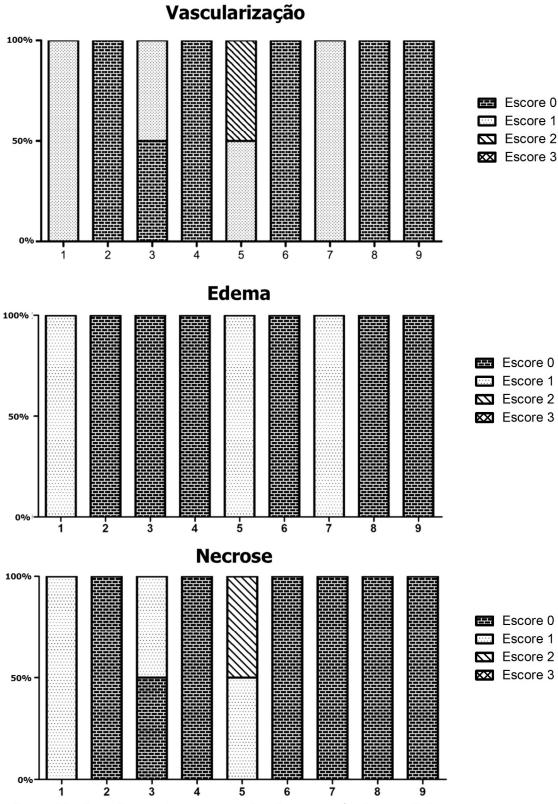


Figura 11. Porcentagem dos escores referente aos parâmetros avaliados macroscopicamente nos diferentes grupos aos 7 dias. Escore 0: Ausente, Escore 1: Suave, Escore 2: Moderado e Escore 3: severo.

1. Pasta Calen (controle), 2. EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>0, 3. EGCG (0,12 mg) + PEG 400, 4. Degradação da EGCG, 5. EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), 6. EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), 7. EGCG + PEG 400(10 mg/mL), 8. EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), 9. PEG 400 (controle).

**Tabela 7.** Percentual dos escores encontrados na análise macroscópica das formulações Calen, EGCG (0,12 mg) + H2O, EGCG (0,12 mg) + PEG 400 e Degradação da EGCG aos 7 dias.

7 dias		Cal	en		EGCG (0,12 mg) + H2O					G (0,12 m	g) + PEG	400	Degradação Da EGCG				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Ulceração Epitelial 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	
Edema 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo Vascularização do Tecido	0	100%	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	
Conjuntivo  0 = Ausente  1 = Levemente aumentada  2 = Moderadamente aumentada	0	100%	0	0	100%	0	0	0	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	
3= Severamente aumentada  Necrose 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	0	100%	0	0	100%	0	0	0	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	

**Tabela 8.** Percentual dos escores encontrados na análise macroscópica das formulações EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) aos 7 dias.

																				-
7 dias		EGCG + PI	EG 400		EG	EGCG + PEG 400				EGCG + PE	G 400		EGC	GCG + PEG 400				PEG 400		
		(1,25 mg	ı/mL)			(5 mg/	mL)			(10 mg/	mL)		(2	20 mg	/mL)					
	0	` 1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Ulceração Epitelial			_			_	_			_	_			_	_	_		_	_	
0= Ausente / 1= Leve	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Edema	•	4000/	•		4000/		•			1000/	•		1000/	•	•	•	4000/	•	•	
0= Ausente / 1= Leve	0	100%	0	0	100%	0	0	0	0	100%	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Vascularização do Tecido																				
Conjuntivo																				
0= Ausente	E00/	E00/	0	0	1000/	0			0	1000/			1000/				1000/			
1= Levemente aumentada	50%	50%	U	0	100%	0	0	0	0	100%	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2=Moderadamente																				
aumentada																				
3= Severamente aumentada																				
Necrose	E00/	50%	0	0	1000/	0	0	0	1000/		0	0	1000/	0	0	0	100%	0	0	0
0= Ausente / 1= Leve	50%	50%	U	0	100%	U	0	0	100%	0	0	0	100%	U	0	0	100%	0	U	U
2= Moderado / 3= Severo																				

21 dias

Os parâmetros macroscópicos avaliados estão descritos a seguir e podem ser verificados na figura 12 e nas tabelas 9 e 10. De acordo com os resultados obtidos aos 21 dias, todos os grupos apresentavam características semelhantes em todos os parâmetros analisados e não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados (p>0,05). Nesse período de avaliação não houve presença de ulceração epitelial em nenhuma amostra.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada em 50% das amostras, sendo classificada com escore 1.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras. Era visível o aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo. Todas as amostras foram classificadas com escore 0.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em todas as amostras (100%) e o aspecto de normalidade na vascularização do tecido conjuntivo pôde ser verificado, classificando as amostras com escore 0.

#### Grupo 4: Produto da Degradação da EGCG

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras. A vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada em 25% das amostras avaliadas.

Grupo 5: EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL)

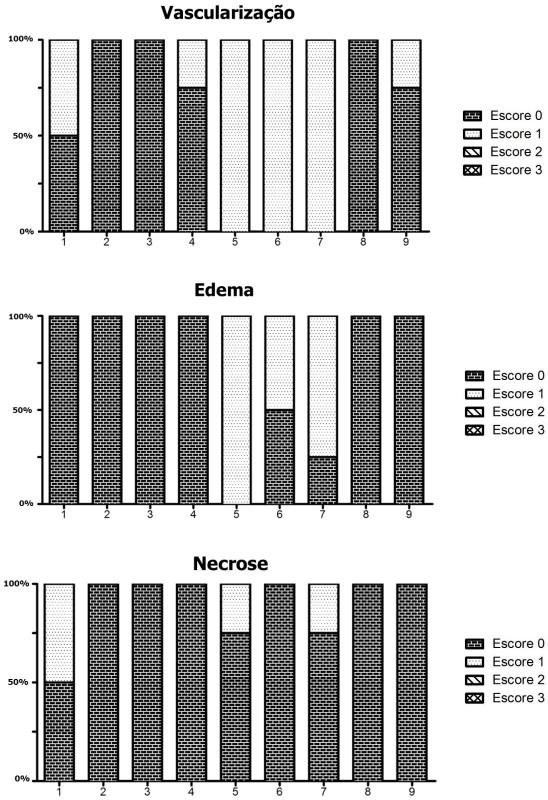
As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com vascularização e edema (100%) em grau leve. A o aspecto necrose encontrava-se levemente aumentado (25%).

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial e necrose em 100% das amostras. A vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada (100%), sendo classificada com escore 1. Observou-se presença de edema em 50% das amostras.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial (100%). Havia presença de vascularização em 100% das amostras. Observou-se presença de edema em 75% das amostras.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras e aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo, sendo classificada com escore 0.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras avaliadas e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada em 25% da amostra.



**Figura 12.** Porcentagem dos escores referente aos parâmetros avaliados macroscopicamente aos 21 dias. Escore 0: Ausente, Escore 1: Suave, Escore 2: Moderado e Escore 3: severo. **1.** Pasta Calen (controle), **2.** EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>0, **3.** EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **4.** Degradação da EGCG, **5.** EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **6.** EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **7.** EGCG + PEG 400 (10 mg/mL), **8.** EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **9.** PEG 400 (controle).

**Tabela 9.** Percentual dos escores da análise macroscópica das formulações Calen, EGCG (0,12 mg) + H2O, EGCG (0,12 mg) + PEG 400 e Degradação da EGCG aos 21 dias.

21 dias		Calen				CG (0,12	mg) + H	20	EGC	G (0,12 m	g) + PEG	400	Degradação da EGCG				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
Ulceração Epitelial 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	
Edema 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo Vascularização do Tecido	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	
Conjuntivo 0 = Ausente 1 = Levemente aumentada 2 = Moderadamente aumentada	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	75%	25%	0	0	
3= Severamente aumentada  Necrose 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	

**Tabela 10.** Percentual dos escores da análise macroscópica das formulações EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) aos 21 dias.

21 dias	EG	CG + PE	G 400		E	GCG + PEG	400		EC	GCG + PEC	G 400		EGC	G + PI	G 400	)		PEG 40	0	
	0 (	1,25 mg, 1	/mL) 2	3	0	(5 mg/m	L) 2	3	0	(10 mg/n 1	nL) 2	3	0 (2	0 mg/	mL) 2	3	0	1	2	3
	U	-	2	3	U		2	3	U	-	2	3	U		2	3	U	-	2	3
Ulceração Epitelial																				
0= Ausente / 1= Leve	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Edema																				
0= Ausente / 1= Leve	0	100%	0	0	50%	50%	0	0	25%	75%	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Vascularização do Tecido																				
Conjuntivo																				
0= Ausente																				
1= Levemente aumentada	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	100%	0	0	0	75%	25%	0	0
2=Moderadamente																				
aumentada																				
3= Severamente aumentada																				
Necrose																				
0= Ausente / 1= Leve	75%	25%	0	0	100%	0	0	0	75%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				

63 dias

Os parâmetros macroscópicos avaliados estão descritos a seguir e podem ser verificados na figura 13 e nas tabelas 11 e 12. De acordo com os resultados analisados aos 63 dias, os grupos avaliados apresentavam características semelhantes nos parâmetros analisados e não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados (p>0,05).

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com presença de ulceração epitelial, necrose e edema em grau leve, e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada em 50% da amostra.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras e aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com presença de ulceração epitelial leve (75%) a moderada (25%), necrose (100%) e edema (100%) em grau leve, e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentada em 100% das amostras.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial e necrose, 50% da amostra apresentava edema em grau leve, bem como 50% da amostra apresentava vascularização do tecido conjuntivo levemente aumentada.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com presença de ulceração epitelial em 25% da amostra em grau leve e 50% em grau moderado. Quanto à necrose, a amostra apresentou 25% sendo em grau leve e 50%

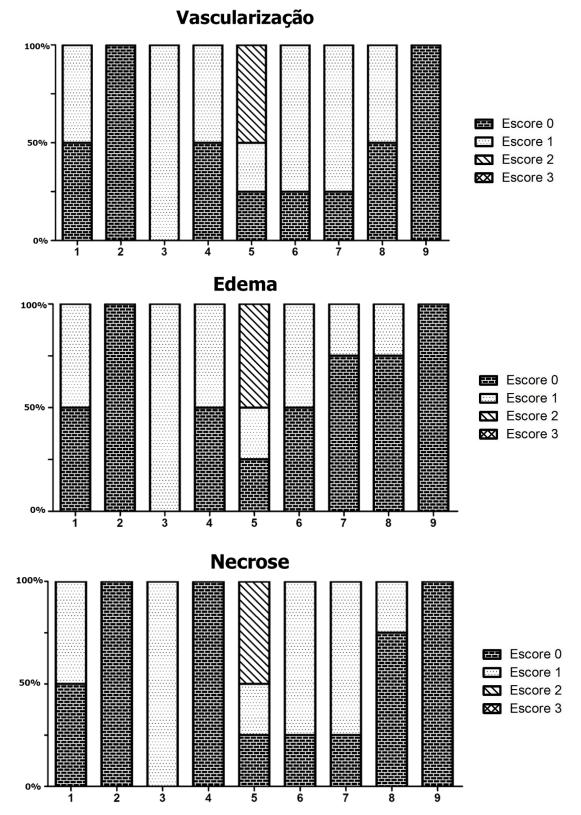
sendo em grau severo. O edema também foi avaliado e observou-se que 25% da amostra apresentava grau leve e 50% grau moderado, e a vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se moderadamente aumentada em 50% da amostra.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial em 100% da amostra, os aspectos de necrose, edema e vascularização apresentava-se em grau leve.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial em 100% da amostra, os aspectos de necrose, edema e vascularização apresentavam grau leve/ausente.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se parcialmente íntegras, com ausência de ulceração epitelial em 100% da amostra. Os aspectos de necrose e edema apresentavam-se em grau leve em 25% da amostra. O processo de vascularização do tecido conjuntivo apresentava-se levemente aumentado em 50% da amostra.

As estruturas dérmicas e epidérmicas encontravam-se íntegras, com ausência de ulceração epitelial, necrose e edema, em 100% das amostras e aspecto de normalidade da vascularização do tecido conjuntivo.



**Figura 13.** Porcentagem dos escores referente aos parâmetros avaliados macroscopicamente aos 63 dias. Escore 0: Ausente, Escore 1: Suave, Escore 2: Moderado e Escore 3: severo. **1.** Pasta Calen (controle negativo), **2.** EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>0, **3.** EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **4.** Degradação da EGCG, **5.** EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **6.** EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **7.** EGCG + PEG 400(10 mg/mL), **8.** EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **9.** PEG 400 (controle negativo).

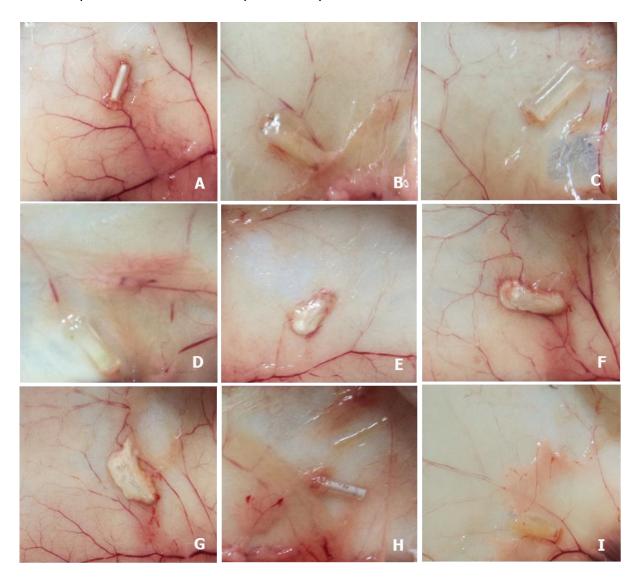
**Tabela 11.** Percentual dos escores da análise macroscópica das formulações Calen, EGCG (0,12 mg) + H2O, EGCG (0,12 mg) + PEG 400 e Degradação da EGCG aos 63 dias

63 dias		Cal	en		EG	GCG (0,12 mg) + H2O			EGCG (0,12 mg) + PEG 400				Degradação da EGCG			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Ulceração Epitelial 0= Ausente / 1= Leve	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo	100%	U	U	U	10076	U	U	U	100%	U	U	U	100%	U	U	U
Edema	F00/	F00/	0	0	1000/	•	0	0	0	1000/	0	•	F00/	F00/	0	•
0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo Vascularização do Tecido Conjuntivo 0= Ausente	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	0	100%	0	0	50%	50%	0	0
1= Levemente aumentada 2=Moderadamente aumentada 3= Severamente aumentada <b>Necrose</b>	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	0	100%	0	0	50%	50%	0	0
0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	50%	50%	0	0	100%	0	0	0	0	100%	0	0	100%	0	0	0

**Tabela 12.** Percentual dos escores da análise macroscópica das formulações EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) aos 63 dias

mg/mz, 10 mg/mz e 20 mg/mz/ dos 05 dids																				
63 dias	EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL)				EGCG + PEG 400				EGCG + PEG 400 (10 mg/mL)				EGCG + PEG 400 (20 mg/mL)				PEG 400			
					(5 mg/mL)															
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Ulceração Epitelial																				
0= Ausente / 1= Leve	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Edema																				
0= Ausente / 1= Leve	25%	25%	50%	0	50%0	50%	0	0	75%	25%	0	0	70%	25%	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Vascularização do Tecido																				
Conjuntivo																				
0= Ausente																				
1= Levemente aumentada	25%	25%	50%	0	25%	25%	50%	0	25%	75%	0	0	50%	50%	0	0	100%	0	0	0
2=Moderadamente																				
aumentada																				
3= Severamente aumentada																				
Necrose																				
0= Ausente / 1= Leve	25%	25%	50%	0	25%	25%	50%	0	25%	75%	0	0	70%	25%	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				

Na Figura 14 observa-se um espécime de cada formulação avaliada que é representativo de todos os períodos experimentais deste estudo.



**Figura 14.** Aspecto macroscópico do período experimental de 21 dias. **A.** Grupo Pasta Calen (controle), **B.** Grupo EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>O, **C.** Grupo EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **D.** Grupo Degradação da EGCG, **E.** Grupo EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **F.** Grupo EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **G.** Grupo EGCG + PEG 400 (10 mg/mL), **H.** Grupo EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **I.** Grupo PEG 400,

# Avaliação Microscópica

#### 7 dias

Os parâmetros microscópicos avaliados estão descritos a seguir e podem ser verificados na figura 15 e nas tabelas 13 e 14. Aos 7 dias, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados, quanto aos parâmetros infiltrado inflamatório, angiogênese e cápsula fibrosa. Não foi evidenciada a presença de focos de abscessos, edema e necrose em nenhum grupo (p>0,05).

## Grupo 1: Pasta Calen (Controle Negativo)

Observou-se início da formação de tecido reparativo cicatricial, com presença de fibras colágenas finas e organizadas, determinando a formação de uma cápsula fibrosa fina, envolvendo todo o implante. Verificou-se infiltrado inflamatório ausente ou suave, sem focos de abscesso.

Os espécimes desse grupo foram caracterizados pela presença de tecido reparativo cicatricial, com presença suave de células inflamatórias tipo neutrófilos na extremidade aberta do tubo. Havia a presença de fibras colágenas finas, presença de fibroblastos jovens sem o aspecto de um fibrosamento uniforme, determinando a presença de uma cápsula fibrosa de espessura bem fina, envolvendo todo o implante. Havia a formação de poucos vasos sanguíneos de pequeno calibre. Não foi verificado a presença de focos de abscesso, edema e necrose.

Observou-se o início da formação de tecido reparativo cicatricial, com presença suave de células inflamatórias neutrofílicas. As fibras colágenas presentes apresentavam-se bem delimitadas e organizadas, com presença de fibroblastos jovens e maduros, determinando a presença de uma cápsula fibrosa de espessura média, envolvendo todo o implante. Foi verificada a ausência de focos de abscesso, formação de novos vasos, edema e necrose.

#### Grupo 4: Produto da degradação da EGCG

Os espécimes avaliados apresentavam início da formação de tecido reparativo cicatricial, com ausência de fibras colágenas. Não se verificou a presença de infiltrado inflamatório, nem de focos de abscesso.

Neste grupo foi possível verificar a formação de um tecido de granulação, com a presença de infiltrado inflamatório suave com predominância de neutrófilos. Observouse a presença de fibras colágenas finas e imaturas, bem como a presença de

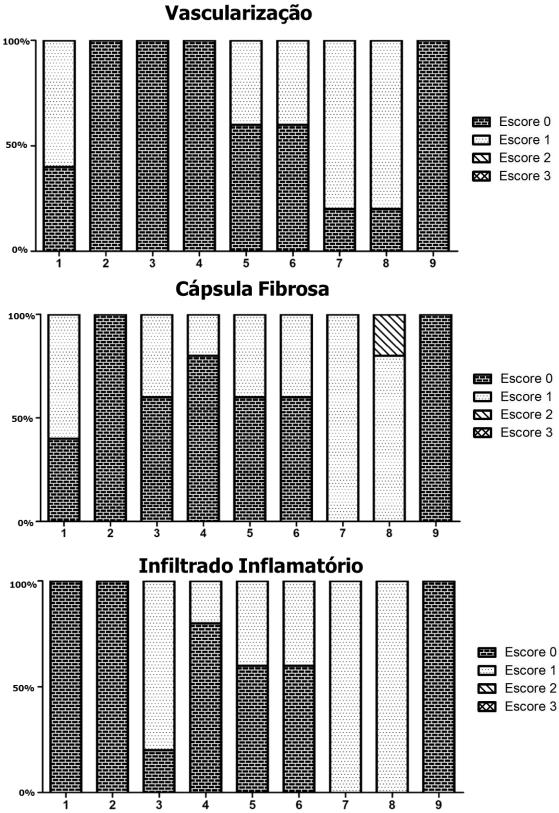
fibroblastos jovens, determinando a presença de uma cápsula fibrosa fina e pouco organizada. Havia formação de novos vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre. Não foi observado presença de focos de abscesso, edema e necrose nos grupos avaliados.

Grupo 6 (EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), 7 (EGCG + PEG 400 (10 mg/mL), EGCG + PEG 400 (20 mg/mL)

Neste grupo foi possível verificar a formação de um tecido de granulação, com a presença de infiltrado inflamatório suave com predominância de neutrófilos. Observouse a presença de fibras colágenas finas e imaturas, bem como a presença de fibroblastos jovens, determinando a presença de uma cápsula fibrosa fina e pouco organizada. Havia formação de novos vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre. Não foi observado presença de focos de abscesso, edema e necrose nos grupos avaliados.

## Grupo 9: PEG 400 (Controle Negativo)

A resposta tecidual observada neste grupo foi a formação de tecido de reparação, com presença de fibras colágenas finas contínuas e organizadas, envolvendo todo o implante. Também foi possível verificar a presença de um leve infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos polimorfonucleares na abertura do tubo, com ausência de foco de abscessos.



**Figura 15.** Porcentagem dos escores referente aos parâmetros avaliados microscopicamente aos 7 dias. Escore 0: Ausente, Escore 1: Suave, Escore 2: Moderado e Escore 3: severo. **1.** Pasta Calen (controle negativo), **2.** EGCG (0,12 mg) +  $H_2$ 0, **3.** EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **4.** Degradação da EGCG, **5.** EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **6.** EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **7.** EGCG + PEG 400 (10 mg/mL), **8.** EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **9.** PEG 400 (controle negativo).

**Tabela 13.** Percentual dos escores da análise microscópica das formulações Calen, EGCG (0,12 mg) + H2O, EGCG (0,12 mg) + PEG 400 e Degradação da EGCG aos 7 dias

7 dias		Cal	en		EG	CG (0,12	mg) + H2	20	EGC	G (0,12 m	g) + PEG	400	D	egradação	da EGC	G
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vascularização 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	40%	60%	0	0	100%	0	0	0	0	100%	0	0	100%	0	0	0
Cápsula Fibrosa I= Ausente / 1= Fina I= Moderada / 3= Espessa	40%	60%	0	0	100%	0	0	0	40%	40%	20%	0	80%	20%	0	(
nfiltrado Inflamatório = Ausente / 1= Leve =Modero / 3= Severo	100%	0	0	0	100%	0	0	0	0	80%	20%	0	80%	20%	0	C

**Tabela 14.** Percentual dos escores da análise microscópica das formulações EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) aos 7 dias

7 dias	ı	GCG + P	EG 400	00 EGCG + PEG 400			EGCG + PEG 400				EGCG + P	EG 400			PEG 400					
		(1,25 mg	J/mL)		(5 mg/mL)				(10 mg/r	nL)			(20 mg	/mL)						
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vascularização																				
0= Ausente / 1= Leve	60%	40%	0	0	60%	40%	0	0	20%	80%	0	0	20%	80%	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Cápsula Fibrosa																				
0= Ausente / 1= Fina	60%	40%	0	0	60%	40%	0	0	0	100%	0	0	0	80%	20%	0	100%	0	0	0
2= Moderada / 3= Espessa																				
Infiltrado Inflamatório																				
0= Ausente / 1= Leve	60%	40%	0	0	60%	40%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	100%	0	0	0
2=Modero / 3= Severo																				

#### 21 dias

Os parâmetros microscópicos avaliados estão descritos a seguir e podem ser verificados na figura 16 e nas tabelas 15 e 16. Aos 21 dias, observou-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados quanto ao parâmetro infiltrado inflamatório, angiogênese e cápsula fibrosa quando realizada a comparação entre os grupos e o grupo controle (p>0,05). Não foi evidenciada a presença de focos de abscessos, edema e necrose em nenhum grupo avaliado.

## Grupo 1: Pasta Calen (Controle Negativo)

Observou-se formação de tecido reparativo cicatricial, com presença de fibras colágenas contínuas e organizadas, caracterizando uma cápsula fibrosa fina, envolvendo todo o implante. Verificou-se a presença de um infiltrado inflamatório suave mononuclear, permeado por neutrófilos, na abertura do tubo não sendo verificada a presença de focos de abscesso.

Nos espécimes avaliados foi possível observar a formação de tecido de granulação, com presença de infiltrado inflamatório moderado, permeado por neutrófilos, células mononucleares. Foi observada presença de fibras colágenas contínuas e organizadas, presença de fibroblastos jovens e grande quantidade de fibroblastos maduros, caracterizando uma cápsula fibrosa de espessura média e bem organizada, envolvendo todo o implante. Os espécimes apresentavam formação de muitos vasos sanguíneos de pequeno calibre. Não havia a presença de focos de abscesso, edema e necrose.

A resposta tecidual à formulação *EGCG* (0,12 mg) + *PEG* 400 foi a formação de tecido reparativo cicatricial, com presença de infiltrado inflamatório suave quase ausente, sendo encontrado poucos neutrófilos. A cápsula fibrosa era fina, e envolvia todo o implante, este estrutura estava caracterizada por fibras colágenas contínuas, organizadas e bem delimitadas, com presença de fibroblastos maduros. Não houve a formação de novos vasos, bem como de presença de focos de abscesso, edema e necrose.

## Grupo 4: Produto da degradação da EGCG

Neste grupo foi possível verificar a formação intensa de um tecido de granulação, com a presença de infiltrado inflamatório suave a moderado com predominância de neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. Havia a presença de fibras colágenas de espessura média, contínuas, organizadas e bem delimitadas, caracterizando uma cápsula fibrosa de espessura moderada, envolvendo todo o implante. Houve a formação de novos vasos sanguíneos de calibre pequeno e não foi verificada presença de focos de abscessos, edema e necrose.

Grupo 5: EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), 6 (EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), 8 (EGCG + PEG 400 (20 mg/mL)

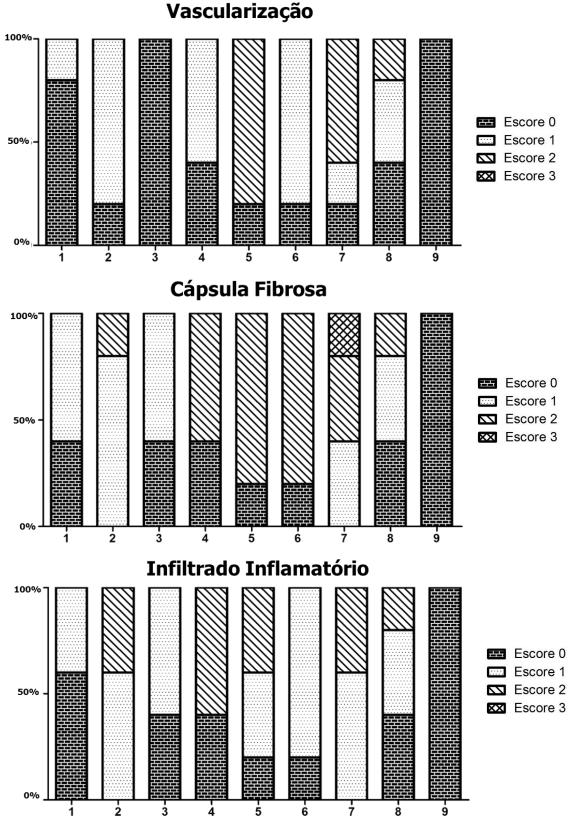
Nos espécimes avaliados foi possível observar a formação de um tecido de granulação, com presença de um infiltrado inflamatório moderado, permeado por neutrófilos, monócitos e linfócitos. Presença de fibras colágenas contínuas e organizadas, presença de fibroblastos jovens e grande quantidade de fibroblastos maduros, caracterizando uma cápsula fibrosa de espessura média e bem organizada, envolvendo todo o implante. Os espécimes apresentavam formação de muitos vasos sanguíneos de pequeno calibre. Não havia a presença de focos de abscesso, edema e necrose.

Grupo 7: EGCG + PEG 400 (10 mg/mL)

A resposta tecidual à formulação *EGCG + PEG 400(10 mg/mL)* foi a formação de um tecido de granulação, com presença de um infiltrado inflamatório suave a moderado, permeado por neutrófilos, linfócitos e monócitos. A cápsula fibrosa era espessa, e envolvia todo o implante, esta estrutura estava caracterizada por fibras colágenas de espessura média, contínuas, organizadas e bem delimitadas, com presença de fibroblastos maduros. Os espécimes apresentavam formação de muitos vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre. Não houve a presença de focos de abscesso, edema e necrose.

## Grupo 9: PEG 400 (Controle)

Observou-se formação de tecido reparativo cicatricial, com presença de fibras colágenas contínuas, organizadas e bem delimitadas, caracterizando uma cápsula fibrosa fina, envolvendo todo o implante. Também foi possível verificar a presença de um leve infiltrado inflamatório, composto por alguns neutrófilos, mas principalmente macrófagos e linfócitos na abertura do tubo e sem focos de abscesso.



**Figura 16.** Porcentagem dos escores referente aos parâmetros avaliados microscopicamente aos 21 dias. Escore 0: Ausente, Escore 1: Suave, Escore 2: Moderado e Escore 3: severo. **1.** Pasta Calen (controle negativo), **2.** EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>0, **3.** EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **4.** Degradação da EGCG, **5.** EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **6.** EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **7.** EGCG + PEG 400(10 mg/mL), **8.** EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **9.** PEG 400 (controle negativo).

**Tabela 15.** Percentual dos escores da análise microscópica das formulações Calen, EGCG (0,12 mg) + H2O, EGCG (0,12 mg) + PEG 400 e Degradação da EGCG aos 21 dias

21 dias Calen				E	GCG (0,12	mg) + H2	.o	EGC	G (0,12 m	g) + PEG	400	D	egradaçã	io da EGCG	;	
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vascularização 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	40%	60%	0	0	20%	80%	0	0	100%	0	0	0	40%	60%	0	0
<b>Cápsula Fibrosa</b> 0= Ausente / 1= Fina 2= Moderada / 3= Espessa	80%	20%	0	0	0	80%	20%	0	40%	60%	0	0	40%	0	60%	0
<b>Infiltrado Inflamatório</b> 0= Ausente / 1= Leve 2=Modero / 3= Severo	600%	40%	0	0	0	60%	40%	0	40%	60%	0	0	40%	0	60%	0

**Tabela 16.** Percentual dos escores da análise microscópica das formulações EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) aos 21 dias

21 dias	ı	EGCG + F	PEG 400		EGCG + PEG 400				EGCG +	PEG 400			EGCG + P	EG 400		PEG 400				
		(1,25 m	g/mL)		(5 mg/mL)				(10 m	g/mL)			(20 mg	/mL)						
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vascularização																				
0= Ausente / 1= Leve	20%	0	80%	0	20%	80%	0	0	20%	20%	60%	0	40%	40%	20%	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Cápsula Fibrosa																				
0= Ausente / 1= Fina	20%	0	80%	0	20%	0	80%	0	0	40%	40%	20%	40%	40%	20%	0	100%	0	0	0
2= Moderada / 3= Espessa																				
Infiltrado Inflamatório																				
0= Ausente / 1= Leve	20%	40%	40%	0	20%	80%	0	0	40%	60%	0	0	40%	40%	20%	0	100%	0	0	0
2=Modero / 3= Severo																				

63 dias

Os parâmetros microscópicos avaliados estão descritos a seguir e podem ser verificados na figura 17 e nas tabelas 17 e 18. Aos 63 dias, observou-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos nos parâmetros infiltrado inflamatório, angiogênese e cápsula fibrosa (p>0,05). Não foi evidenciada a presença de focos de abscesso, edema e necrose em nenhum grupo avaliado.

Não verificado a presença de cápsula fibrosa, angiogênese e infiltrado inflamatório, focos de abscesso, edema e necrose.

Foi possível observar a formação de tecido reparativo cicatricial, com infiltrado inflamatório moderado com predominância de células mononucleares A cápsula fibrosa apresentava-se com espessura média, com fibras colágenas espessas, bem definidas e organizadas. Não havia presença de formação de novos vasos sanguíneos, assim como, não havia presença de focos de abscesso, edema e necrose.

A resposta tecidual à formulação *EGCG* (0,12 mg) + *PEG* 400 foi a formação de tecido reparativo cicatricial, com presença de um infiltrado inflamatório discreto, sendo encontrados poucos neutrófilos. A cápsula fibrosa era fina e envolvia todo o implante. Esta estrutura estava caracterizada por fibras colágenas contínuas, organizadas e bem delimitadas, com presença de fibroblastos maduros. Não houve a formação de novos vasos, bem como de presença de focos de abscesso, edema e necrose.

#### Grupo 4: Produto da degradação da EGCG

Neste grupo foi possível verificar a formação de um tecido reparativo cicatricial, com a presença de infiltrado inflamatório suave com predominância de células mononucleares. Havia a presença de fibras colágenas de espessas, contínuas, bem organizadas e definidas, com predominância de fibroblastos maduros, caracterizando uma cápsula fibrosa espessa, envolvendo todo o implante. Havia a formação de poucos vasos sanguíneos de calibre pequeno, e não havia a presença de focos de abscesso, edema e necrose.

## Grupo 5: EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL) e 6 (EGCG + PEG 400 (5 mg/mL)

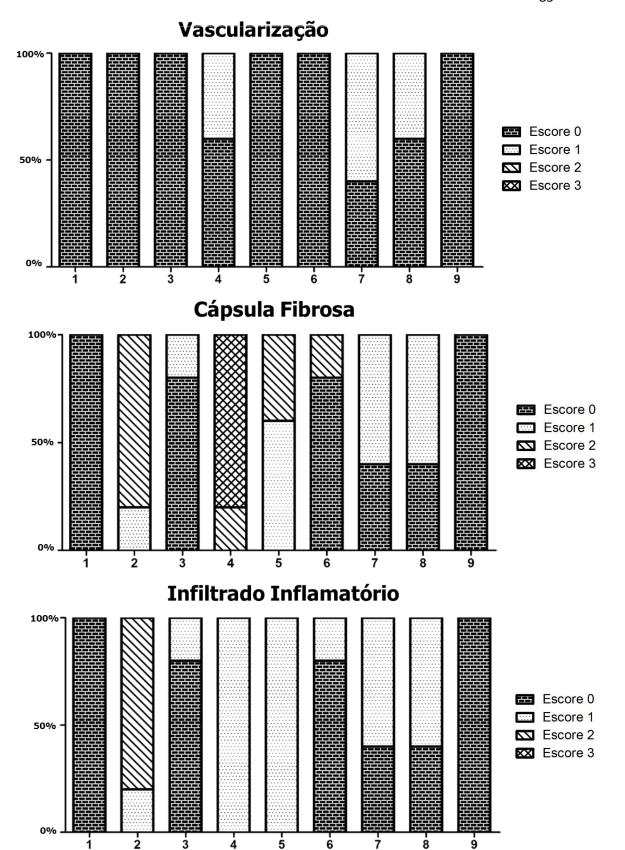
Nestes grupos foi possível verificar a formação de um tecido de granulação, com a presença de infiltrado inflamatório suave com predominância de células mononuclearess. Havia a presença de fibras colágenas de espessura fina e média, contínuas, pouco organizadas, com predominância de fibroblastos jovens, caracterizando uma cápsula fibrosa de espessura moderada, envolvendo todo o implante. Não havia a formação de novos vasos sanguíneos, bem como, presença de focos de abscesso, edema e necrose.

A resposta tecidual às formulações *EGCG + PEG 400(10 mg/mL)* e *EGCG + PEG 400 (20 mg/mL)* foi a formação de tecido de granulação, com presença de infiltrado inflamatório suave, permeado por neutrófilos e células mononucleares. A cápsula fibrosa apresentava-se espessa e envolvia todo o implante. Esta estrutura estava caracterizada por fibras colágenas de espessas e maduras, contínuas, organizadas e bem delimitadas, com presença predominante de fibroblastos maduros, podendo ser verificada a presença suave de alguns fibroblastos jovens. Os espécimes apresentavam formação de muitos vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre. Não houve a presença de focos de abscesso, edema e necrose.

## Grupo 9: PEG 400 (Controle Negativo)

Não foi observada a formação de cápsula fibrosa e não houve resposta inflamatória ou focos de abscesso.

Nas figuras 18 e 19, 20 e 21 é possível observar espécimes representativos, nas colorações de HE e fluorescência, do que ocorreu microscopicamente nos períodos de 7, 21 e 63 dias com as diferentes formulações avaliadas.



**Figura 17.** Porcentagem dos escores referente aos parâmetros avaliados microscopicamente aos 63 dias. Escore 0: Ausente, Escore 1: Suave, Escore 2: Moderado e Escore 3: severo. **1.** Pasta Calen (controle), **2.** EGCG (0,12 mg) + H<sub>2</sub>0, **3.** EGCG (0,12 mg) + PEG 400, **4.** Degradação da EGCG, **5.** EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL), **6.** EGCG + PEG 400 (5 mg/mL), **7.** EGCG + PEG 400(10 mg/mL), **8.** EGCG + PEG 400 (20 mg/mL), **9.** PEG 400 (controle).

**Tabela 17.** Percentual dos escores da análise microscópica das formulações Calen, EGCG (0,12 mg) + H2O, EGCG (0,12 mg) + PEG 400 e Degradação da EGCG aos 63 dias

63 dias	_	Calen			EGCG (0,12 mg) + H2O			EGCG (0,12 mg) + PEG 400			400		egradaçã	o da EGC	G	
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vascularização 0= Ausente / 1= Leve 2= Moderado / 3= Severo	100%	0	0	0	100%	0	0	0	100%	0	0	0	60%	40%	0	0
Cápsula Fibrosa 0= Ausente / 1= Fina 2= Moderada / 3= Espessa	100%	0	0	0	0	20%	80%	0	80%	20%	0	0	0	0	20%	80%
Infiltrado Inflamatório 0= Ausente / 1= Leve 2=Modero / 3= Severo	100%	0	0	0	0	20%	80%	0	80%	20%	0	0	0	100%	0	0

**Tabela 18.** Percentual dos escores da análise microscópica das formulações EGCG + PEG 400 (1,25 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL) aos 63 dias

	19/111		<u>J,                                      </u>		٠,															
63 dias		EGCG + PI	EG 400		ı	EGCG + P	EG 400			EGCG + F	PEG 400			EGCG + PE	G 400			PEG	400	
		(1,25 mg	/mL)			(5 mg/mL)				(10 mg	/mL)			(20 mg/	mL)					
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vascularização																				
0= Ausente / 1= Leve	100%	0	0	0	100%	0	0	0	40%	60%	0	0	60%	40%	0	0	100%	0	0	0
2= Moderado / 3= Severo																				
Cápsula Fibrosa																				
0= Ausente / 1= Fina	40%	60%	0	0	80%	0	20%	0	40%	60%	0	0	40%	60%	0	0	100%	0	0	0
2= Moderada / 3= Espessa																				
Infiltrado Inflamatório																				
0= Ausente / 1= Leve	0	100%	0	0	80%	20%	0	0	40%	60%	0	0	40%	60%	0	0	100%	0	0	0
2=Modero / 3= Severo																				

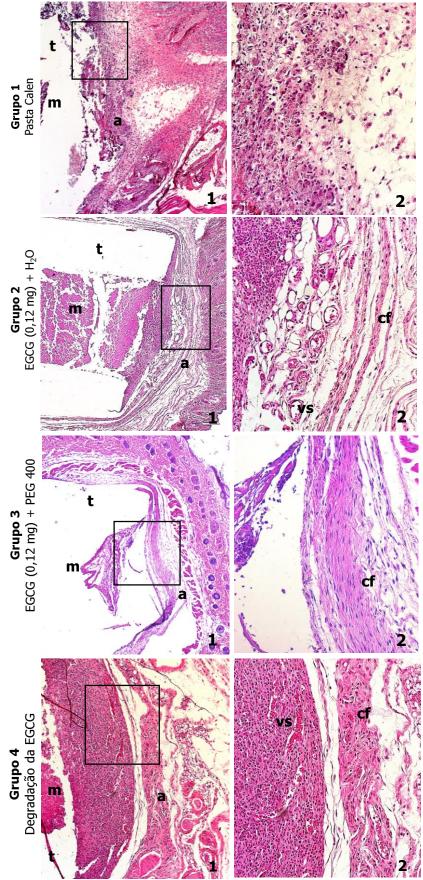
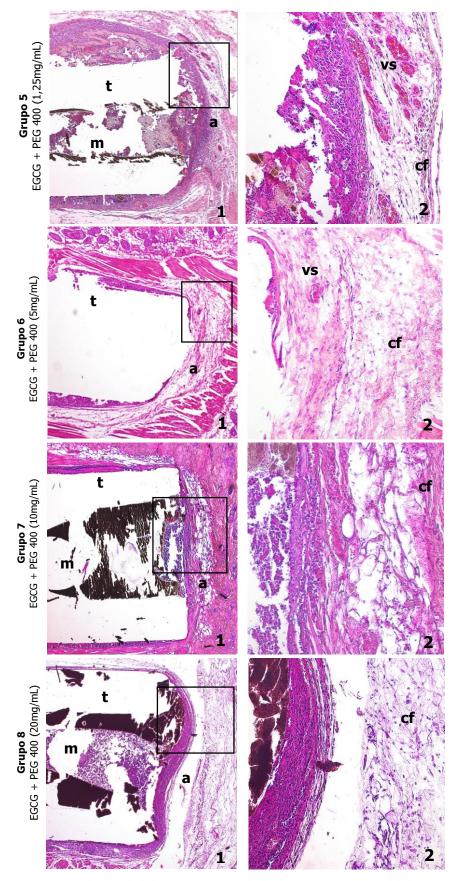


Figura 18. Imagens microscópicas representativas da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente às formulações testadas. Região de tubo de polietileno (t), o material testado no interior do tubo (m), abertura do tubo (a), vasos sanguíneos presentes (vs) e a cápsula fibrosa (cf). Coloração de HE. Aumento:, 1: 5x; 2: 20x.



**Figura 19.** Imagens microscópicas representativas da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente às formulações testadas. Nas imagens destaca-se a região de tubo de polietileno (t), o material testado no interior do tubo (m), região de abertura do tubo (a), o vasos sanguíneos presentes (vs) e a cápsula fibrosa (cf) **C**oloração de HE. Aumento: 1: 5x; 2: 20x.

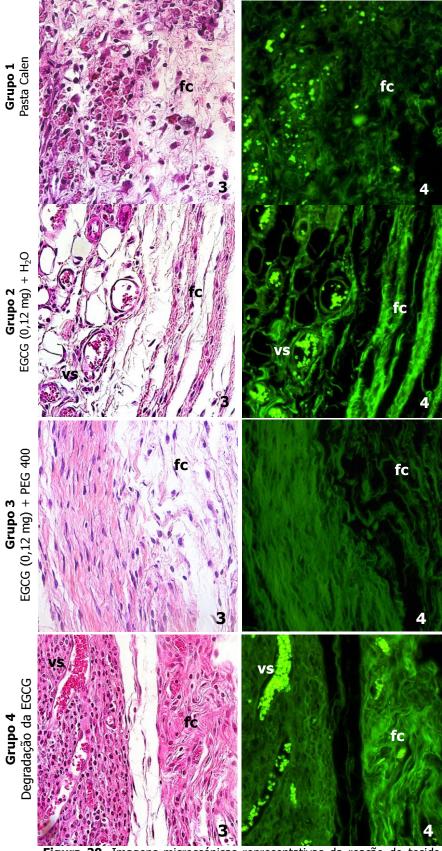
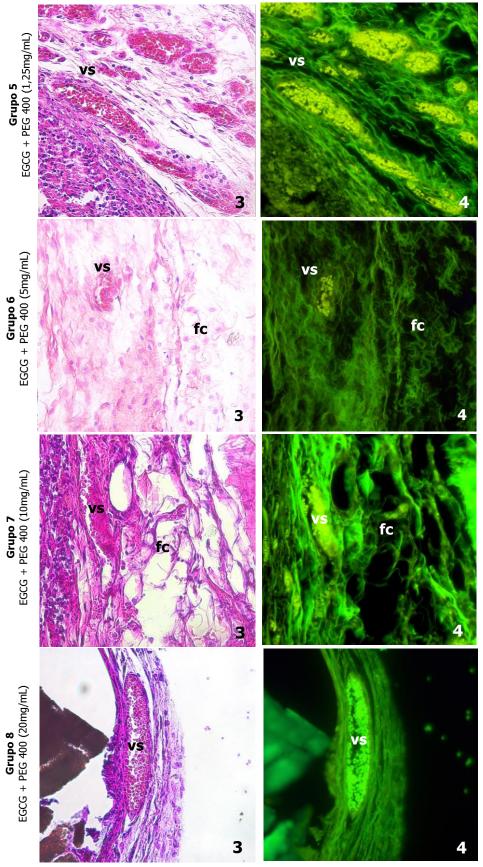


Figura 20. Imagens microscópicas representativas da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente às formulações testadas. Nas imagens destaca-se as fibras colágenas (fc), os vasos sanguíneos presentes (vs). 3: microscopia de luz convencional. 4: microscopia de fluorescência. Coloração de HE. Aumento: 40x.



**Figura 21.** Imagens microscópicas representativas da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente às formulações testadas. Nas imagens destaca-se as fibras colágenas (fc), os vasos sanguíneos presentes (vs). 3: microscopia de luz convencional. 4: microscopia de fluorescência. Coloração de HE. Aumento: 40x.



## 5 Discussão

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas com finalidade terapêutica há milhares de anos e embora seu uso tenha sido propagado popularmente entre gerações ou descrito em farmacopéias, também despertou o interesse da comunidade científica atual. O desenvolvimento da química orgânica tornou possível a obtenção de substâncias puras por meio do isolamento de princípios ativos de extratos de plantas (Turolla e Nascimento, 2006). A EGCG, uma das catequinas isoladas e purificadas a partir do chá-verde, avaliada no presente estudo, tornou-se uma das substâncias naturais mais estudadas atualmente, sendo a principal responsável pelos efeitos biológicos que resultam na prevenção e tratamento de diferentes doenças (Yun et al., 2007; Yang et al., 2010; Hodgson e Croft, 2010; Prabhakar et al., 2010; Rao e Pagidas, 2010; Yang e Wang, 2010; Rodriguez et al., 2011; Subramaniam et al., 2012; Jung et al., 2012; Cai et al., 2013; Wierzejska, 2014; Fang et al., 2015; Tenore et al., 2015). No entanto, muitas vezes o isolamento da substância responsável pelos efeitos terapêuticos da planta (princípio ativo), seu mecanismo de ação e seus efeitos biológicos não são totalmente conhecidos (Ferreira, 2013), existindo muito a se pesquisar acerca da totalidade das aplicações da EGCG.

Atualmente, muitos extratos de plantas contendo polifenóis biologicamente ativos vem sendo incorporados em formulações cosméticas ou farmacêuticas com diferentes finalidades. No entanto, o preparo de formulações para uso tópico é delicado pois os polifenóis naturais não apresentam estabilidade ao longo do tempo, sendo muito sensíveis aos fatores ambientais, incluindo condições físico-químicas e biológicas. Estes podem oxidar rapidamente, o que leva ao aparecimento gradual de coloração castanha e indesejável, ou sofrer perda considerável de sua atividade (Munin e Edwards-Lévy, 2011). Ainda, estudos têm revelado que as múltiplas funções e mecanismos exercidos pelos compostos fenólicos no organismo estão relacionados não apenas à sua ação antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral e reparadora diretas, mas também à habilidade dessas substâncias de se ligarem a proteínas, receptores celulares e transportadores de membrana, podendo influenciar a expressão gênica, sinalização e adesão celular (Kroow e Williamson, 2005; Silva et al., 2010). Tais características fazem com que tais compostos possam exercer variadas funções no organismo humano (Giada e Mancini Filho, 2006). Assim, o desenvolvimento de novas formulações à base de extratos naturais visando avaliar potenciais aplicações no tratamento de doenças, como no presente estudo, devem incluir não apenas a análise de suas propriedades físico-químicas, mas também de seus possíveis efeitos biológicos (Reto et al., 2007).

Apesar dos inúmeros benefícios apresentados pela EGCG na saúde, atuando de forma sistêmica em doenças cardiovasculares, neuronais, degenerativas, hepáticas, oftálmicas, ósseas ou dérmicas (Zhao et al., 2012; Scalia et al., 2013; Reygaert e Jusufi, 2013, Rieghsecker et al., 2013; Aslan et al., 2014; Gundimeda et al., 2014; Zhou et al., 2014; Yoshino et al., 2014; Chen et al., 2014; Wang et al., 2014; Walker et al., 2015), seu uso tópico intracanal, como curativo de demora durante o tratamento endodôntico, não havia sido proposto pela literatura. Um único estudo avaliou o efeito sistêmico da EGCG em lesões periapicais, administrada por via intra-peritoneal (80 mg/kg peso) em camundongos, onde verificou-se acentuada redução na extensão e severidade de lesões periapicais associadas a dentes portadores de necrose pulpar (Lee et al., 2009). No entanto, este estudo empregou a da EGCG de forma sistêmica para o tratamento de uma doença que apresenta etiopatogenia local. Sabese que o sucesso no tratamento de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente depende da atuação essencialmente local realizada por meio da desinfecção do sistema de canais radiculares e região periapical, que abrigam os microorganismos responsáveis pelo aparecimento e manutenção da doença (Kakehashi et al., 1965; Tronstad, 1992). Por esse motivo, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar uma formulação à base de EGCG para uso endodôntico, que além de atividade antimicrobiana, apresentasse compatibilidade tecidual e favorecesse o reparo.

Atualmente, o hidróxido de cálcio (pasta Calen®) tem sido a medicação mais empregada como curativo de demora por apresentar requisitos necessários para esta finalidade, incluindo ação antimicrobiana, inativação da endotoxina bacteriana (LPS), redução do processo imunoinflamatório e edema, inibição da reabsorção e estímulo à reparação dos tecidos mineralizados, biocompatibilidade e baixo custo (Georgopoulou et al., 1993; Safavi e Nichols, 1994; Nelson-Filho et al., 1999, Leonardo et al., 2000). O acréscimo de diferentes substâncias, bem como os veículos utilizados nas pastas à base de hidróxido de cálcio (pasta Calen), têm sido propostos com o objetivo de melhorar algumas de suas propriedades, como a ação antibacteriana contra bactérias resistentes ao tratamento, como a E.faecalis (De Rossi et al., 2005; Verma et al., 2015), a velocidade de dissociação iônica e outras propriedades físico-químicas que também possam favorecer as condições clínicas para seu emprego (Almyroudi et al., 2002). No entanto, até o momento não existe um tratamento ideal ou uma medicação que resulte em 100% de sucesso clínico, radiográfico, microbiológico e histopatológicos. Estudos *in vitro* evidenciam que os polifenóis do chá verde apresentam eficácia antimicrobiana contra grande parte de microrganismos endodontopatogênicos (Horiba et al., 1991), incluindo o *E. faecalis* (Prabhakar et al., 2010), espécie comumente detectada em lesões refratárias ao tratamento (Stuart et al., 2006), além de apresentar compatibilidade com células do ligamento periodontal (Hwang et al., 2011; Jung et al., 2011; Poi et al., 2013; Ghasempour et al., 2015). Diante destas e das demais propriedades benéficas da EGCG, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação que possibilitasse sua aplicação e manutenção no interior dos canais radiculares por tempo prolongado, que se mantivesse na sua forma biológica ativa e fosse biocompatível. Assim, foi inicialmente necessária a caracterização de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas em diferentes meios e condições locais.

Em estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, a caracterização físicoquímica da EGCG revelou que esta não altera a cor dos dentes e apresenta estabilidade em contato com os tecidos dentais e em pH ácido, ambiente presente em áreas de inflamação e reabsorção, como nas lesões periapicais (Ferreira, 2013). Após a caracterização físico-química inicial da EGCG em água, buscamos sua associação com um veículo que apresentasse condições de uso clínico e pudesse ser levada no interior dos canais radiculares e mantida por períodos prolongados. A água, apesar de ser um solvente universal e ser indicada pelo fabricante da EGCG como diluente, não apresenta características físicas favoráveis para utilização como medicação intracanal, pois é rapidamente solubilizada e reabsorvida pelo organismo (Ballal et al., 2010), o que manteria o canal radicular vazio na maioria do período entre as sessões de tratamento. Assim, foi testada a associação da EGCG com um veículo viscoso, o PEG 400, um polímero flexível, que foi selecionado por ser biocompatível e permitir que a substância seja liberada de forma lenta por um período tempo prolongado (Klibanov et al., 1990; Allen et al., 1991; Torchilin, 2005). As diferentes concentrações avaliadas no presente estudo (1,25; 5; 10 e 20 mg/mL), foram determinadas com base em estudos prévios (Hirasawa et al., 2004; Schmitz, 2005; Lee et al., 2009; Xu et al., 2011). O PEG é também o veículo presente no curativo de demora mais consagrado na literatura e utilizado na prática clínica por nosso grupo de pesquisa, a pasta Calen. No entanto, outros veículos também poderiam ser testados em estudos futuros, como o propilenoglicol ou glicerina (Zhao et al., 2012), ou mesmo outras formas de aplicação, como os sistemas de liberação de drogas nanoestruturados, como o encapsulamento de fármacos com nanopartículas poliméricas, sistemas lipossomais ou nano partículas lipídicas sólidas (Marcato et al., 2014).

Além da presença do princípio ativo (EGCG) e do veículo, uma formulação de uso intracanal deve apresentar um agente radiopacificador, para que possa ser evidenciada radiograficamente, visando avaliar o completo preenchimento do canal radicular. Uma vez que o óxido de zinco é um radiopacificador consagrado (Antonijević et al., 2014) e também está presente na pasta Calen, com comprovada compatibilidade tecidual, no presente estudo este também foi incluído na formulação proposta. A adição do pó do óxido de zinco proporcionou

obtenção de uma coloração branca opaca e de uma consistência mais pastosa que permitiu não apenas sua visualização radiográfica, mas também sua adesão à lima endodôntica e às paredes do canal radicular, tornando sua aplicação clínica facilitada em comparação com a pasta Calen (dados não publicados). Outros radiopacificadores, tais como óxido de bismuto, de eficácia clínica e biológica comprovadas também poderiam ter sido adicionados.

Assim, fez-se necessário avaliar as propriedades físico-químicas da EGCG na presença do radiopacificador, visto que seu comportamento poderia ser influenciado na presença de íons metálicos, tais como, Fe²+, Cu²+, Zn²+ (Kagaya et al., 2002; Yang et al., 2009; Zeng e Tan, 2015). Um estudo realizado por meio de espectroscopia de absorção UV/Vis demonstrou que a atividade hepatoprotetora da EGCG foi consideravelmente aumentada pela sua complexação com o Zn²+(Kagaya et al., 2002). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde a espectroscopia de absorção UV/Vis também revelou a ocorrência de complexação da EGCG com o Zn²+. A interação dessas substâncias pode ser justificada por meio da complexação do Zn²+ com os grupos carboxilatos presentes na estrutura química da EGCG. No entanto essa interação parece não interferir em sua ação biológica pois a EGCG em associação com o Zn²+, além de aumentar sua eficácia (Kagaya et al., 2002), pode apresentar potencial anti-apoptótico em células cancerígenas (Yang et al., 2009), bem como em células cardíacas (Zeng e Tan, 2015).

Após a avaliação das propriedades físico-químicas da formulação desenvolvida, que demonstraram manutenção das propriedades da EGCG na presença dos componentes da fórmula, foi realizado o estudo de compatibilidade tecidual no tecido subcutâneo de camundongos. O teste de compatibilidade tecidual em tecido subcutâneo é utilizado para avaliar a resposta biológica do tecido frente ao material implantado (ISO, 2007). Essa metodologia é muito utilizada em estudos de compatibilidade de novos materiais de uso endodôntico (Queiroz et al., 2011; Andolfato et al., 2012; Trichês et al., 2013; Garcia et al., 2014; Mori et al., 2014; Lima et al., 2015). De acordo com normas estabelecidas pela ISO 10993-6 (2007), os períodos de avaliação dos materiais podem ser curtos, de até 12 semanas, onde avaliam-se os efeitos subcrônicos do material ou longos, superiores a 12 semanas, onde avaliam-se os efeitos crônicos do material. No presente estudo utilizamos os períodos experimentais de 7, 21 e 63 dias, à semelhança do que foi realizado em outros estudos (Queiroz et al., 2011; Lima et al., 2015), sendo classificados como períodos curtos onde foram avaliados os efeitos subcrônicos dos materiais. A opção por estes períodos também foi baseada no fato de o tempo clínico de permanência de um curativo de demora no interior dos canais radiculares ser de no mínimo 14 dias e no máximo 60 dias. Períodos longos também não foram avaliados visando atender a legislação brasileira relativa aos procedimentos para o uso

científico de animais (Lei 11.794, de 8 de Outubro de 2008), que estabelece em seu artigo 13°, parágrafo 4°, que "...o tempo de duração de um experimento será o mínimo indispensável para a produzir o resultado conclusivo, poupando-se ao máximo, o animal de sofrimento."

A normatização da ISO (2007) preconiza que para estudos de avaliação em períodos curtos podem ser utilizados animais de pequeno porte, tais como, camundongos, ratos, hamsters ou coelhos. No presente estudo optou-se pelo uso de camundongos isogênicos por se tratar de animais de pequeno porte, de fácil manejo, com baixo custo de manutenção, necessidade de menor quantidade de drogas anestésicas e facilidade de obtenção, bem como ao fato de serem geneticamente semelhantes e produzirem um padrão de resposta mais homogênea frente aos mesmos estímulos (Queiroz et al., 2011; Lima et al., 2015). Por apresentarem consistência líquida ou semi-sólida, as formulações foram inseridas no interior de tubos de polietileno de características e dimensões padronizadas pela ISO, possuindo apenas uma extremidade aberta, onde o material entra em contato com o tecido conjuntivo, de forma semelhante ao ápice de um canal radicular onde a medicação também entra em contato com o tecido conjuntivo periapical. A região selecionada para implante dos materiais nos animais foi a região dorsal, região também preconizada pelas normas da ISO, por evitar a tentativa de remoção pelo animal, o que pode interferir no resultados (Queiroz et al., 2011; Andolfato et al., 2012; Trichês et al., 2013; Garcia et al., 2014; Mori et al., 2014; Lima et al., 2015).

Na primeira avaliação biológica das formulações a serem testadas foi realizado o teste edemogênico de Azul de Evans, que quantifica o extravasamento plasmático após 24 horas da inserção do implante. Esse teste tem sido utilizado com frequência para avaliar a intensidade da reação inflamatória aguda, mensurando por meio de espectrofotometria, a densidade óptica de uma solução com corante extraído de um fragmento de tecido inflamado (Gehlen et al., 2004; Martínez-Colomer et al., 2015). No presente estudo, o extravasamento de plasma foi avaliado 24 horas após a implantação subcutânea dos tubos, sendo a exsudação nos tecidos circundantes observada com maior intensidade nos animais implantados com Pasta Calen e com menor intensidade naqueles implantados com produto da degradação da EGCG. Outra metodologia utilizada para verificação da presença ou ausência de edema na região do implante no período de 24hs, inclui a análise histopatológica e coloração em HE (Nelson-Filho et al., 1999), que oferece dados descritivos. Não existem na literatura estudos que tenham avaliado o edema nas formulações à base de EGCG testadas, no entanto um estudo apresentou resultados onde a EGCG desempenhou um efeito anti-exudativo em animais que foram submetidos à lesão medular induzida após 24, 48 e 72 horas (Ge et al., 2013) e outro estudo demonstrou que doses mais elevadas de EGCG (50mg/Kg) podem reduzir o edema no cérebro após isquemia unilateral (Lee et al., 2004). O teste edemogênico, aplicado no presente estudo permitiu verificar que a maioria das formulações à base de EGCG testadas tiveram um pequeno extravasamento plasmático, em comparação com o grupo controle embora não fossem estatisticamente diferentes. A única formulação que resultou em redução significativa do edema, quando comparada à pasta Calen, foi o produto da degradação da EGCG, sugerindo efeito antiedemogênico superior, características que poderia ser benéfica embora esta diferença não tenha ocorrido nas demais formulações. Este resultado pode ter ocorrido pelo fato da EGCG necessitar algum tempo para liberação de outro subproduto biologicamente ativo para exercer seu efeito, e este subproduto apareceu apenas nesta formulação que foi preparada com antecedência, permitindo sua degradação e liberação do composto. Estudos futuros poderiam ser realizados visando determinar se a principal substância ativa da formulação é a EGCG ou algum outro componente, ainda não conhecido.

Os resultados histopatológicos macroscópicos e microscópicos do presente estudo confirmaram a compatibilidade tecidual de todas as formulações avaliadas. Nos parâmetros macroscópicos, em todos os períodos avaliados, todas as formulações apresentaram compatibilidade tecidual, ausência de ulceração epitelial, presença de leve necrose tecidual superficial, edema e vascularização, não havendo diferença estatisticamente significante entre os grupos e com o grupo controle. A ocorrência de necrose superficial inicial, constitui processo benéfico para iniciar o reparo dos tecidos, e embora seja mecanismo de ação conhecido pelo hidróxido de cálcio, não havia sido relatada pela EGCG. Na análise microscópica, em todos os períodos foi verificada ausência de focos de abscesso, edema e necrose e presença de suave ou moderado infiltrado inflamatório, cápsula fibrosa e neovascularização, semelhante entre todos os grupos. Interessantemente, a EGCG diluída em água, veículo sugerido pelo fabricante, apresentou a resposta inflamatória de severidade aumentada ao longo o período experimental avaliado, apresentando valores de escores maiores que sua associação com PEG 400 aos 63 dias. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significante, estes resultados sugerem que a EGCG seja mais ativa em veículo aquoso, quando recém manipulada. Sabe-se que a ativação da resposta inflamatória é fundamental no processo de reparação tecidual, no entanto esta deve ocorrer de forma suave, como verificado em todas as formulações e em todos os períodos avaliados.

Quanto ao parâmetro de vascularização do tecido conjuntivo ou angiogênese, todas as formulações avaliadas resultaram na formação de novos vasos sanguíneos de maneira semelhante. A avaliação da neovascularização é de grande importância, pois durante no processo de reparo, é necessário que se tenha irrigação abundante de sangue, para atender às demandas locais de debridamento, proliferação de fibroblastos, síntese de matriz

extracelular e epitelização (Thompson et al., 1991; Arnold e West, 1991; Bodary et al., 2002). Os recentes avanços no entendimento da neovascularização tem feito da angiogênese um alvo principal no estudo sobre reparo (Liapakis et al., 2008). Portanto há um grande interesse da ciência em se investigar fármacos que possuem essa capacidade de indução de neoformação vascular (Suganami et al., 2004). No presente estudo podemos afirmar que todas as formulações tiveram essa capacidade de formação de vasos sanguíneos de maneira suave. Essa capacidade pode ser justificada pela presença da EGCG que possui a capacidade de controlar o processo de neoformação vascular. Um estudo mostrou a vascularização de forma controlada da EGCG na neovascularização de córnea em coelhos, por meio da inibição de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e cicloxigenase-2 (COX-2) os quais são fatores conhecidamente pró-angiogênicos (Koh et al., 2014). Outro estudo sobre o tratamento de células cancerígenas com a utilização da EGCG, observou que esta foi capaz de modular as vias angiogênicas, interferindo com o padrão de transcrição de diversos genes que atuam tanto em células endoteliais, quanto em células tumorais. O tratamento com EGCG também pode diminuir a taxa de proliferação de células tumorais, inibir a adesão celular, motilidade e capacidade de invasão celular (Tudoran et al., 2012).

Os resultados do presente estudo resultaram no depósito de patente da formulação de EGCG desenvolvida (De Rossi et al., 2014). Considerando que todas as concentrações de EGCG avaliadas foram igualmente eficazes e biocompatíveis de acordo com os parâmetros avaliados no presente estudo a opção de escolha poderia ser a de menor concentração (1,25 mg/mL), visando reduzir custos, manipulada com PEG 400. No entanto, a concentração ideal deve ser avaliada em estudos *in vivo* para avaliar o reparo de lesões periapicais pois outras propriedades importantes, como ação antimicrobiana, inibidora de LPS ou indutora de mineralização também podem ser alteradas. A obtenção de um sistema de aplicação nanoestruturado de EGCG também poderá oferecer inúmeras vantagens com relação ao sistema de aplicação convencional incluindo maior eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada do fármaco, administração segura, sem reações inflamatórias locais ou efeitos colaterais e possibilidade de direcionamento a alvos específicos (Mufamandi et al., 2011). Assim, estudos futuros devem ser realizados para avaliar a possibilidade de redução de custo e maximização de efeito desta formulação, como por meio da aplicação de tecnologias de liberação controlada de substâncias para uso terapêutico.

**C**onclusão

# **6 Conclusão**

No presente estudo foi possível desenvolver uma formulação para uso endodôntico composta por um veículo viscoso (PEG 400) e um agente radiopacificador (OZ). As propriedades físico-químicas da EGCG foram mantidas, quando esta foi avaliada na presença dos componentes das formulações. As formulações avaliadas apresentaram compatibilidade tecidual com o tecido subcutâneo de camundongos.

# **R**EFERÊNCIAS

Adikesavan G, Vinayagam MM, Abdulrahman LA, Chinnasamy T. (-)-Epigallocatechingallate (EGCG) stabilize the mitochondrial enzymes and inhibits the apoptosis in cigarette smoke-induced myocardial dysfunction in rats. Mol Biol Rep 2013;40:6533-45.

Adrian JE, Wolf A, Steinbach A, Rössler J, Süss R. Targeted Delivery to Neuroblastoma of Novel siRNA-anti-GD2-liposomes Prepared by Dual Asymmetric Centrifugation and Sterol-Based Post-Insertion Method. Pharm Res 2011;28:2261-72.

Ahmed S. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise. Arthritis Res Ther 2010;12:208.

Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. Endod Dent Traumatol 1987;3:240-4.

Anghileri LJ, Thouvenot P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. Biol Trace Elem Res 2000;73:251-258.

Anita P, Sivasamy S, Madan Kumar PD, Balan IN, Ethiraj S. *In vitro* antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. J Basic Clin Pharm 2014;6:35-9.

Aslan C, Melikoglu C, Ocal I, Saglam G, Sutcu R, Hosnuter M. Effect of epigallocatechin gallate on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat epigastric island flap. Int J Clin Exp Med 2014;7:57-66.

Assed S. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1994.

Bahoruna T, Luximon-Ramma A, Gunness T, Sookar D, Bhoyroo S, Jugessur R, Reebye D, Googoolye K, Crozier A, Aruoma O. Black tea reduces uric acid and C-reactive protein levels in humans susceptible to cardiovascular diseases. Toxicology 2010;278:68–74.

Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod 2004; 30:413-7.

Basu A, Lucas E. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. Nutr Rev 2007;65:361-5.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J 2006;39:10-7.

Blanco AR, Mule SLT, Babini G, Garbisa S, Enea V, Rusciano D. (-) Epigallocatechin-3-gallate inhibits gelatinase activity of some bacterial isolates from ocular infection, and limits their invasion through gelatine. Biochim Biophys Acta 2003;1620:273-81.

Butt MS, Ahmad RS, Sultan MT, Qayyum MM, Naz A. Green tea and anticancer perspectives: updates from last decade. Crit Rev Food Sci Nutr 2015;55:792-805.

Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985;18:35-40.

Cai Y, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Yamamoto M. Green tea epigalocatechin-3-gallate attenuates *Porphyrmonas gingivalis* – induced atherosclerosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2013;67:76-83.

Cavet ME, Harrington KL, Vollmer TR, Ward KW, Zhang JZ. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. Mol Vis 2011;17:533-42.

Chatterjee A, Saluja M, Agarwal G, Alam M. Green tea: A boon for periodontal and general health. J Indian Soc Periodontol 2012;16:161-7.

Chen MH, Tsai CF, Hsu YW, Lu FJ. Epigallocatechin gallate eye drops protect against ultraviolet B-induced corneal oxidative damage in mice. Mol Vis 2014; 20:153-62.

Cho AR, Kim JH, Lee DE, Lee JS, Jung UW, Bak EJ, Yoo YJ, Chung WG, Choi SH. The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontal Res 2013;48:781-9.

Choi JH, Rhee IK, Park KY, Park KY, Kim JK, Rhee SJ. Action of green tea catechin on bone metabolic disorder in chronic cadmium-poisoned rats. Life Scienses 2003;73:1479-89.

Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. FASEB J 2003;17:1913-5.

Chung JY, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS. Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and the aflavin-3,3'-digallate. FASEB J 2001;15:2022-4.

Coimbra M, Isacchi B, van Bloois L, Torano JS, Ket A, Wu X, Broere F, Metselaar JM, Rijcken CJ, Storm G, Bilia R, Schiffelers RM. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. Int J Pharm 2011;416:433-42.

Cook NC, Samman S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J Nutr Biochem 1996;7:66-76.

Costa CAS. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: Estrela C. Metodologia Científica. Ensino e Pesquisa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p.145-160.

Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. J Endod 1998;24:763-7.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99:628-36.

Di Stefano A, Iannitelli A, Laserra S, Sozio P. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. Expert Opin Drug Deliv 2011;8:581-603.

Dreger H, Lorenz M, Kehrer A, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Characteristics of catechinand theaflavin-mediated cardioprotection. Exp Biol Med (Maywood) 2008;233:427-33.

Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. J Dent 2012;40:485-92.

Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi P, Testolin, G. Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. J Nutr Biochem 2005;16:144–149.

Fang CY, Wu CC, Hsu HY, Chuang HY, Huang SY, Tsai CH, Chang Y, Tsao GS, Chen CL, Chen JY. EGCG inhibits proliferation, invasiveness and tumor growth by up-regulation of adhesion molecules, suppression of gelatinases activity, and induction of apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. Int J Mol Sci 2015; 16:2530-58.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod 2001;27:452-5.

Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an *in vivo* study. J Med Food 2011;14:907-11.

Ferreira DCA. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema para liberação intracanal de epigalocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2013.

Gadagi JS, Chava VK, Reddy VR. Green tea extract as a local drug therapy on periodontitis patients with diabetes mellitus: A randomized case-control study. J Indian Soc Periodontol 2013;17:198-203.

Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. *In vitro* evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. Endod Dent Traumatol 1993;9:249-53.

Ghasempour M, Moghadamnia AA, Abedian Z, Amir MP, Feizi F, Gharekhani S. *In vitro* viability of human periodontal ligament cells in green tea extract. J Conserv Dent 2015;18:47-50.

Gundimeda U, McNeill TH, Fan TK, Deng R, Rayudu D, Chen Z, Cadenas E, Gopalakrishna R. Green tea catechins potentiate the neuritogenic action of brain-derived neurotrophic factor: Role of 67-kDa laminin receptor and hydrogen peroxide. Biochem Biophys Res Commun 2014;445:218-24.

Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J Med Microbiol 2001;50:299-302.

Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod 1988; 14:125-7.

Heber D, Zhang Y, Yang J, Ma JE, Henning SM, Li Z. Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets. J Nutr 2014;144:1385-93.

Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. Am J Clin Nutr 2000;71:1003-7.

Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1970;29:620-30.

Heling I, Bialla-Shenkman S, Turetzky A, Horwitz J, Sela J. The outcome of teeth with periapical periodontitis treated with nonsurgical endodontic treatment: a computerized morphometric study. Quintessence Int 2001;32:397-400.

Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. Caries Res 2006;40:265-270.

Hodgson JM, Croft KD. Tea flavonoids and cardiovascular health. Mol Aspects Med 2010;31:495-502.

Hong JY, Yon J, Lee JS, Lee IK, Yang C, Kim MS, Choi SH, Jung UW. Effects of epigallocatechin-3-gallate on the healing of extraction sockets with a periapical lesion: A pilot study in dogs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2014; Jul 17.

Horiba N, Maekawa Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. A pilot study of Japanese green tea as a medicament: antibacterial and bactericidal effects. J Endod 1991;17:122-4.

Hrishi T, Kundapur P, Naha A, Thomas B, Kamath S, Bhat G. Effect of adjunctive use of green tea dentifrice in periodontitis patients – A Randomized Controlled Pilot Study. Int J Dent Hyg 2015 Feb 17.

Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. J Dent 2013;41:927-34.

Hwang JY, Choi SC, Park JH, Kang SW. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. J Endod 2011;37:962-7.

Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim Biophys Acta 1993;1147:132-6.

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. J Endod 2007;33:1278-82.

Itoh T, Tabuchi M, Mizuguchi N, Imano M, Tsubaki M, Nishida S, Hashimoto S, Matsuo K, Nakayama T, Ito A, Munakata H, Satou T. Neuroprotective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in rats when administered pre- or post-traumatic brain injury. J Neural Transm 2013;120:767-83.

Jenabian N, Moghadamnia AA, Karami E, Mir APB. The effect of *Camellia Sinensis* (green tea) mouthwash on plaque-induced gingivitis: a single-blinded randomized controlled clinical trial. Daru 2012;20:39.

Jeon J, Kim JH, Lee CK, Oh CH, Song HJ. The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatehin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. Ann Dermatol 2014; 26:564-9.

Jung IH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YJ, Kim SJ, Choi SH. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharidestimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. J Periodontal Implant Sci 2012;42:185-95.

Jung IH, Yun JH, Cho AR, Kim CS, Chung WG, Choi SH. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on maintaining the periodontal ligament cell viability of avulsed teeth: a preliminary study. J Periodontal Implant Sci 2011;41:10-6.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;20:340-9.

Kang HG, Jenabi JM, Liu XF, Reynolds CP, Triche TJ, Sorensen PH. Inhibition of the insulinlike growth factor I receptor by epigallocatechin gallate blocks proliferation and induces the death of Ewing tumor cells. Mol Cancer Ther 2010;9:1396-407.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A. Prediction of fracture from low bone mineral density measurements overestimates risk. Bone. 2000;26:387-91.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. J Dent Res 2010;89:468-72.

Kerekes K, Tronstad L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. J Endod 1979;5:83-90.

Khan N, Bharali DJ, Adhami VM, Siddiqui IA, Cui H, Shabana SM, Mousa SA, Mukhtar H. Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model. Carcinogenesis 2014;35:415-23.

Khan N, Mukhtar H. Tea and health: Studies in humans. Curr Pharm Des 2013;19:6141-7.

Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. Life Sci 2007;81:519-33.

Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. Nutrients 2013; 5:3779-827.

Klančnik A, Piskernik S, Bucar F, Vučković D, Možina SS, Jeršek B. Reduction of microbiological risk in minced meat by a combination of natural antimicrobials. J Sci Food Agric 2014;94:2758-65.

Koh CH, Lee HS, Chung SK. Effect of topical epigallocatechin gallate on corneal neovascularization in rabbits. Cornea 2014;33:527-32.

Kokubo Y, Iso H, Saito I, Yamagishi K, Yatsuya H, Ishihara J, Inoue M, Tsugane S. The impact of green tea and coffee consumption on the reduced risk of stroke incidence in japanese population: the japan public health center-based study cohort. Stroke 2013;44:1369-74.

Kudva P, Tabasum ST, Shekhawat NK. Effect of green tea catechin, a local drug delivery system as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis patients: A clinicomicrobiological study. J Indian Soc Periodontol 2011;15:39-45.

Kwong B, Liu H, Irvine DJ. Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy. Biomaterials 2011;32:5134-47.

Landis-Piwowar K, Chen D, Foldes R, Chan TH, Dou QP. Novel epigallocatechin gallate analogs as potential anticancer agents: a patent review (2009 - present). Expert Opin Ther Pat 2013;23:189-202.

Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. Arch Oral Biol 2015;60:393-9.

Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH, Wang CC, Lin SK. An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. J Endod 2009;35:206-11.

Lee YL, Lin SK, Hong CY, Wang JS, Yang H, Lai EH, Chen MH, Kok SH. Major histocompatibility complex class II transactivator inhibits cysteine-rich 61 expression in osteoblastic cells and its implication in the pathogenesis of periapical lesions. J Endod 2010;36:1021-5.

Lemarié F, Chang CW, Blatchford DR, Amor R, Norris G, Tetley L, McConnell G, Dufès C. Antitumor activity of the tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate encapsulated in targeted vesicles after intravenous administration. Nanomedicine (Lond) 2013;8:181-92.

Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrila LS. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. J Endod 1995;21:137-41.

Leonardo MR, da Silva LA, Assed S, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. J Endod 2000;26:391-4.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;102:680-5.

Leonardo MR, Silva LAB. Medicação tópica entre sessões, "curativo de demora" em biopulpectomia e necropulpectomias I e II. In: Leonardo MR e Leal JM. Endodontia: tratamento de canais radiculares. São Paulo: Médica Panamericana; 1998. p.501-6.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. Braz Dent J 2002;13:17-22.

Li H, Li Z, Xu YM, Wu Y, Yu KK, Zhang C, Ji YH, Ding G, Chen FX. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis, inhibits proliferation and decreases invasion of glioma cell. Neurosci Bull 2014;30:67-73.

Lima APAF, Vasconcelos FMN, Beatrice LCS. Biocompatibilidade dos materiais restauradores estéticos em pacientes infantis e adolescentes. Int J Dent 2003;2:279-285.

Lin SK, Chang HH, Chen YJ, Wang CC, Galson DL, Hong CY, Kok SH. Epigallocatechin-3-gallate diminishes CCL2 expression in human osteoblastic cells via up-regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Raf-1 interaction: a potential therapeutic benefit for arthritis. Arthritis Rheum 2008;58:3145-56.

Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. Curr Opin Drug Discov Devel 2010;13:111-23.

Liu D, Zhang X, Jiang L, Guo Y, Zheng C. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. Acta Histochem 2014;116:654-62.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion *in situ*. J Dent 2009;37:994-8.

Mankovskaia A, Lévesque CM, Prakki A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. J Appl Oral Sci 2013;21:203-7.

Maruyama T, Murata S, Nakayama K, Sano N, Ogawa K, Nowatari T, Tamura T, Nozaki R, Fukunaga K, Ohkohchi N. (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses liver metastasis of human colorectal cancer. Oncol Rep 2014;31:625-33.

Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, Irie K, Azuma T, Ekuni D, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. Arch Oral Biol 2011;56:48-53.

Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T. Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. J Endod 2007;33:1145-8.

Mufamadi MS, Pillay V, Choonara YE, Du Toit LC, Modi G, Naidoo D, Ndesendo VM. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. J Drug Deliv 2011; 2011:939851.

Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics 2011;3:793-829.

Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. Phytochemistry 2006;67:1849-55.

Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, Kozuka Y, Yoshioka H, Yoshinaga Y, Abe Y, Hara Y. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption *in vivo*. J Periodontal Res 2010;45:23-30.

Nelson Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. Int Endod J 1999;32:303-11.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. J Endod 2002;28:694-6.

Neturi RS, R S, B VS, Y SS, T CS, P SK. Effects of green tea on *Streptococcus mutans* counts- a randomised control trail. J Clin Diagn Res 2014;8:ZC128-30.

Nugala B, Namasi A, Emmadi P, Krishna PM. Role of green tea as an antioxidant in periodontal disease: The Asian paradox. J Indian Soc Periodontol 2012;16:313-6.

Oka Y, Iwai S, Amano H, Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S, Inagaki K, Oguchi K. Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. J Pharmacol Sci 2012;118:55-64.

Orstavik D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. Int Endod J 1996;29:150-5.

Pianetti S, Guo S, Kavanagh KT, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. Cancer Res 2002;62:652-5.

Poi WR, Sonoda CK, Martins CM, Melo ME, Pellizzer EP, de Mendonça MR, Panzarini SR. Storage media for avulsed teeth: a literature review. Braz Dent J 2013;24:437-45.

Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an *in vitro* study. J Endod 2010;36:83-6.

Rao SD, Pagidas K. Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. Anticancer Res 2010;30:2519-23.

Rattanasuwan K, Rassameemasmaung S, Sangalungkarn V, Komoltri C. Clinical effect of locally delivered gel containing green tea extract as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. Odontology 2014; Dec 19.

Reygaert W, Jusufi I. Green tea as an effective antimicrobial for urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. Front Microbiol 2013;4:162.

Riegsecker S, Wiczynski D, Kaplan MJ, Ahmed S. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. Life Sci 2013;93:307-12.

Roccaro AS, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in *staphylococci* by inhibiting its efflux from bacterial cells. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1968-73.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod 1994;20:127-9.

Saito K, Hayakawa T, Kuwahara NS, Kasai K. Antibacterial Activity and Bond Strength to Enamel of Catechin-Incorporated 4-META/MMA-TBB Resin as an Orthodontic Adhesive Resin. J Hard Tissue Biology 2011;20:203-210.

Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem 1989;53:2307-11.

Sanna V, Pala N, Dessì G, Manconi P, Mariani A, Dedola S, Rassu M, Crosio C, Iaccarino C, Sechi M. Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities. Int J Nanomedicine 2014;9:4935-51.

Sarin S, Marya C, Nagpal R, Oberoi SS, Rekhi A. Preliminary Clinical Evidence of the Antiplaque, Antigingivitis Efficacy of a Mouthwash Containing 2% Green Tea - A Randomised Clinical Trial. Oral Health Prev Dent 2015; Jan 20.

Scalia S, Marchetti N, Bianchi A. Comparative evaluation of different co-antioxidants on the photochemical- and functional-stability of epigallocatechin-3-gallate in topical creams exposed to simulated sunlight. Molecules 2013;18:574-87.

Schäfer E, Schlingemann R. Efficiency of rotary nickel-titanium K3 instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile. Part 2. Cleaning effectiveness and shaping ability in severely curved root canals of extracted teeth. Int Endod J 2003;36:208-17.

Schmitz W, Saito AY, Estevão D, Saridakis HO. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde 2005;26:119-130.

Schoder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migrations, proliferation, and differentiation. J Dent Res 1985;64:541-8.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J 2006;39:878-85.

Shin YS, Seo JY, Oh SH, Kim JH, Kim ST, Park YB, Moon HS. The effects of ErhBMP-2-/EGCG-coated BCP bone substitute on dehiscence around dental implants in dogs. Oral Dis 2014;20:281-7.

Shukla R, Chanda N, Zambre A, Upendran A, Katti K, Kulkarni RR, Nune SK, Casteel SW, Smith CJ, Vimal J, Boote E, Robertson JD, Kan P, Engelbrecht H, Watkinson LD, Carmack TL, Lever JR, Cutler CS, Caldwell C, Kannan R, Katti KV. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109:12426-31.

Shumi W, Hossain MA, Park DJ, Park S. Inhibitory Effects of Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Exopolysaccharide Production by *Streptococcus mutans* under Microfluidic Conditions. BioChip J 2014;8:179-186.

Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. J Endod 2000;26:751-5.

Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. J Endod 2002;28:94-8.

Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;109:779-87.

Silveira V, Pereira A, Amadei S. Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários. Rev Biociên 2004;10:209-213.

Sinha A, Nosoudi N, Vyavahare N. Elasto-regenerative properties of polyphenols. Biochem Biophys Res Commun 2014;444:205-11.

Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. J Endod 2007;33:800-5.

Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. J Endod 1999;25:332-5.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. J Endod 2002;28:181-4.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J 2001;34:1-10.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. J Endod 1990;16:498-504.

Soares IJ, Goldberg F. Endodontia: técnica e fundamentos. Porto Alegre: Artes Médicas; 2001.

Soltani R, Haghighat A, Fanaei M, Asghari G. Evaluation of the effect of green tea extract on the prevention of gingival bleeding after posterior mandibular teeth extraction: a randomized controlled trial. Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:857651.

Srividhya R, Gayathri R, Kalaiselvi P. Impact of epigallo catechin-3-gallate on acetylcholine-acetylcholine esterase cycle in aged rat brain. Neurochem Int 2012;60:517-22.

Staehle HJ, Thoma C, Muller HP. Comparative *in vitro* investigation of different methods for temporary root canal filling with aqueous suspensions of calcium hydroxide. Endod Dent Traumatol 1997;13:106-12.

Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. Sci Prog 2002;85:57-72.

Stoddard AR, Koetje LR, Mitchell AK, Schotanus MP, Ubels JL. Bioavailability of antioxidants applied to stratified human corneal epithelial cells. J Ocul Pharmacol Ther 2013;29:681-7.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006;32:93-8.

Subramanian P, Eswara U, Maheshwar Reddy KR. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: an *in vitro* study. Indian J Dent Res 2012;23:43-8.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:86-93.

Tamura M, Saito H, Kikuchi K, Ishigami T, Toyama Y, Takami M, Ochiai K. Antimicrobial activity of Gel-entrapped catechins toward oral microorganisms. Biol Pharm Bull 2011;34:638-43.

Tan BT, Messer HH. The quality of apical canal preparation using hand and rotary instruments with specific criteria for enlargement based on initial apical file size. J Endod 2002;28:658-64.

Tenore GC, Daglia M, Ciampaglia R, Novellino E. Exploring the nutraceutical potential of polyphenols from black, green and white tea infusions - an overview. Curr Pharm Biotechnol 2015;16:265-71.

Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. Nutr Rev 2000;58:1-10.

Tronstad L. Recent development in endodontic research. Scand J Dent Res 1992;100:52-9.

Tudoran O, Soritau O, Balacescu O, Balacescu L, Braicu C, Rus M, Gherman C, Virag P, Irimie F, Berindan-Neagoe I. Early transcriptional pattern of angiogenesis induced by EGCG treatment in cervical tumour cells. J Cell Mol Med 2012;16:520-30.

Valderhaug J, Jokstad A, Ambjørnsen E, Norheim PW. Assessment of the periapical and clinical status of crowned teeth over 25 years. J Dent 1997;25:97-105.

Vert M, Doi Y, Hellwich KH, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, Schué F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)\*. Pure Appl Chem 2012;84:377–410.

Vestergaard P, Hermann AP, Gram J, Jensen LB, Eiken P, Abrahamsen B, Brot C, Kolthoff N, Sørensen OH, Beck Nielsen H, Pors Nielsen S, Charles P, Mosekilde L. Evaluation of methods for prediction of bone mineral density by clinical and biochemical variables in perimenopausal women. Maturitas 2001;40:211-20.

Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Braz Dent J 2005;16:175-80.

Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, Casaroto AR, Garcia RB, de Moraes IG, Hidalgo MM. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. J Appl Oral Sci 2010;18:621-4.

Walker JM, Klakotskaia D, Ajit D, Weisman GA, Wood WG, Sun GY, Serfozo P, Simonyi A, Schachtman TR. Beneficial effects of dietary EGCG and voluntary exercise on behavior in an Alzheimer's disease mouse model. J Alzheimers Dis 2015;44:561-72.

Wang F, Chang Z, Fan Q, Wang L. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase-2. Mol Med Rep 2014;9:1085-9.

Wierzejska R. Tea and health--a review of the current state of knowledge. Przegl Epidemiol 2014;68:501-6, 595-9.

Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. Arch Oral Biol 2012;57:678-83.

Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:1229-36.

Yang CS, Wang X. Green tea and cancer prevention. Nutr Cancer 2010;62:931-7.

Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. Carcinogenesis 1998;19:611-6.

Yang ZF, Bai LP, Huang WB, Li XZ, Zhao SS, Zhong NS, Jiang ZH. Comparison of *in vitro* antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. Fitoterapia 2014;93:47-53.

Yoncheva K, Momekov G. Antiangiogenic anticancer strategy based on nanoparticulate systems. Expert Opin Drug Deliv 2011;8:1041-56.

Yoshino K, Nakamura Y, Ikeya H, Sei T, Inoue A, Sano M, Tomita I. Antimicrobial activity of tea extracts on cariogenic bacterium (*Streptococcus mutans*). J Food Hyg Soc Japan 1996;37:104-108.

Yoshino S, Mitoma T, Tsuruta K, Todo H, Sugibayashi K. Effect of emulsification on the skin permeation and UV protection of catechin. Pharm Dev Technol 2014;19:395-400.

Yun JH, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. (-)-Epigallocatechin gallate induces apoptosis, via caspase activation, in osteoclasts differentiated from RAW 264.7 cells. J Periodontal Res 2007;42:212-8.

Zhao M, Jiang J, Zheng R, Pearl H, Dickinson D, Fu B, Hsu S. A proprietary topical preparation containing EGCG-stearate and glycerin with inhibitory effects on herpes simplex virus: case study. Inflamm Allergy Drug Targets 2012;11:364-8.

Zhou J, Farah BL, Sinha RA, Wu Y, Singh BK, Bay BH, Yang CS, Yen PM. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, stimulates hepatic autophagy and lipid clearance. PLoS One 2014;9:e87161.

Pelillo M, Cuvelier ME, Biguzzi B, Gallina Toschi T, Berset C, Lercker G. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: the case of carnosic acid. J Chromatogr A. 2004 Jan 16;1023(2):225-9.

Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. Int J Paediatr Dent. 2011 Sep;21(5):353-60.

Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RA, Silva LA. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. Braz Dent J. 2011;22(3):203-11.

Silva LA, Leonardo MR, Oliveira DS, Silva RA, Queiroz AM, Hernández PG, Nelson-Filho P. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. Braz Dent J. 2010 Jan;21(1):38-45.

de Sousa DL, de Sousa RB, Pinto DN, Neto JJ, de Carvalho CB, de Almeida PC. Antibacterial effects of chemomechanical instrumentation and calcium hydroxide in primary teeth with pulp necrosis. Pediatr Dent. 2011 Jul-Aug;33(4):307-11.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Nov;102(5):680-5. Epub 2006 Sep 12.

Guo J, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Ochiai K, Qiu L, Haneji T. Calcium hydroxide suppresses Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide-induced bone destruction. J Dent Res. 2014 May;93(5):508-13. doi: 10.1177/0022034514526886. Epub 2014 Mar 6.

Adl A, Motamedifar M, Shams MS, Mirzaie A. Clinical investigation of the effect of calcium hydroxide intracanal dressing on bacterial lipopolysaccharide reduction from infected root canals. Aust Endod J. 2015 Apr;41(1):12-6. doi: 10.1111/aej.12054. Epub 2013 Dec 13.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. Int Endod J. 2003 Nov;36(11):733-9.

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Mar;95(3):348-54.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 May;99(5):628-36.

Türkün M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. Int Endod J. 1997 Sep;30(5):335-42.

Wadachi R, Araki K, Suda H. Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. J Endod. 1998 May;24(5):326-30.

Antonijević D, Ilić D, Medić V, Dodić S, Obradović-Djuriĉić K, Rakoĉević Z. Evaluation of conventional and digital radiography capacities for distinguishing dental materials on radiograms depending on the present radiopacifying agent. Vojnosanit Pregl. 2014 Nov;71(11):1006-12.

Zeng X, Tan X. Epigallocatechin-3-gallate and zinc provide anti-apoptotic protection against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 rat cardiac myoblast cells. Mol Med Rep. 2015 Aug;12(2):1850-6.

Kagaya N, Kawase M, Maeda H, Tagawa Y, Nagashima H, Ohmori H, Yagi K. Enhancing effect of zinc on hepatoprotectivity of epigallocatechin gallate in isolated rat hepatocytes. Biol Pharm Bull. 2002 Sep;25(9):1156-60.

Yang J, Yu H, Sun S, Zhang L, Das UN, Ruan H, He G, Shen S. Mechanism of free Zn(2+) enhancing inhibitory effects of EGCG on the growth of PC-3 cells: interactions with mitochondria. Biol Trace Elem Res. 2009 Dec;131(3):298-310.

Pereira LB. Avaliação do perfil de citocinas no tecido subcutâneo de camundongos na presença de cimento endodôntico [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2013.

Garcia Lda F, Huck C, Menezes de Oliveira L, de Souza PP, de Souza Costa CA. Biocompatibility of new calcium aluminate cement: tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines. J Endod. 2014 Dec;40(12):2024-9.

Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, Bonetti-Filho I, Cerri PS. Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. ISRN Dent. 2012;2012:904963.

Trichês KM, Júnior JS, Calixto JB, Machado R, Rosa TP, Silva EJ, Vansan LP. Connective tissue reaction of rats to a new zinc-oxide-eugenol endodontic sealer. Microsc Res Tech. 2013 Dec;76(12):1292-6.

Lima CC, Conde Júnior AM, Rizzo MS, Moura RD, Moura MS, Lima MD, Moura LF. Biocompatibility of root filling pastes used in primary teeth. Int Endod J. 2015 May;48(5):405-16.

Mori GG, Rodrigues Sda S, Shibayama ST, Pomini M, do Amaral CO. Biocompatibility of a calcium hydroxide-propolis experimental paste in rat subcutaneous tissue. Braz Dent J. 2014;25(2):104-8.

Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RA, Silva LA. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. Braz Dent J. 2011;22(3):203-11.

Nelson Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. Int Endod J. 1999 Aug;32(4):303-11.

Gehlen ML, Moreira H, Moreira L, Sabag FP, Repka JCD. Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans na reação inflamatória da córnea: estudo experimental em coelhos. Arq Bras Oftalmol 2004;67:219-25.

Ge R, Zhu Y, Diao Y, Tao L, Yuan W, Xiong XC. Anti-edema effect of epigallocatechin gallate on spinal cord injury in rats. Brain Res. 2013 Aug 21;1527:40-6.

Lee H, Bae JH, Lee SR. Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. J Neurosci Res. 2004 Sep 15;77(6):892-900.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2006 Abr./Jun 42(2).

Thompson WD, Harvey JA, Kazmi MA, Stout AJ. Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. J Pathol. 1991;165:311–8.

Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. Pharmacol Ther. 1991;52:407–22.

Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT. Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. JAMA. 2002 Apr 3;287(13):1706-9.

Liapakis I, Anagnostoulis S, Karayiannakis A, Korkolis D, Lambropoulou M, Matarasso A, Simopoulos C. Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats. Acta Cir. Bras. 2008 Mar./Apr. 23(2).

Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. Diabetes. 2004 Sep;53(9):2443-8.

Leonardo MR e Leonardo RT. Tratamento de canais radiculares - Avanços tecnológicos de uma endodontia minimamente invasiva e reparadora.1ª ed; 2012.

Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of Streptococcus mutans. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar;55(3):1229-36.

Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against Candida albicans. J Antimicrob Chemother. 2004 Feb;53(2):225-9.

Schimtz WO. Atividade antimicrobiana e quimioprotetora do extrato etanólico de chá verde (*Camelia Sinensis*) [dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2005.

Zhao M, Jiang J, Zheng R, Pearl H, Dickinson D, Fu B, Hsu S. A proprietary topical preparation containing EGCG-stearate and glycerin with inhibitory effects on herpes simplex virus: case study. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012 Oct;11(5):364-8.

## **A**NEXOS

## **ANEXO A**



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

# **ProductInformation**

## (-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATE

Sigma Prod. No. **E4143** Store at 2-8° C

**CAS NUMBER: 989-51-5** 

**SYNONYM:** (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxybenzoate); (-)-Epigallocatechin 3-O-

gallate1; EGCG1

#### PHYSICAL DESCRIPTION:

Appearance: powder
Molecular formula:  $C_{22}H_{18}O_{11}$ Molecular weight: 458.4
Melting point: 218°C<sup>1</sup>

E<sup>M</sup>/275 nm) = 11 500 (ethanol

 $E^{M}(275 \text{ nm}) = 11,500 \text{ (ethanol)}^{1}$ Optical rotation:  $-185^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ (ethanol)}^{1}$ 

#### STORAGE / STABILITY AS SUPPLIED:

## SOLUBILITY:

This is soluble in water at least to 5 mg/mL, giving a clear faint yellow solution. The stability of a solution of this product in water at a concentration of 0.3 mg/mL was tested. A sample left for 2.5 hours at room temperature was found to have significantly decreased in purity (from 99.6% to 81.7%, by HPLC). A sample left for 2 hours at 4°C was found to have decreased only slightly (from 99.5% to 99.3%).

ÓН

#### **GENERAL NOTES:**

Epigallocatechin gallate (EGCG) is a polyphenolic compound found in green tea leaves. Studies with EGCG indicate it has antitumor promoting activity.<sup>1,2</sup>

#### METHOD OF PREPARATION:

It is isolated by extracting the tea leaves with hot water, back-extracted with ethyl acetate. The EGCG is chromatographically isolated from the organic phase.<sup>3</sup>

F4143

## (-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATE

Sigma Prod. No. E4143

### HPLC SYSTEM:4

Column: YMC ODS-A 15 cm x 4.6 mm ID Particle size 5 µm Mobile phase:acetonitrile:ethyl acetate:0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (12:2:86)

Flow rate: 1.0 mL/min

Solvent: Product dissolved at 0.3 mg/mL in water, 20 µL injected

Detection at 280 nm

Retention time for major peak ≈12 minutes

Determination of this compound in plasma and urine by HPLC has been reported.5

#### REFERENCES:

- Merck Index, 12th ed., #3568 (1996).
- 2. Yamane, T. et al., Cancer Res., 55, 2081 (1995).
- 3. Supplier information.
- Sigma quality control.
- Lee, M.-J. et al., Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., 4, 393 (1995).

Sigma warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

## **ANEXO B**



## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Proc. nº 11.1.1405.53.8) intitulado "Caracterização das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Epigalocatequina-3-galato, Derivada do Chá Verde, para uso Terapêutico na Odontologia", de autoria de Danielly Cunha Araújo Ferreira e de Andiara De Rossi, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP de Ribeirão Preto foi aprovado em reunião da CEUA de 04/07/2012.

This is to certify that the work (Proc. nº 11.1.1405.53.8), entitled: "Caracterização das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Epigalocatequina-3-galato, Derivada do Chá Verde, para uso Terapêutico na Odontologia", by **Danielly Cunha Araújo Ferreira** and **Andiara De Rossi,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the USP of Ribeirão Preto, and was approved in the meeting, July 04, 2012.

Ribeirão Preto, 6 de julho de 2012.

Presidente da CEUA

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA Maria Angélica Depiro