

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Controle de qualidade e atividade anticolinesterásica de
fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L.

TATIANA DE OLIVEIRA LOPES

ORIENTADORA: PROFA. DRA. VALDILÉIA TEIXEIRA UCHÔA

CO-ORIENTADOR: PROFA. DRA. CHISTIANE MENDES FEITOSA

Teresina – PI

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Controle de qualidade e atividade anticolinesterásica de fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L.

TATIANA DE OLIVEIRA LOPES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Bioprospecção Fitoquímica e Síntese Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa
Co-orientador: Prof. Dr. Chistiane Mendes Feitosa

Teresina – PI

2020

L864c Lopes, Tatiana de Oliveira.

Controle de qualidade e atividade anticolinesterásica de fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L. / Tatiana de Oliveira Lopes.
- 2020.
77f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Piauí - UESPI, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

“Área de Concentração: Bioprospecção Fitoquímica e Síntese Orgânica.”

“Orientador(a): Prof. Dra. Valdiléia Teixeira Uchoa.”

“Co-orientador(a): Prof. Dr. Chistiane Mendes Feitosa.”

1. Fitoterapia. 2. Controle de qualidade. 3. Análise fitoquímica.
4. Atividade anticolinesterásica. 5. *Ginkgo biloba* L. 6. *Bacopa monnieri* L.
I. Título.

CDD: 540

Ficha elaborada pelo Serviço de Catalogação da Biblioteca Central da UESPI
Grasielly Muniz Oliveira (Bibliotecária) CRB 3/1067

Controle de qualidade e atividade anticolinesterásica de fitoterápicos à base de
Ginkgo biloba L. e *Bacopa monnieri* L.

TATIANA DE OLIVEIRA LOPES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Bioprospecção Fitoquímica e Síntese Orgânica.

Aprovado em 21 de Agosto de 2020.

Membros da Banca:



Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa
(Presidente da Banca – UESPI)



Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa
(Co-orientador - Membro Titular – UFPI)



Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho
(Membro Titular – UFPI)



Profa. Dra. Rosemarie Brandim Marques
(Membro Titular – UESPI)



Prof. Dr. Laécio Santos Cavalcante
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2020

Dedico este trabalho a minha família. O meu maior apoio nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, o autor da minha vida.
- Aos meus pais, Francisco e Teresa, pelo amor, incentivo e força no decorrer da caminhada.
- Aos meus queridos irmãos, Leidyana e Adryano, que sempre me incentivaram a buscar os meus objetivos.
- Aos meus filhos, Arthur, Bernardo e Lorenzo, amores da minha vida, que souberam compreender a minha ausência e que fazem valer a pena tudo aquilo que eu realizo;
- À professora Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa, pela ajuda e presença no decorrer deste trabalho. Foste uma excelente orientadora, compreendendo meu modo de trabalho, respeitando a minha individualidade e se fazendo presente em todos os momentos.
- À professora Dra. Chistiane Mendes Feitosa por sua compreensão e importante colaboração;
- Agradeço aos professores do Curso de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí – UESPI, pelo compromisso e todo conhecimento transmitido.
- Aos meus parceiros do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais pela presteza e companheirismo;
- Aos meus amigos dos laboratórios GERATEC e CETEM e às instituições parceiras UFPI e IFAL pela contribuição na realização do trabalho;
- À Universidade Estadual do Piauí, pela oportunidade de realização da pesquisa;
- Às agências de fomento CAPES e FAPEPI pela bolsa concedida.

*“É inútil dizer que os seres humanos deveriam
satisfazer-se com uma vida tranquila. Eles precisam de
ação. E se não a encontrarem irão fazê-la acontecer.”*

(Jane Eyre)

RESUMO

LOPES, T.O. **Controle de qualidade e atividade anticolinesterásica de fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L.** 2020. 76p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

Os fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L. são empregados para melhorar a memória e a função cognitiva. Neste estudo realizou-se controle de qualidade e atividade anticolinesterásica dos fitoterápicos *G. biloba* e *B. monnieri*. comercializados em farmácias de manipulação na cidade de Teresina - PI. As amostras foram submetidas a análise de rotulagem, pH, desintegração, peso médio, colorimetria, termogravimetria, material estranho, microbiológicas, estudo fitoquímico e atividade anticolinesterásica, seguindo as normas preconizadas pela Farmacopeia Brasileira e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Após análises, observou-se que a rotulagem, material estranho, desintegração e microbiológicas estavam de acordo com as normas da ANVISA. Os resultados dos testes colorimétricos foram uniformes nas amostras de *B. monnieri* e variáveis nas amostras de *G. biloba*. A avaliação do peso médio evidência que as amostras G1 e B3, possuem conteúdo capsular acima do descrito na rotulagem e apresentaram valores de pH divergentes. As amostras G2 e G3 possuem valores de desvio padrão relativo (DPR) acima de 4% não atendendo as normativas da ANVISA. Dentre os perfis termogravimétricos, as amostras G1 e B3 apresentaram valores com alto teor de cinzas, sugerindo adulterações. A prospecção fitoquímica mostrou os flavonoides como metabólitos secundários em comum para as amostras analisadas, corroborando com as análises de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que identificou os compostos fenólicos ácido clorogênico, rutina, miricetina e quercetina nas amostras analisadas. Os ensaios *in vitro* para a acetilcolinesterase (AChE), indicaram que as amostras G4, B2 e B5 apresentam metabólitos capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase com CI_{50} de 0,8540 mg/mL, 0,9650 mg/mL e $1,8221 \times 10^{-5}$ mg/mL, respectivamente. Dentre as amostras analisadas de *G. biloba* e *B. monnieri*, a G1 e B3 não obedeceram a alguns parâmetros de controle de qualidade, evidenciando a necessidade de uma vigilância rigorosa e aplicação de diretrizes para garantir que os medicamentos à base de plantas sejam de qualidade.

Palavras-Chave: Fitoterapia; Controle de qualidade; Análise fitoquímica; Atividade anticolinesterásica; *Ginkgo biloba* L.; *Bacopa monnieri* L.

ABSTRACT

Ginkgo biloba L. and *Bacopa monnieri* L. herbal medicines are used to improve memory and cognitive function. In this study, quality control and anticholinesterasic activity of the phytotherapeutics *G. biloba* and *B. monnieri* were performed. commercialized in handling pharmacies in the city of Teresina - PI. The samples were submitted to labeling analysis, pH, disintegration, average weight, colorimetry, thermogravimetry, foreign material, microbiological, phytochemical study and anticholinesterasic activity, following the standards recommended by the Brazilian Pharmacopoeia and National Health Surveillance Agency (ANVISA). After analysis, it was observed that the labeling, foreign material, disintegration and microbiological were in accordance with ANVISA standards. The results of colorimetric tests were uniform in the samples of *B. monnieri* and variables in the samples of *G. biloba*. The evaluation of the mean weight evidences that samples G1 and B3 have capsular content above that described on the labeling and presented divergent pH values. Samples G2 and G3 have relative standard deviation (DPR) values above 4% not meeting ANVISA regulations. Among the thermogravimetric profiles, the mass losses of sample G1 and B3 presented values with high ash content, suggesting adulterations. Phytochemical prospection showed flavonoids as secondary metabolites in common for the analyzed samples, corroborating the analysis of thin layer chromatography (CCD) and high efficiency liquid chromatography (HPLC), which identified the phenolic compounds chlorogenic acid, rutin, myricetin and quercetin in the samples analyzed. *In vitro* assays for acetylcholinesterase (AChE) indicated that samples G4, B2 and B5 have metabolites capable of inhibiting the acetylcholinesterase enzyme with CI50 of 0.8540 mg/mL, 0.9650 mg/mL and 1.8221×10^{-5} mg/mL respectively. Among the analyzed controllers of *G. biloba* and *B. monnieri*, G1 and B3 did not comply with some quality control parameters, highlighting the need for strict surveillance and application of guidelines to ensure that herbal medicines are of quality.

Keywords: Phytotherapy; Quality control; Phytochemical analysis; cholinesterasic activity; *Ginkgo biloba* L.; *Bacopa monnieri* .

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Aspectos gerais da espécie <i>G. biloba</i> . a) Árvore; b) Folhas.	21
Figura 2.2.	Aspectos gerais da espécie <i>B. Monnieri</i> . a) Trepadeira; b) Flor.	23
Figura 2.3.	Estruturas químicas dos bacosides A e B da <i>B. Monnieri</i> .	24
Figura 2.4.	Mecanismo de ação da Acetilcolinesterase.	27
Figura 3.1.	Amostras de cápsulas de <i>G. biloba</i> e <i>B. monnieri</i> .	29
Figura 4.1.	Caracteres organolépticos das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monnieri</i> .	37
Figura 4.2.	Desvio padrão relativo das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monnieri</i> .	38
Figura 4.3.	Dados referente ao peso médio das cápsulas das amostras de <i>G. biloba</i> .	39
Figura 4.4.	Dados referente ao peso médio das cápsulas das amostras de <i>B. monnieri</i> .	40
Figura 4.5.	Curva termogravimétrica das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monnieri</i> .	43
Figura 4.6.	Análise por CCD (a e b) e prospecção fitoquímica (c) das amostras de <i>G. biloba</i> .	49
Figura 4.7.	Análise por CCD (a e b) e prospecção fitoquímica (c e d) das amostras <i>B. monnieri</i> .	50
Figura 4.8.	Estrutura química dos compostos fenólicos.	52
Figura 4.9.	Cromatograma mix dos padrões 1-Ácido gálico, 2- Catecol, 3- Catequina, 4- Ácido clorogênico, 5- Ácido caféico, 6 (-) epicatequina, 7 – Siringaldeido, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11 – miricetina, 12- Quercetina e extratos etanólicos das amostras de <i>G. biloba</i> . a:G5; b:G1; c:G2; d:G3; e:G4; à 290 nm.	53
Figura 4.10.	Cromatograma mix dos padrões 1-Ácido gálico, 2- Catecol, 3- Catequina, 4- Ácido clorogênico, 5- Ácido caféico, 6 (-) epicatequina, 7 – Siringaldeido, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11 – miricetina, 12- Quercetina e extratos etanólicos das amostras de <i>B. monnieri</i> . a:B5; b:B1; c:B2; d:B3; e:B4; à 290 nm.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Composição das amostras, seus códigos e forma farmacêutica.	30
Tabela 4.1	Análise de rótulo das amostras manipuladas de <i>G. biloba</i> e quatro amostras de <i>B.monniери</i> .	35
Tabela 4.2	Peso médio, pH e desintegração de cápsulas de <i>G. biloba</i> e <i>B. monniери</i> .	42
Tabela 4.3	Resultados da curva termogravimétrica das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monniери</i> na razão de aquecimento de 10°C/min, atmosfera de nitrogênio.	44
Tabela 4.4	Valores dos componentes colorimétricos L*, a* e b* das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monniери</i> .	46
Tabela 4.5	Prospecção fitoquímica preliminar das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monniери</i> .	48
Tabela 4.6	Compostos identificados por CLAE.	51
Tabela 4.7	Crescimento médio de microrganismos das amostras de <i>G. biloba</i> e <i>B. monniери</i> .	55
Tabela 4.8	Inibição e classificação da intensidade de inibição das amostras <i>G. biloba</i> e <i>B. monniери</i> na concentração de 1mg/mL.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh, Acetilcolina

AChE, Acetilcolinesterase

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD, Cromatografia de camada delgada

CI₅₀, Concentração inibitória em 50%

CLAE, Cromatografia líquida de alta eficiência

ChAT, Colina acetiltransferase

DA, Doença de Alzheimer

DPR, Desvio padrão relativo

RDC, Resolução de diretoria colegiada

R_f, Fator de retenção

SNC, Sistema nervoso central

SNP, Sistema nervoso periférico

TGA, Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	18
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	18
CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Plantas medicinais	19
2.2 <i>Ginkgo biloba</i> L.....	21
2.3 <i>Bacopa monnieri</i> L	22
2.4 Controle de qualidade de fitoterápicos	25
2.5 Atividade acetilcolinesterásica	26
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL	29
3.1 Seleção das amostras	29
3.2 Análise de rotulagem	30
3.3 Análise físico-química.....	30
3.4 Análise térmica por termogravimetria	31
3.5 Análise colorimétrica.....	32
3.6 Prospecção fitoquímica	32
3.7 Análise fitoquímica por CLAE.....	32
3.8 Análise microbiológica.....	33
3.9 Ensaio enzimático de acetilcolinesterase.....	34
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Análise de rotulagem.....	35
4.2 Identificação de material estranho	36
4.3 Determinação do peso médio, desvio padrão relativo e variância	37
4.4 Análise de pH	41
4.5 Análise de desintegração.	41
4.6 Análise térmica por termogravimetria	42
4.7 Análise colorimétrica	45
4.8 Análise fitoquímica preliminar e Cromatografia de camada delgada	47
4.9 Cromatografia líquida de alta eficiência	50

4.10 Análise microbiológica	55
4.11 Atividade anticolinesterásica	56
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A fitoterapia é um recurso de prevenção e tratamento de doenças através das plantas medicinais, a forma mais antiga e fundamental de medicina no mundo. Podendo ser utilizada por qualquer indivíduo, embora traga, paradoxalmente, reações adversas, pelo uso inadequado de algumas plantas, que podem levar o indivíduo à morte [1]. A ANVISA, define fitoterápico como o medicamento produzido exclusivamente com derivados de drogas vegetais, sem que haja em sua composição a adição de substâncias isoladas. Além disso, os medicamentos fitoterápicos são caracterizados quanto à eficácia de uso, riscos advindos do consumo e apresentam reprodutibilidade e constância de sua qualidade [2,3].

Dentre as plantas medicinais mais consumidas no mundo, encontra-se a *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae). Amplamente disponível na China, possui várias aplicações devido às suas propriedades neuroprotetoras, distúrbios cardiológicos, cerebrais, vasculares e neurológicos, como a depressão, Doença de Alzheimer (DA) e derrame isquêmico [4,5,6,7,8,9].

A *G. biloba* tem sido empregado como produto fitoterápico no tratamento de pacientes com DA por ser considerado um forte inibidor da AChE [10]. Alguns estudos indicam que foram isolados cerca de 40 compostos de metabolismo secundário das folhas, sendo os flavonoides e terpenoides os de maior importância por possuírem atividades biológicas [11]. No grupo dos flavonoides, destacam-se os mono-, di- e triglicosídeos, nomeadamente o canferol e a quercetina. Em menor quantidade estão presentes derivados glicosídeos tais como a isoramnetina, miricetina e 3'-metil-mirticetina, bem como biflavonoides não-glicosídeos, de entre os quais catequinas e proantocianidinas. Para além disto, este material vegetal é também constituído por lactonas terpênicas, particularmente os ginkgólidos A, B, C, J e M e bilobalido [12].

O extrato padronizado de *G. biloba* EGb761, segundo a RDC N° 89 [2], deve conter no mínimo 24,0 % de ginkgoflavonoides e 6% de terpenoides. A padronização refere-se ao uso de pó das folhas desta planta não ser recomendado por apresentar ácido ginkgólico, substância alergênica.

A *Bacopa monnieri* L. (Scrophulariaceae), também conhecida como Brahmi, é uma planta yurvédica (medicina tradicional indiana), conhecida como “impulsionadora da memória” [13,14], utilizada há milhares de anos [15]. Esta espécie apresenta atividade contra o mal de Parkinson, Alzheimer, epilepsia, déficit comportamental, stress e tem efeito antioxidante [16,17,18,19]. Os compostos responsáveis pelos efeitos farmacológicos desta planta incluem alcaloides, saponinas e esteróis [20]. As saponinas triterpenoides e os bacosides A e B são os constituintes responsáveis não só pela capacidade da *B. monnieri* em aumentar a transmissão de impulsos nervosos, como também são responsáveis pela competência de reparação neuronal, aumentando a atividade da quinase, a neurogênese e a restauração da atividade sináptica [20].

Com o crescimento da produção de fitoterápicos, aumenta também a dificuldade em se fazer o controle de qualidade desses produtos. Desta maneira, os ensaios de controle de qualidade são importantes a fim de comprovar que os medicamentos manipulados possuem as características de um produto seguro, ou seja, foi preparado na dose estabelecida, com uniformidade de conteúdo, estabilidade e com as características organolépticas corretas [25]. O controle de qualidade se mostra como uma ferramenta indispensável para garantir a qualidade de medicamentos manipulados, assegurando a obtenção de um produto final seguro e eficaz.

As plantas medicianis *G.biloba* e *B.monnieri* são referenciados como inibidores da enzima AchE. A acetilcolina (ACh), constitui um neurotransmissor essencial para uma função cognitiva normal, ao inibir a AchE é possível aumentar a atividade colinérgica e aliviar os sintomas cognitivos consequentes da DA [21]. Na DA são observados déficits cognitivos e funcionais, é uma doença neurodegenerativa multifatorial, atingindo primordialmente a população idosa com mais de 65 anos de idade [22]. Pacientes com DA, apresentam melhora dos sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais relacionados às demências hipocolinérgicas, quando tratados com inibidores da AChE [23]. Esses inibidores aumentam os níveis de acetilcolina presentes nas sinapses entre neurônios colinérgicos [24]. A utilização de medicamentos fitoterápicos para tratar problemas cognitivos sugere a identificação da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Investigar o controle de qualidade, o perfil fitoquímico e a atividade anticolinesterásica dos fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L. comercializados em farmácias de manipulação na cidade de Teresina - PI.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar as informações técnico-científicas nos rótulos das amostras de fitoterápicos;
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas dos fitoterápicos;
- Caracterizar a composição fitoquímica das amostras de fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. e *Bacopa monnieri* L por Prospecção Fitoquímica Preliminar, CCD e CLAE;
- Verificar a atividade anticolinesterásica *in vitro* desses fitoterápicos.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Plantas medicinais

Planta medicinal segundo a ANVISA são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade [26]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta medicinal. O uso dessas ervas é feito na maioria das vezes por adultos e idosos que buscam complementar o tratamento de uma doença crônica [27,28].

Historicamente é constatado que a busca por tratamentos através das espécies vegetais está relacionada à percepção das limitações da medicina convencional, devido aos altos custos dos medicamentos industrializados e desenvolvimento de novos agravos à saúde para os quais ainda não há tratamento adequado, aumento de doenças iatrogênicas e crônicas, enfraquecimento da relação médico-paciente e busca por atenção integral à saúde, além da questão financeira e de inclusão social relacionadas a essa terapia [29,30,31].

Nesse segmento, o uso de plantas medicinais e seus derivados como alternativas aos medicamentos da medicina convencional no tratamento de diversas patologias, trouxe uma mudança ao cenário econômico atual de fitoterápicos, demonstrando um crescimento marcante do mercado de plantas medicinais no Brasil, sendo motivado por diversos fatores, dentre os quais, o aumento de consumo de produtos naturais, acessibilidade para os segmentos de baixa renda, eficácia no tratamento de diversas patologias, constituindo importante componente do sistema de prestação de cuidados de saúde [32,33,34].

A complexidade da constituição química das espécies vegetais, assim como podem desencadear efeitos terapêuticos, contribuindo efetivamente no arsenal terapêutico, podem também desencadear respostas prejudiciais, como sintomas agudos em curto prazo de efeitos tóxicos, como distúrbios gastrointestinais, efeitos dermatológicos, ou desfechos adversos em longo prazo, como câncer, danos no fígado e nos rins, disfunções reprodutivas, defeitos congênitos, lesão ao sistema nervoso central e várias outras morbidades podem estar

associadas ao uso de plantas; comprovando, assim, que a utilização de espécies vegetais não deve ser considerada livre de riscos [35,31].

No Brasil, a legislação de fitoterápicos industrializados, diferencia dois tipos de fitoterápicos, o medicamento fitoterápico e os produtos tradicionais fitoterápicos que são os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização; não podendo ser empregados em doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves; além de não poder conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido e não devem ser administrados pelas vias injetável e oftálmica [36]. É constatado que a fitoterapia está inserida na sociedade contemporânea, como forma alternativa e/ou complementar na terapêutica, devido a inserção de políticas que regulamentam e incentivam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, além do incentivo promovido pelo modismo de consumo de produtos naturais [37,38,39,34].

O medicamento manipulado apresenta várias vantagens em relação ao medicamento industrializado, dentre elas: produção de medicamentos que deixaram de ser produzidos pela indústria farmacêutica, por razões econômicas; associação de fármacos, facilitando o tratamento de diversas enfermidades; individualização da prescrição; preparação de medicamentos sem conservantes, corantes, aromatizantes ou perfumes, beneficiando clientes alérgicos e o exercício na farmácia com manipulação da atenção farmacêutica, que é a interação direta do farmacêutico com o usuário, visando uma farmacoterapia racional e a obtenção de resultados satisfatórios, voltados para a melhoria da qualidade de vida [39].

A avaliação da eficácia e segurança das plantas de uso medicinal caracteriza os estudos de validação; ou seja, a validação consiste em confirmar cientificamente as propriedades terapêuticas das plantas medicinais para permitir seu uso como medicamento em seres vivos [40]. Assim, os estudos científicos possibilitam transformar as plantas medicinais em produtos fitoterápicos; buscando a confirmação da eficácia farmacológica e da ausência de toxicidade da planta; fundamentados nos estudos botânicos, químicos e farmacológicos (pré-clínicos e clínicos) [41,31].

1.2 *Ginkgo biloba* L.

A planta medicinal *G. biloba* é uma das espécies mais antigas da Terra, sendo chamado de “fóssil vivo”, é o único representante da família Ginkgoaceae [42]. Esta espécie florescia em grandes florestas há mais de 150 milhões de anos tornando-se quase extinta na última era do gelo. Atualmente encontra-se preservada pelo cultivo humano devido ao seu valor ornamental e comercial [42]. Existente em praticamente todos os continentes e na cultura medicinal brasileira, é umas das plantas medicinais mais conhecida na composição de fitoterápicos e amplamente utilizada na atualidade. É frequentemente encontrada na forma de composição de fitoterápicos industrializados, na forma de comprimidos e cápsulas do extrato seco, além de serem comercializados em feiras livres em todo território nacional [43].

G. biloba é uma árvore Ginkgophyta alta e robusta, que pode chegar a 30 metros de altura, nativa da região da China, Coreia e Japão, caracterizada por folhas no formato de leque, com ruptura vertical divididas em dois lóbulos e muito resistentes que caem durante o inverno, conforme apresentado na Figura 2.1. Possui um ciclo de vida de mais de 1.000 anos [44].

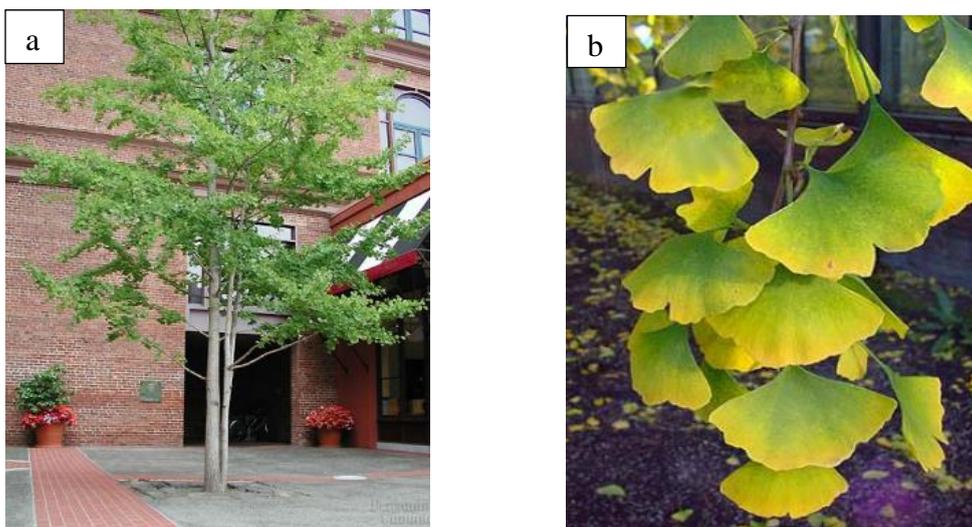


Figura 2.1. Aspectos gerais da espécie *G.biloba*. a) Árvore ; b) Folhas [45].

A espécie possui efeitos preventivos sobre as patologias relacionadas à circulação sanguínea, sendo ação eficaz na proteção do organismo contra os radicais livres. O extrato de *G. biloba*, através da combinação de seus princípios ativos, garante uma vasodilatação com concomitante redução na viscosidade sanguínea promovendo um aumento no suprimento de

sangue no cérebro, a partir da ação sobre os radicais livres que resulta em uma maior oxigenação dos tecidos nervosos [46]. O Extrato de *G. biloba*, é atualmente um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo, usado principalmente para quadros de demência, melhoria da circulação sanguínea periférica e doença de Alzheimer [47,43].

EGB 761 é um extrato seco especial de folhas de Ginkgo, feito com acetona 60% (w/w) como solvente de extração, desenvolvido por Schwabe (Alemanha) e Ipsen (França) há mais de 40 anos. Em relação à composição original das folhas, os componentes farmacologicamente ativos (flavonoides, lactonas terpênicas) são enriquecidos, e possíveis componentes tóxicos (ácidos ginkgólico) são rebaixados [48]. O extrato padronizado final é ajustado para 22,0-27,0% ginkgoflavonoides e 5,0-7,0% terpenos. As lactonas terpênicas compreendem trilactonas diterpênicas: ginkgolides A, B, C, J e M, e trilactonas sesquiterpenos bilobalide, com teor de ácido ginkgólico abaixo de 5ppm. A maioria dos estudos clínicos e a maioria dos estudos pré-clínicos publicados para *G. biloba* utilizaram este extrato padronizado [48].

Os efeitos farmacológicos do extrato da espécie e seus componentes são amplamente descritos, dados estes que comprovam evidências e apoiam o uso clínico moderno do extrato padronizado de suas folhas [49]. Estudos *in vitro* demonstraram que tanto os constituintes flavonoides como os terpenoides, presentes no extrato de *G. biloba*, têm a capacidade de eliminar radicais livres e de inibir a formação de espécies reativas de oxigênio [50]. Esta ação antioxidante, aliada à capacidade dos flavonoides em inibir a fosfodiesterase 3',5'-GMP, potencializa os efeitos dos fatores relaxantes derivados do endotélio e permite prolongar a meia-vida deste através da eliminação de aniões superóxido promovendo, desta forma, uma ação de vasodilatação que favorece o aumento do fluxo sanguíneo [50].

1.3 *Bacopa monnieri* L.

B. monnieri, é uma planta de trepadeira de altura de 2-3 pés com folhas ramificadas e flores levemente roxas, nativa das zonas úmidas e áreas pantanosas do sul e leste da Índia, conhecida sob o nome de Brahmi. Pertencente à família Scrophulariaceae, é tradicionalmente usada na medicina ayurvédica como tônico neural, sedativo, antiepilético, memória e melhorador de aprendizagem [51]. A planta é apresentada na Figura 2.2.

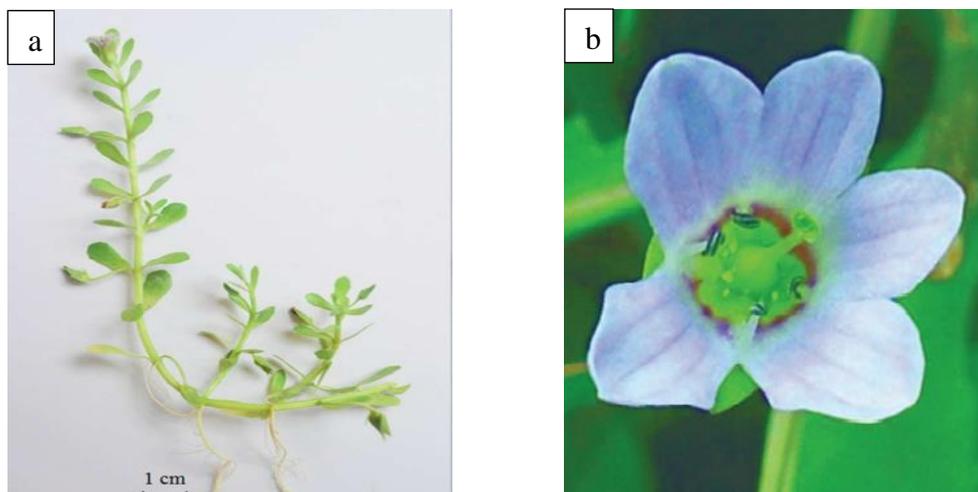


Figura 2.2. Aspectos gerais da espécie *B. Monnieri*. a) Trepadeira [52]; b) Flor [53].

Vários estudos pré-clínicos mostraram inúmeros efeitos farmacológicos desta planta, como a melhora da memória na doença de Alzheimer e esquizofrenia, potenciais ações anti-estresse, anticonvulsivantes e anti-Parkinson e testes clínicos recentes confirmaram a eficácia de *B. monnieri* no aprendizado e desempenho cognitivo [54]. Além disso, demonstraram os efeitos antidepressivos de extratos padronizados *B. monnieri* em paradigmas comumente usados para avaliar a depressão [55].

A análise fitoquímica do extrato da *B. Monnieri* revelou a presença de vários componentes bioativos no extrato [56]. Os compostos bioativos são identificados em saponinas triterpenoides, alcaloides, glicosídeos e álcoois, além de alcaloides ("Brahmine", Nicotina e Herpestine). As saponinas triterpenoides do tipo dammarane como Bacoside A [3-(α -L arabinopyronsy)-O- β -D-glucopyronaside, 20-dihydroxy-16-keto-dammar-24-ene] é considerado como um dos principais componentes bioativos da *B. monnieri*. [57]." Bacoside A" e "Bacoside B" são os principais componentes responsáveis pela eficiência neuroprotetora da *B. monnieri* (Figura 2.3).

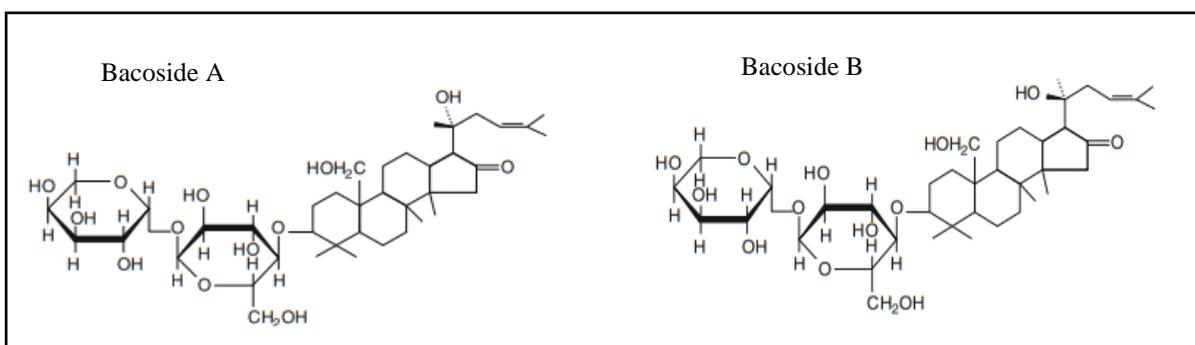


Figura 2.3. Estruturas químicas dos bacosides A e B da *B. monnieri*, [57].

Anteriormente, foi documentado que o bacoside A coexiste com o bacoside B e diferem apenas na rotação óptica [58,59,60,61]. Mais tarde, as estruturas de bacoside A e bacoside B foram estabelecidas como mistura de quatro saponinas triglicosídicas e quatro saponinas diglicosídicas [62] respectivamente. A composição química do bacoside A foi caracterizado das bacoside A3, bacopaside II, bacopaside X e bacopasaponina C, enquanto o bacoside B foi caracterizado como mistura de bacopaside N1, bacopaside N2, bacopaside IV e bacopaside V respectivamente [62].

Os bacosides atuam no organismo por intermédio de vários mecanismos, nomeadamente através do aumento dos níveis da glutathione peroxidase, promoção da vasodilatação e da regulação de processos de fosforilação ou desfosforilação da membrana, o que origina um aumento de proteínas e de RNA em certas regiões do cérebro, como no hipocampo. No entanto, sabe-se que o extrato de *B. monnieri* pode atuar não apenas revertendo os deficits colinérgicos no córtex frontal e no hipocampo, mas também inibindo a neurodegeneração colinérgica, diminuindo os níveis de norepinefrina e aumentando os níveis de 5-hidroxitriptamina no hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral [63].

Pesquisas *in vitro* demonstraram que extratos de *B. monnieri* promovem um efeito protetor contra danos no DNA em astrócitos e em fibroblastos humanos, devido às suas propriedades antioxidantes, por inibição da atividade da lipoxigenase e eliminação de radicais livres [64]. Resultados indicaram uma melhoria significativa no processo de aprendizagem, na consolidação da memória e na velocidade de processamento da informação no grupo de tratamento, em comparação com o placebo, demonstrando que as propriedades antioxidantes da *B. monnieri* protegem as células neuronais do córtex pré-frontal, do hipocampo e do corpo estriado contra a citotoxicidade e, também, dos seus benefícios sobre o sistema colinérgico [64]. Deste modo, o extrato de *B. monnieri* pode constituir uma fonte promissora de novas

terapias para o tratamento de muitos distúrbios do SNC incluindo doenças neurodegenerativas e distúrbios psíquicos, como depressão, ansiedade e esquizofrenia, uma vez que limita a neuroinflamação no SNC [65].

1.4 Controle de qualidade de fitoterápicos

Devido a expansão da Fitoterapia e, conseqüentemente, aumento do comércio de plantas para fins medicinais, a qualidade desses produtos deveriam ser preocupação constante por parte de órgãos regulatórios, uma vez que aspectos relevantes e básicos, como a correta identificação das espécies, a disponibilidade de descrições morfoanatômicas e conhecimento de marcadores de constituintes químicos ainda são barreiras no controle de adulterações de diversas drogas vegetais, comprometendo a qualidade [66].

Na perspectiva de obtenção de material vegetal de qualidade para uso medicinal devem ser atendidas as boas práticas em todas as etapas do processo de produção, desde a obtenção de material propagativo de qualidade, a correta identificação da planta pelo coletor, colheita do órgão de interesse, sem indícios de pragas e doenças ou outros contaminantes, colheita no estágio de desenvolvimento com maior teor de princípio ativo, no período do dia mais indicado, até as etapas de pós-colheita, como seleção e limpeza, secagem, estabilização, embalagem e armazenamento. Cada etapa da produção, desde o estabelecimento do cultivo até a extração da matéria-prima, tem impacto na qualidade e quantidade dos compostos ativos presentes nas plantas, logo na segurança e eficácia desejada [67, 68].

Padrão é uma norma determinada e aprovada consensualmente pela maioria, ou por uma autoridade, que é usada como base para estabelecer uma comparação por meio de uma identidade, pré-estabelecida, que condiciona a produção e comercialização [69]. No Brasil, quem delimita essas diretrizes é a ANVISA por meio de resoluções e atos normativos; o principal compêndio oficial para avaliação da qualidade de produção de medicamentos fitoterápicos é a Farmacopeia Brasileira, com monografias de algumas espécies vegetais e técnicas de execução [70].

A adulteração de plantas para uso medicinal representa sério problema pela perda da eficácia; podendo, ainda, ocasionar a perda de segurança, considerada ainda mais grave, pois pode levar a intoxicações severas ou até a morte, em função da substituição da espécie medicinal por outro material tóxico [69]. O controle de qualidade fundamentado na pureza do material vegetal se relaciona com a pesquisa de elementos estranhos, sejam orgânicos ou

inorgânicos, teor de umidade, contaminação microbiológica e parasitária, resíduos de pesticidas, de metais pesados, entre outros [70]. Entre as causas de má qualidade da matéria-prima vegetal merece destaque a contaminação biológica (fungos, bactérias), química (metais pesados, agrotóxicos, pesticidas, produtos radioativos) e física (solo, partículas estranhas), associada à falta de práticas agrícolas seguras, ao processo de secagem longo e descontínuo, transporte e embalagens inadequadas [67, 71,72].

Os ensaios de qualidade se baseiam na tríade autenticidade, pureza e integridade, sendo este último caracterizado pela investigação de marcadores ativos e/ou analíticos característicos do produto vegetal estudado, fundamentado em ensaios quali/quantitativos; empregando ensaios de triagem fitoquímica ou screening fitoquímico devido a rapidez e baixo custo, onde são sinalizados metabólitos secundários presentes devido reações de precipitação com colorações, manchas e/ou formação de espumas; e ainda por doseamento desses constituintes químicos, conforme o tipo de substância, a exemplo do uso de técnicas cromatográficas [73,74].

1.5 Atividade acetilcolinesterásica

Os neurônios colinérgicos estão relacionados com importantes funções como o alerta, o controle motor, o aprendizado e a memória, e todas essas ações exercidas pela ACh estão prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor [75]. A síntese da ACh é processada no neurônio a partir da acetilcoenzima A e da colina, catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). A transmissão sináptica ocorre quando a ACh é liberada das vesículas na fenda e se liga a receptores nicotínicos e muscarínicos. Em seguida, a ACh disponível é hidrolizada pela AChE produzindo colina e acetato (Figura 2.4) que serão reaproveitados para a síntese de ACh [76].

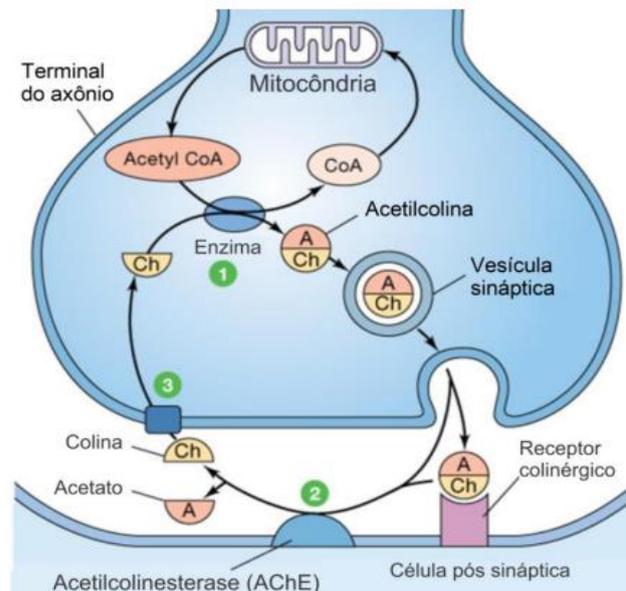


Figura 2.4. Mecanismo de ação da Acetilcolinesterase. 1- A ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A, catalisada pela ChAT. 2 - Na fenda sináptica pode se ligar a receptores colinérgicos e é rapidamente metabolizada pela enzima AChE, gerando colina e acetato. 3 - Colina é transportada de volta para o neurônio pré-sináptico e utilizada para sintetizar mais ACh, [76].

A AChE é uma enzima cuja ação é crucial na propagação do impulso nervoso, inativa a ação do neurotransmissor acetilcolina [77]. Evidências demonstram que doenças neurodegenerativas como o Alzheimer se relacionam com a degeneração do sistema colinérgico, devido principalmente a diminuição dos níveis plasmáticos de acetilcolina [75]. A ACh desempenha o papel de mediador químico de sinapses do SNC e periférico (SNP) envolvido em aspectos ligados ao comportamento, atenção, aprendizado e memória [78]. Quando o impulso nervoso chega ao axônio terminal, a ACh sofre exocitose, sendo liberada na região sináptica, onde é atraída e interage com os receptores colinérgicos do próximo neurônio [79,80].

A AChE é uma enzima pertencente à família das colinesterases e é alvo para o desenvolvimento de novas drogas, dado o papel importante que desenvolve no funcionamento das sinapses colinérgicas presentes no SNC e SNP [79,81]. No SNP, a AChE é responsável pelo controle nos impulsos nervosos, dos batimentos cardíacos, pela contração de músculos lisos, dilatação de vasos sanguíneos e no SNC modula o controle motor, a memória e cognição [82]. Os inibidores da AChE impedem a enzima colinesterase de degradar a ACh, aumentando tanto o nível quanto a duração da ação do neurotransmissor e podem ser divididos em dois grupos: irreversíveis e reversíveis [83].

A inibição da AChE tem sido amplamente estudada como biomarcador de neurotoxicidade, visto que, inibidores reversíveis possuem aplicações terapêuticas, enquanto os irreversíveis estão associados a efeitos tóxicos no organismo [83].

A interação da ACh com os receptores leva a continuidade da transmissão dos impulsos nervosos, porém o excesso de transmissão nervosa pode levar a problemas de funcionamento do corpo [79]. Com a inibição da enzima AChE, o neurotransmissor ACh não pode ser hidrolisado resultando em uma quantidade anormal que leva a possíveis efeitos tóxicos no organismo [84]. A AChE tem uma atividade catalítica muito alta, isso porque cada molécula da enzima é capaz de degradar aproximadamente 25.000 moléculas do neurotransmissor ACh por segundo em colina e ácido acético [85]. A atividade normal da AChE no cérebro é imprescindível para o bom funcionamento do órgão, visto que as alterações na sua atividade geralmente estão acompanhadas de sinais de toxicidade neurocomportamental [80].

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1.6 Seleção das amostras

As amostras de fitoterápicos *G. biloba* (120 mg) e *B. monnieri* (225 mg) foram adquiridas em quatro farmácias magistrais localizadas na cidade de Teresina-PI. As farmácias de manipulação escolhidas foram aquelas que disponibilizavam os dois fitoterápicos à base de *G. biloba* e *B. monnieri*. Cada amostra adquirida possuía 60 cápsulas, totalizando quatro amostras de *G. biloba* (G1, G2, G3, G4) e quatro amostras *B. monnieri* (B1, B2, B3, B4), representadas nas Figuras 3.1a, b. As amostras G5 e B5 tratavam-se de folhas e partes aéreas secas das respectivas plantas medicinais e adquiridas em loja de produtos naturais na cidade de Teresina-PI, conforme a Tabela 3.1.

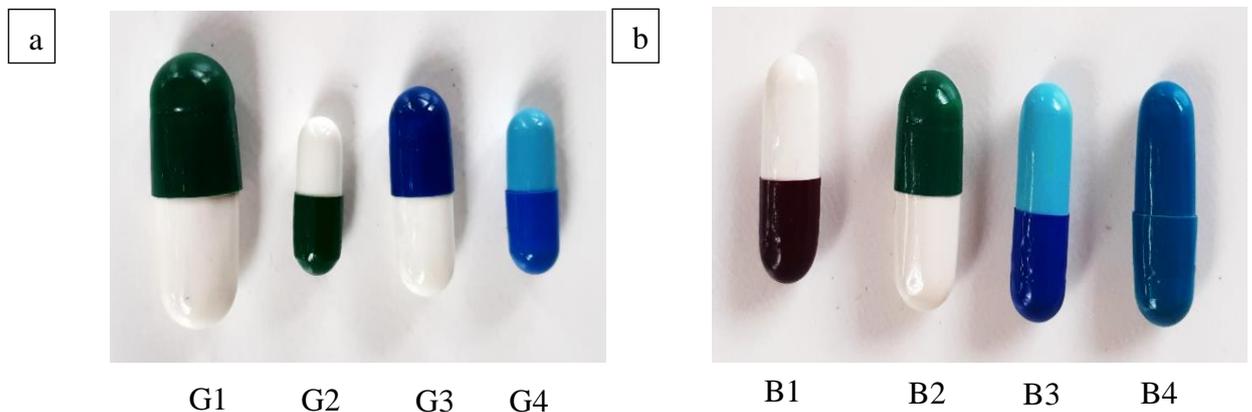


Figura 3.1. Amostras de cápsulas de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Tabela 3.1. Composição das amostras, seus códigos e forma farmacêutica.

Código	Forma farmacêutica	Composição
G1	Cápsula	Extrato seco
G2	Cápsula	Extrato seco
G3	Cápsula	Extrato seco
G4	Cápsula	Extrato seco
G5	-	Folhas secas
B1	Cápsula	Extrato seco
B2	Cápsula	Extrato seco
B3	Cápsula	Extrato seco
B4	Cápsula	Extrato seco
B5	-	Partes aéreas secas

3.2 Análise de rotulagem

A análise de rótulo das amostras foi realizada através da comparação das informações contidas nos rótulos das amostras com as preconizadas pela RDC N° 67 [72].

3.3 Análise físico-química

As amostras foram submetidas às análises de material estranho, determinação do pH, determinação do tempo de desintegração e peso médio, de acordo com os métodos gerais da Farmacopeia Brasileira [86].

A análise de material estranho é abordada sob o item “descrição de substância”. Constitui em verificar se as características da substância correspondem às descritas nos compêndios oficiais. Para realização deste ensaio, cerca de 50 g de cada amostra, foram dispostas sobre papel em uma superfície plana. O material estranho encontrado nas amostras foi separado manualmente com auxílio de uma pinça, inicialmente a olho nu e em seguida com auxílio de uma lente de aumento. Pesou-se a quantidade de material estranho separado e foi realizado o cálculo da porcentagem de material estranho com base no peso inicial da amostra [86].

Com o auxílio de balança analítica (Quimis®), 20 cápsulas gelatinosas duras de cada amostra de *B. monnieri* e *G. biloba* foram pesadas individualmente. Com base nos resultados, o peso médio, desvio padrão relativo (DPR) e o coeficiente de variação foram calculados. O peso médio foi determinado pelas diferenças de massas entre as cápsulas cheias e receptáculos [87,88].

Na desintegração de cápsulas, foi utilizado um desintegrador, consistindo de sistema de cestas e tubos, de um recipiente apropriado para o líquido de imersão, de termostato para manter o líquido a temperatura de 37 ± 1 °C e de mecanismo para movimentar verticalmente a cesta e os tubos no líquido de imersão. Foram utilizadas seis cápsulas de cada lote no teste, em cada um dos seis tubos da cesta o aparelho foi acionado, utilizando água mantida a 37 ± 1 °C como líquido de imersão. Ao final do intervalo de tempo especificado (45 min), o movimento da cesta foi cessado e o material em cada um dos tubos foi observado. [89,87,90].

Na determinação do pH uma solução aquosa das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, em triplicata, foi preparada a partir de 1g em 10 mL de água destilada, aquecida até a ebulição em chapa elétrica, os extratos obtidos foram filtrados, sendo efetuada a leitura em um pHmetro Quimis®, previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram calculados através da média aritmética das leituras com desvio padrão [86].

3.4 Análise térmica por termogravimetria (TGA)

As curvas termogravimétricas dinâmicas das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, foram obtidas em um aparelho termogravimétrico modelo TGA-50 da Shimadzu, com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25°C até 700°C . As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A massa das amostras de 5 mg ($\pm 0,05$) foram acondicionadas em cadinho de platina. As curvas foram analisadas através do software TA 50 da Shimadzu, para caracterizar as etapas de perda de massa [1]. O teor de umidade foi identificado a partir da primeira etapa de perda de massa entre 25 e 200°C . Os teores de cinzas foram obtidos diretamente da porcentagem do produto de decomposição térmica na temperatura de 700°C .

3.5 Análise colorimétrica

A análise colorimétrica foi realizada com auxílio de um colorímetro digital portátil com calibre de 8 mm (modelo FRU®, WR-10QC) no observador padrão CIE 10°, faixa de medição de luminosidade (L) de 0 a 100 e pela fórmula de diferença de cor: $\Delta E^* a^* b$ no espaço de cores CIELAB definido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) em 1976 [91].

Na leitura colorimétrica, os valores do componente acromático L^* é a luminosidade, que pode variar entre (de 0 = preto a 100 = branco), a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade. A coordenada a^* colorimétrica corresponde a (-a = cor verde) e (a + = cor vermelha) nos valores no eixo x, b^* a coordenada colorimétrica está relacionada a (-b = cor azul) e (b + = cor amarela) nos valores no eixo [92,93].

3.6 Prospecção fitoquímica

Para a caracterização fitoquímica das amostras foram realizados testes clássicos de identificação para os principais grupos de princípios ativos [94]: 1) flavonoides (reação de Shinoda, reação com cloreto férrico e reação com cloreto de alumínio); 2) saponinas e índice de espuma; 3) taninos (reação com cloreto férrico e acetato de chumbo); 4) alcaloides (solúveis em meio ácido e meio básico: reações de Dragendorff, Bertrand, Valser-Mayer e Bouchardat).

Para a análise de cromatografia em camada delgada (CCD), os extratos etanólicos foram obtidos usando-se 500 mg das amostras com 10 mL de etanol. As placas cromatográficas foram preparadas utilizando camadas de 0,25 mm de sílica gel. Os extratos e os padrões de epi-catequina, rutina e quercetina, lupeol e sitosterol foram aplicados manualmente usando tubo capilar nas extremidades da placa e, em seguida, depositados em recipientes ambientados, contendo os seguintes sistemas de solventes: hexano/acetato de etila (8:2), clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (95:5:0,5) e clorofórmio/metanol/água (65:30:5) A visualização das manchas foi realizada por pulverização com sulfato de cérico [95].

3.7 Análise fitoquímica por CLAE

O perfil fitoquímico das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* foram investigados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo analítico, marca Shimadzu modelo LC-20 AT. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis SPD-20 A, forno CTO-20A, auto injetor SIL-20A HT, desgaseificador DGU-20A 5R, coluna de fase reversa (C18 Shim-pack VP-ODS, 4.6 mm x 150 mm, 4.6 µm).

Os extratos etanólicos das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* e as soluções padrões de ácido gálico, catecol, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, (-) epicatequina, seringaldeído, ácido cumárico, cumarina, rutina, miricetina e quercetina foram filtrados em cartucho de extração em fase sólida chromabond® C18-ec da Macherey-nagel e disco de filtro de 0,45 µm. As amostras foram filtradas em membrana filtrante Chromafil® Xtra PTFE-20/25 de 25 mm e poro de 0,20 µm.

A eluição foi realizada com uma solução de ácido acético a 0,1% em água (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluidos de acordo com o gradiente de variações do solvente B: de 0 a 5 min (7-11%); 5 a 10 min (11-16%); 10 a 15 min (16-25%); 15 a 30 min (25%); 30 a 34 min (25-38%); 34 a 38 min (38-50%); 42 a 46 min (60-65%); 46 a 50 min (65-70%); 54 a 58 min (75-85%); 58 a 62 min (85-25%); 62 a 63 min (25-7%); 63 a 80 min (7%), fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 20 µL para padrões e o extrato, e a temperatura do forno da coluna de 35 °C.

Os cromatogramas foram monitorados a 290 nm. A identificação de compostos nos extratos etanólicos foram realizados por comparação do tempo de retenção (tR) com aqueles obtidos injetando padrões preparados sob as mesmas condições. Para quantificação, foi construída uma curva analítica (10 pontos) a partir de uma solução contendo uma mistura de todos os padrões (Mix). Para isso, foram preparadas soluções com concentrações que variaram de 1 a 10 ppm em solução água:etanol (70:30 v/v). A quantificação dos compostos foi realizada correlacionando a área do sinal e o volume padrão adicionado, sendo a concentração expressa em g/kg.

3.8 Análise microbiológica

Para realização das análises microbiológicas em produtos não estéreis, deve-se garantir uma amostragem asséptica [86]. Previamente, foram preparados os meios Ágar sabouraud (fungos), Agar Xilose Lisina Desoxicolato (*Salmonella*), Agar MacConkey

(*Escherichia coli*) e Agar Sal Manitol (*Staphylococcus aureus*), a solução tampão e a diluição das amostras (1:10). Seguiu-se com a técnica de semeio em superfície nas placas e estas foram incubadas por 24 horas a 35°C (bactérias) e 7 dias (fungos). Após o período indicado, realizou-se a observação macroscópica e contagem das colônias de acordo com a literatura [86].

3.9 Ensaio enzimático de acetilcolinesterase

O ensaio enzimático de inibição da acetilcolinesterase (AChE) foi realizado conforme a metodologia proposta por Ellman [96] modificado por Rhee [97], com modificações. Inicialmente foram preparados extratos etanólicos das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, a partir de 500mg das amostras diluídas em 10 ml de etanol. Em microplaca foram encubados 25 µL dos extratos etanólicos em concentrações crescentes (0,0625-1,0 mg/mL) em triplicata, 50 µL do tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% albumina bovina) e 25µL da enzima AChE (0,22 U/mL), por 15 minutos a 37°C. Após esse tempo, adicionou-se 125 µL de DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)] em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 0.1M; MgCl₂·6H₂O 0.02 M; e 25 µL de ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) 15 mM. As absorbâncias foram lidas no tempo inicial e após 5 minutos da adição dos últimos reagentes, em um comprimento de onda de 405 nm em leitor de microplaca ELISA (modelo Polaris; marca Celer biotecnologia S.A). Um branco foi realizado nas mesmas condições 25 µL tampão A + 50 µL de tampão B + 25 µL da enzima acetilcolinesterase. A Rivastigmina foi controle positivo utilizado. Os procedimentos foram realizados em triplicata [76].

A porcentagem de inibição foi calculada através da equação: %inibição = 100 – (A_{amostra} / A_{branco})x 100; Onde, A é a variação das absorbâncias, no tempo inicial e final das leituras. A concentração que inibe 50% da enzima (CI₅₀) os dados foram calculados pelo programa GraphPad Prism Data Editor para Windows, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Capítulo 4 - **Resultados e Discussão**

Número de unidades	+	+	+	+	+	+	+	+
Posologia	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação da farmácia	+	+	+	+	+	+	+	+
C.N.P.J	+	+	+	+	+	+	+	+
Endereço completo	+	+	+	+	+	+	+	+
Nome do farmacêutico responsável e inscrição do CRF	+	+	+	+	+	+	+	+
Número de registro da formulação	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) atende a legislação; (-) não atende a legislação; (*) não se aplica ao produto.

São vários os casos citados na literatura de desvios de qualidade em medicamentos manipulados. No estudo realizado por Pontes [100], identificou-se que 20 amostras de fitoterápicos magistrais apresentavam rotulagens insatisfatórias. Yano et al. [101], analisou a rotulagem de 20 amostras de fitoterápicos magistrais e 6 estavam em desacordo com as legislações específicas. Os resultados para a investigação de rotulagem dos fitoterápicos de *G. biloba* e *B. monnieri* do referido estudo, mostraram que todas as amostras estão em conformidade com a legislação vigente [72], não mostrando incoerências com as informações apresentadas e exigidas. Sabe-se que a garantia da qualidade dos medicamentos não está veiculada apenas ao controle da qualidade físico-químico do produto, mas também na presença das informações que assegurem a identificação e o uso correto do medicamento fitoterápico.

1.8 Identificação de material estranho

Segundo a Farmacopeia Brasileira [86], as drogas vegetais apresentam, frequentemente, certas impurezas que podem representar órgãos da própria planta diferentes da parte usada; fragmentos de outras plantas; materiais de outras origens, como areia desde que esses elementos não caracterizem falsificação ou adulteração do material, são considerados como material estranho [102].

A pureza e qualidade das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, foram estabelecidos mediante detalhada análise macroscópica. Foi possível observar que as características das amostras de *G. biloba* não apresentaram semelhanças com a amostra G5, enquanto a amostra

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

G3 apresentou em sua composição cristais de cor branca caracterizando material estranho à formulação conforme Figura 4.1a. As mostras de *B. monnieri* apresentaram-se semelhantes com relação a amostra B5 (Figura 4.1b).

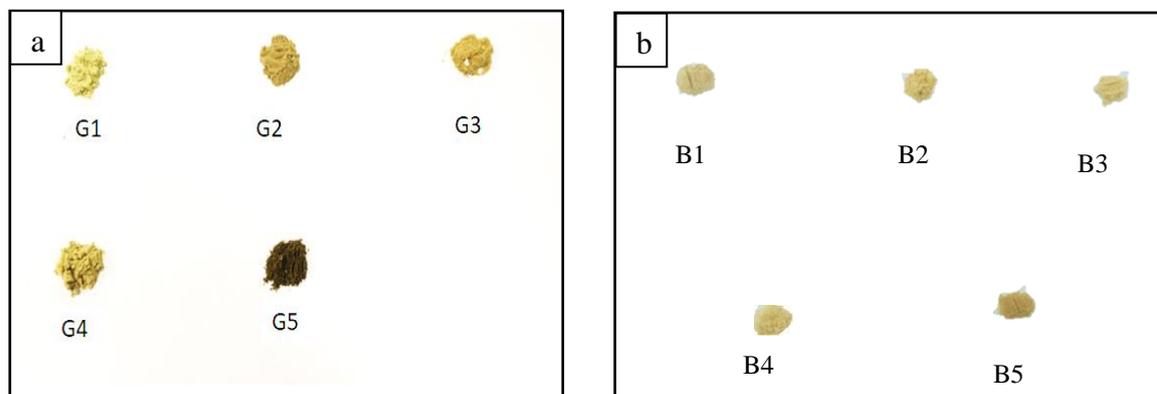


Figura 4.1. Caracteres organolépticos das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Na análise de material estranho do nosso estudo, apenas a amostra G3 apresentou 0,03% de impurezas, correspondendo a estruturas semelhantes a cristais de cor branca. Porém a amostra G3 foi aprovada no teste de qualidade, pois o índice de material estranho na amostra não ultrapassou o permitido em legislação que é de no máximo 2%, para drogas vegetais [70]. O estudo de Silva et al. [103], mostrou que elevados teores de material estranho têm sido frequentes em produtos à base de plantas medicinais, onde 100% das amostras de drogas vegetais analisadas mostraram resultados fora dos limites farmacopeicos especificados, excesso de material estranho como fragmentos do caule, podem não conter os mesmos componentes fitoquímicos presentes nas folhas, podendo assim prejudicar a ação terapêutica dos fitoterápicos. Os índices de material estranho podem ser resultado de manejo, limpeza e separação inadequada, sendo um problema frequente nos produtos à base de plantas medicinais comercializados no Brasil [104].

1.9 Determinação do peso médio, desvio padrão relativo (DPR) e variância

Os ensaios para determinação de peso médio estão descritos no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira [105]. Dentre as diferentes formas farmacêuticas manipuladas em farmácias, as cápsulas gelatinosas duras para uso oral são as mais utilizadas. Com os valores

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

dos conteúdos fitoterápicos, foram calculados o peso médio, desvio padrão relativo e limite de variância para as amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

A análise de peso médio das amostras de fitoterápicos de *G. biloba* e *B. monnieri* revelou que seis amostras encapsuladas, apresentaram uma oscilação na variação de peso médio em comparação à concentração do fitoterápico descrito em rótulo (Tabela 4.2). Entende-se que essa variação pode estar relacionada a quantidade de excipiente utilizados no preenchimento das cápsulas pelas farmácias de manipulação. Observou-se também que a amostra G1, mostrou a maior diferença no conteúdo capsular, em virtude do tamanho da cápsula com relação às outras amostras de fitoterápicos (Figura 3.1). Pereira [106], relata que a variação de peso médio entre amostras capsulares de drogas vegetais corresponde à densidade do pó, tamisação, adição de excipiente etc.

Os valores de DPR das amostras G2 e G3 (Figura 4.2), evidenciaram valores acima do preconizado pela Farmacopeia, os valores para as amostras de *B. monnieri* foram favoráveis, por expressarem valores abaixo do limite de 4%, não ultrapassando os parâmetros estabelecidos [105]. O estudo de Pereira [106], apresentou resultados favoráveis para a análise de DPR, pois estabelece um indicador de qualidade para o encapsulamento do medicamento e eficiência do manipulador.

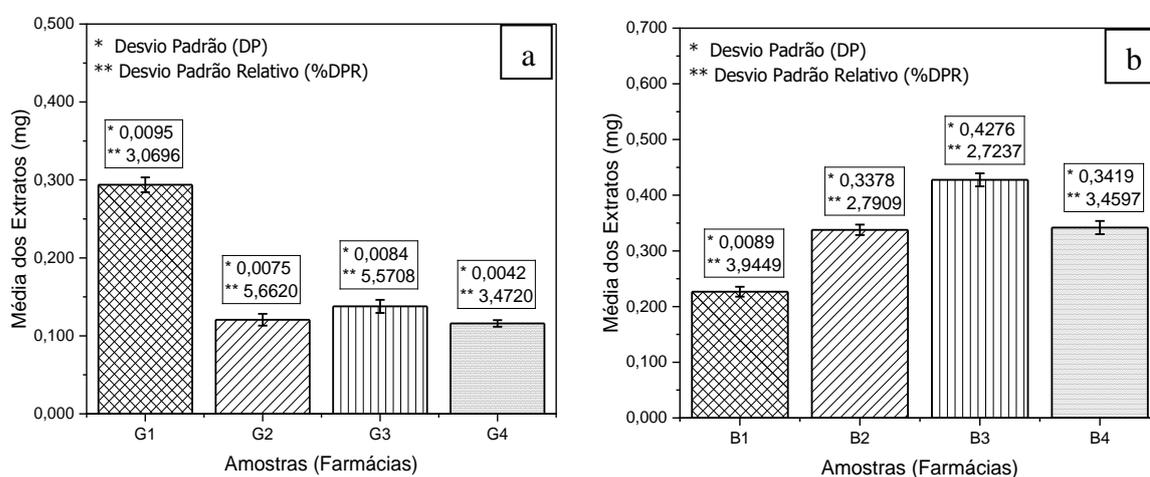
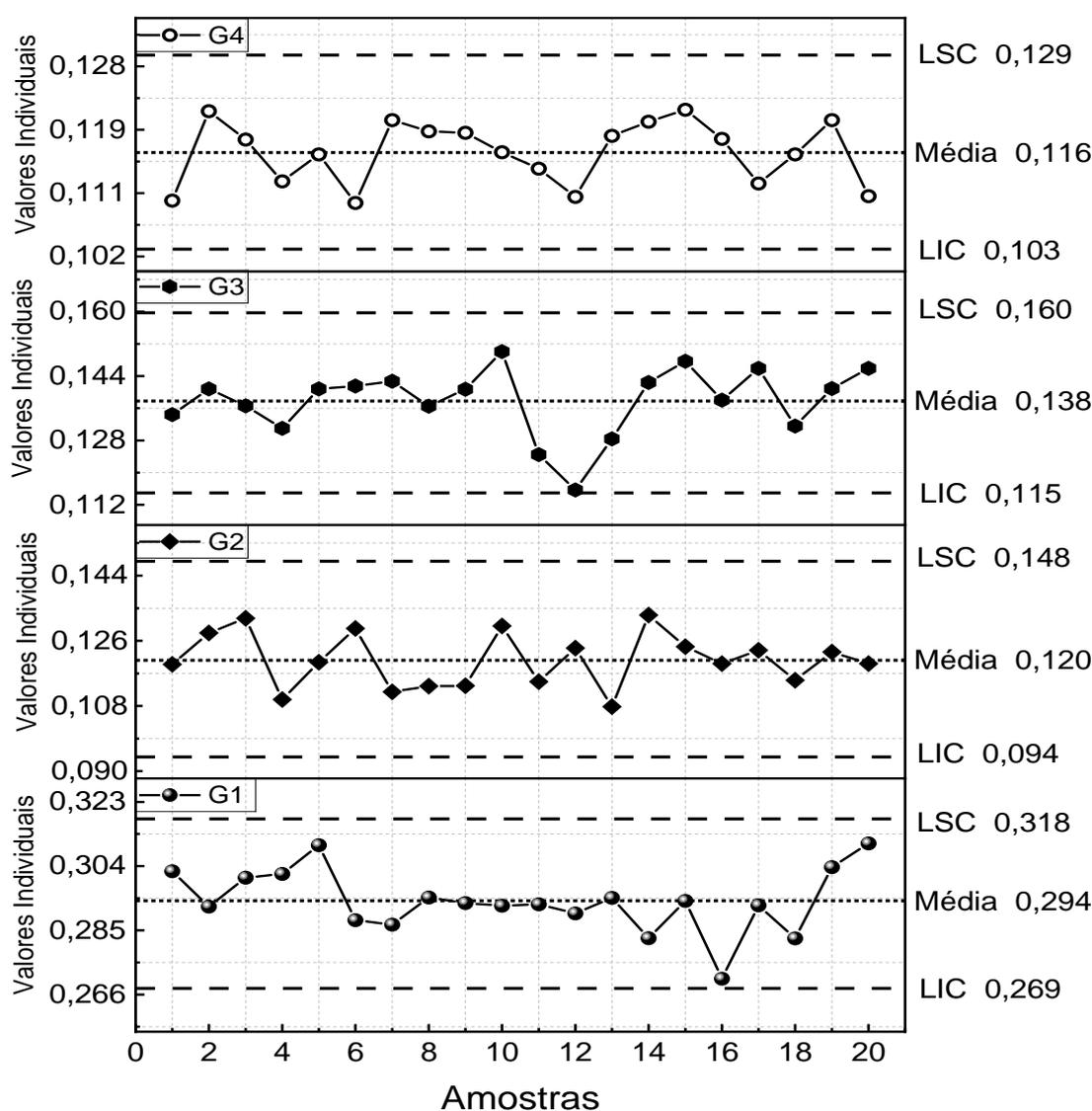


Figura 4.2. Desvio padrão relativo das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

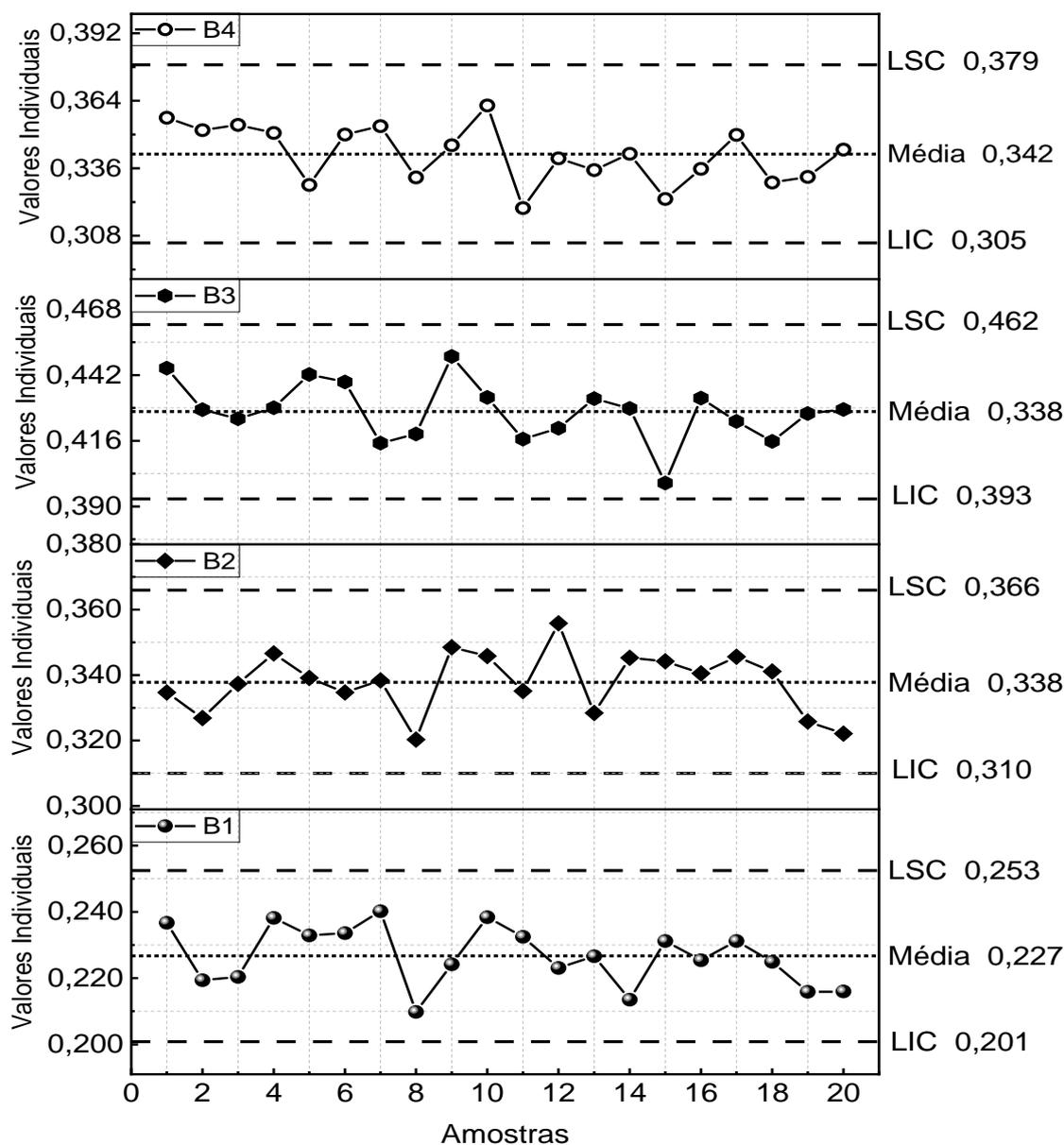
Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Os limites aceitáveis de variação de peso são estabelecidos na Farmacopeia Brasileira [105], podendo ser de 10% se o peso médio for menor ou igual a 300 mg e 7,5% se o peso médio for maior que 300 mg. As Figuras 4.3 e 4.4 descrevem, na forma de gráficos de controle os resultados dos pesos unitários das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, levando em consideração a variação de peso aceitável para cápsulas gelatinosas duras contendo doses inferiores a 300 mg, podendo sair desse intervalo de 2 a cada 20 cápsulas, nunca ultrapassando o dobro do limite.



LSC: limite superior; LIC: limite inferior

Figura 4.3. Dados referente ao peso médio das cápsulas das amostras de *G. biloba*.



LSC: limite superior; LIC: limite inferior

Figura 4.4. Dados referente ao peso médio das cápsulas das amostras de *B. monnieri*.

Segundo a Farmacopeia [105] o coeficiente de variação é utilizado para expressar a relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores obtidos, sendo de grande importância, pois pode ser utilizado como fator de definição da variabilidade do processo produtivo [107]. Para este parâmetro todas as amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* apresentaram-se dentro das especificações estabelecidas.

1.10 Análise de pH

A análise de pH das amostras fitoterápicas é um parâmetro importante para observar a estabilidade de um fármaco propenso à decomposição hidrolítica, pois cada fármaco apresenta sua estabilidade em um determinado pH que normalmente varia entre 5 e 6. Os excipientes devem ser compatíveis com a estabilidade do fármaco para não prejudicar a forma farmacêutica final [87]. Outra importância da análise do pH está relacionada ao crescimento de microrganismos que deterioram o material vegetal [108].

Os resultados de pH das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, revelaram que as amostras G1 e a B3 possuem valor de pH acima do esperado, apresentando características básicas (Tabela 7), quando comparado às demais amostras dos respectivos fitoterápicas. Estes resultados podem estar relacionados com a quantidade e o tipo de excipiente nestas amostras, corroborando com os resultados de peso médio descritos na Figura 1. Segundo Fabiano, Mameli e Zuccotti [109], os excipientes desempenham um papel importante por conferir forma, volume e consistência para a preparação farmacêutica.

1.11 Análise de desintegração.

É de suma importância que a substância ativa presente nas cápsulas fique disponível no organismo, desintegrando-se em partículas menores e conseqüentemente, aumentando a sua superfície de contato, exercendo a sua função clínica. A desintegração correlaciona-se a absorção, biodisponibilidade e ação dos fármacos no organismo, validando a importância desse teste nos ensaios de controle de qualidade [110].

O tempo de desintegração das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* foram observados até que nenhum resíduo permanecesse na tela metálica do aparelho. Os resultados obtidos são demonstrados na Tabela 4.2. Observou-se, que o tempo máximo de desintegração para as cápsulas de *G. biloba* é de 8 min e 5 s. Para as cápsulas de *B. monnieri* a amostra B4 apresentou maior tempo de desintegração (12 min e 2 s).

Tabela 4.2. Peso médio, pH e desintegração de cápsulas de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Amostras	Peso médio	pH*	Desintegração de cápsulas
G1	0,2938±0,085 ^a	9,08± 1,642 ^a	5 min e 16 s.
G2	0,1206±0,085 ^a	5,67± 1,642 ^a	4 min e 5 s.
G3	0,1378±0,085 ^a	5,62± 1,642 ^a	8 min e 5 s.
G4	0,1159±0,085 ^a	5,07± 1,642 ^a	5 min e 21 s.
G5	-	5,42± 1,642 ^a	-
B1	0,2267±0,008 ^b	7,40± 2,447 ^b	10 min e 50 s.
B2	0,3378±0,008 ^b	7,17± 2,447 ^b	8 min e 55 s.
B3	0,4275±0,008 ^b	12,85± 2,447 ^b	8 min e 30 s.
B4	0,3419±0,008 ^b	7,08± 2,447 ^b	12 min e 2 s.
B5	-	8,25± 2,447 ^b	-

*Média de três repetições ± desvio padrão. ^{a,b}

Todas as amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* foram aprovadas quanto à desintegração em meio aquoso, pois estão de acordo com a Farmacopéia [70], que preconiza que cápsulas duras não podem exceder 45 minutos para desintegrar-se. O estudo do perfil de desintegração realizado por Nascimento et al., [111] com fitoterápicos, permitiu inferir que a água é o meio que promove a desintegração das cápsulas mais rapidamente e que a adição de excipientes nas cápsulas gelatinosas não interferiu no poder de desintegração, permitindo início de ação rápida.

1.12 Análise térmica por termogravimetria (TGA)

A termogravimetria é uma técnica termoanalítica na qual se analisa continuamente a massa da amostra, em uma atmosfera controlada, em função da temperatura ou do tempo, além de fornecer informações sobre a decomposição do material [112]. O estudo de decomposição térmica de sólidos compreende três etapas principais: isolamento e

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

identificação dos intermediários e produtos finais da reação; determinação das constantes de velocidade e determinação dos parâmetros cinéticos, que caracterizam as reações de decomposição térmica [114,115].

A termogravimetria foi utilizada para determinação de umidade e cinzas dos fitoterápicos manipulados. A Figura 4.5, ilustra a curva termogravimétrica obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na atmosfera de nitrogênio para a amostra de *G. biloba* e *B. monnieri*.

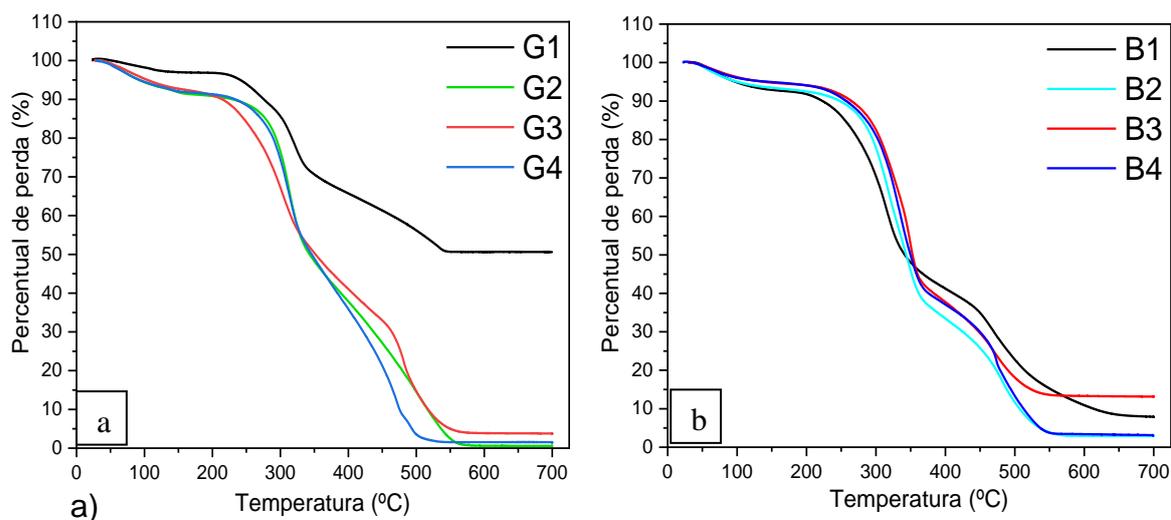


Figura 4.5. Curva termogravimétrica das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Avaliando-se o perfil termogravimétrico das amostras *G. biloba* (Figura 4.5a), estas apresentaram um comportamento de degradação térmica, com três etapas bem definidas: perda de água (umidade) na faixa de 25 a 200 °C, decomposição de carboidratos e demais materiais orgânicos no intervalo de 250 a 500 °C, acima de 550 °C uma degradação contínua do material carbonáceo e ao final do processo ocorre a formação de carvão e cinzas. As características termogravimétricas das amostras G2, G3 e G4 apresentaram perfis semelhantes entre si e essa similaridade sugere que as amostras apresentam caracteristicamente a mesma composição. Pequenas diferenças observadas nos perfis das curvas podem estar relacionadas com a origem e manipulação das amostras durante a preparação. As características termogravimétricas da amostra G1 difere das demais, sugerindo a presença de constituintes alheios à composição do encapsulado. Este resultado corrobora com os dados discrepantes de peso médio e pH (Tabela 4.2), apresentados pela amostra G1 em comparação as demais amostras de *G. biloba*.

As amostras de *B. monnieri* B1, B2 e B4 (Fig. 4.5b), degradaram-se em 4 etapas: A primeira etapa ocorreu na faixa de temperatura de 25 a 200°C pode ser atribuída à perda de voláteis, majoritariamente água. A segunda e terceira etapas de decomposição representam a degradação do conjunto dos macros e micros constituintes da amostra, ocorrendo nas faixas de temperatura de 200 – 350 °C a 350 – 500 °C. A quarta etapa de decomposição acima de 550°C, corresponde à última etapa cuja perda caracteriza-se por ser lenta e gradativa e ao final a formação de um resíduo de cinza. As amostras B1, B2 e B4, sugere uniformidade entre os perfis, evidenciado pelas etapas de decomposição, indicando classes de compostos orgânicos semelhantes para as amostras de *B. monnieri*. A amostra B3 apresentou características termogravimétricas semelhante às amostras G2, G3 e G4 dos fitoterápicos *G. biloba*, ressaltando que está amostra também apresentou conteúdo capsular e pH diferentes das outras amostras de *B. monnieri* (Tabela 4.2).

A Tabela 4.3, mostra as etapas de decomposição, com os respectivos percentuais de perda de massa e resíduos de cinzas das amostras *G. biloba* e *B. monnieri*. O estudo de Holanda Neto [116], afirmou que a análise térmica é uma importante ferramenta utilizada no controle de qualidade de produtos fitoterápicos, permitindo a verificação simultânea do teor de umidade e cinzas, acesso a todo o perfil termoanalítico da amostra, além de apresentar menor margem de erro. De acordo com os valores estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira [86], foi observado que os teores de umidade, obtidos por termogravimetria, para todas as amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* foram inferiores ao limite máximo de 14,0%. Por outro lado, em relação aos teores de cinzas para as mostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, somente as amostras G2 e G4 foram aprovadas, apresentando valores abaixo do limite máximo de 2,0%. As amostras G1 e B3 apresentaram os maiores teores de cinzas de 50,59% e 13,15%, respectivamente, sugerindo adulteração ou erro no processo magistral. Araújo et al. [115], determinaram o teor de umidade e cinzas em várias amostras vegetais e concluíram que os altos teores de cinzas pode ser indício de contaminação ou mau processamento do material.

Tabela 4.3. Resultados da curva termogravimétrica das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri* na razão de aquecimento de 10°C/min, atmosfera de nitrogênio.

ETAPAS DE DECOMPOSIÇÃO M(%)					
Amostras	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Cinzas (%)
G1	3,36	25,04	21,01	-	50,59
G2	8,60	35,18	56,22	-	0
G3	8,07	60,13	28,02	-	3,78
G4	8,34	37,37	52,76	-	1,53
B1	8,03	38,43	18,61	27,08	7,85
B2	8,30	53,75	14,28	20,89	2,78
B3	6,43	50,28	30,14	-	13,15
B4	6,41	52,21	19,19	19,03	3,16

1.13 Análise colorimétrica

Na análise colorimétrica, a teoria de Young-Helmholtz descreveu que a visão humana é tricromática e a cor pode ser classificada de acordo com seu valor, croma e matiz. O valor indica o grau de luminosidade da cor, oscilando do preto puro ao branco puro; o croma está relacionado com o grau de saturação da cor, representando a intensidade da cor e a matiz que é o comprimento de onda dominante da cor, o que permite diferenciá-la das demais cores [117].

A análise colorimétrica foi realizada pelo espaço de cores CIELAB1976 definido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) [118]. As medições de cores foram realizadas em três leituras em um ângulo de 90° de cada amostra, obtendo-se uma média das três leituras (L^* , a^* e b^*), como mostrado na Tabela 4.4.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Tabela 4.4. Valores dos componentes colorimétricos L*, a* e b* das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Amostras	Cor da amostra	L*	a*	b*
G1		50,33	2,09	18,52
G2		39,89	7,95	18,43
G3		42,43	9,23	22,03
G4		49,78	6,09	17,94
G5		32,58	5,50	18,89
B1		50,82	5,89	13,84
B2		56,06	5,14	16,16
B3		57,72	4,02	13,06
B4		57,06	4,93	16,21
B5		44,39	5,42	18,73

L* (luminosidade) , a* (matriz verde-vermelho) e b*(matriz azul-amarelo)

Os resultados deste estudo mostraram que a variação de tonalidades das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, são comprovadas pela redução gradativa na luminosidade – L*, evidenciando fitoterápicos com coloração mais escura ou intensa [119]. Observou-se que os valores de L* não foram discrepantes na avaliação amostral dos fitoterápicos à base de *B.*

monnieri, evidenciando uma coloração uniforme e que as amostras possuem o mesmo padrão de formulação.

O aumento nos valores da variável (a^*) indica que a amostra está adquirindo uma tonalidade mais avermelhada [120,121]. Ambas as amostras de *G biloba* e *B. monnieri* não apresentaram valores altos para a matriz verde-vermelho (a^*), mostrando que estas amostras não possuem as referidas cores. Os valores obtidos para a coordenada cromática ou matriz azul-amarelo (b^*), indicam que as amostras de *G biloba* e *B. monnieri* apresentam uma uniformidade e tendência à coloração amarela, em virtude dos valores mais próximos da cor amarela. As reduções dos valores dessa variável indicam que a amostra está escurecendo, adquirindo uma tonalidade azulada que pode ser indicativo a degradação de alguns constituintes químicos [120,121].

1.14 Análise fitoquímica preliminar e Cromatografia de camada delgada (CCD).

As propriedades medicinais dos vegetais estão diretamente relacionadas com os seus metabólitos que podem ser extraídos e avaliados. Várias técnicas de extração favorecem ao pesquisador retirar dos materiais vegetais os metabólitos desejados, podendo ser utilizados em estudos farmacológicos para o esclarecimento científico de suas propriedades medicinais [122]. Para a avaliação dos parâmetros de integridade e pureza fundamentados nas classes de metabólitos secundários nas amostras em estudo foram realizados ensaios fitoquímicos, indicando variação qualitativa e semiquantitativa de composição química nas amostras em estudo perspectiva de avaliar as classes de metabólitos secundários presentes nas amostras em estudo [123].

Na análise fitoquímica dos extratos etanólicos, as amostras de *G. biloba* revelaram a presença de flavonoides (coloração avermelhada), as amostras de *B. monnieri* apresentaram resultados positivo para flavonoides e triterpenos (coloração parda avermelhada), conforme a Tabela 4.5. O estudo de Pei et al. [124], mostraram que as principais classes de compostos metabólitos identificados em extratos de *G. biloba* foram os flavonoides e terpenos que são responsáveis pela atividade antioxidante desta planta. Os metabólitos secundários que conferem as atividades farmacológicas da *B. monnieri* são as saponinas, flavonoides, fenóis, alcaloides, terpenoides, taninos e esteroides [125].

Tabela 4.5. Prospecção fitoquímica preliminar das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Classe de compostos	Amostras									
	G1	G2	G3	G4	G5	B1	B2	B3	B4	B5
Taninos /condensados	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Esteroides	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Triterpenos	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Presença (+); ausência (-)

O perfil cromatográfico permite, em muitos casos, uma confirmação da identidade de um fitoterápico e até a detecção de falsificações [126]. Foram obtidos vários perfis cromatográficos por CCD em sílica gel, empregando os eluentes com diferenças de polaridade. Os perfis cromatográficos para as cinco amostras *G. biloba* foram demonstrados na Figura 4.6.

As análises de CCD das amostras de *G. biloba*, apontaram que os principais constituintes identificados foram os flavonoides. As amostras G1, G2, G3 e G4 mostraram manchas de cor amarela com Rf próximo do flavonoide padrão quercetina (Figura 4.6a). No entanto na Figura 4.6b, as amostras G2, G3 e G4 apresentaram manchas de cor amarela com Rf próximo flavonoide padrão rutina, estes resultados comprovam os resultados da análise fitoquímica preliminar (Figura 4.6c). Estudos realizados por Banov [127] e Pimentel [128], mostraram a identificação de flavonoides em extrato seco de *G. biloba*, confirmando a presença dos flavonoides quercetina e rutina.

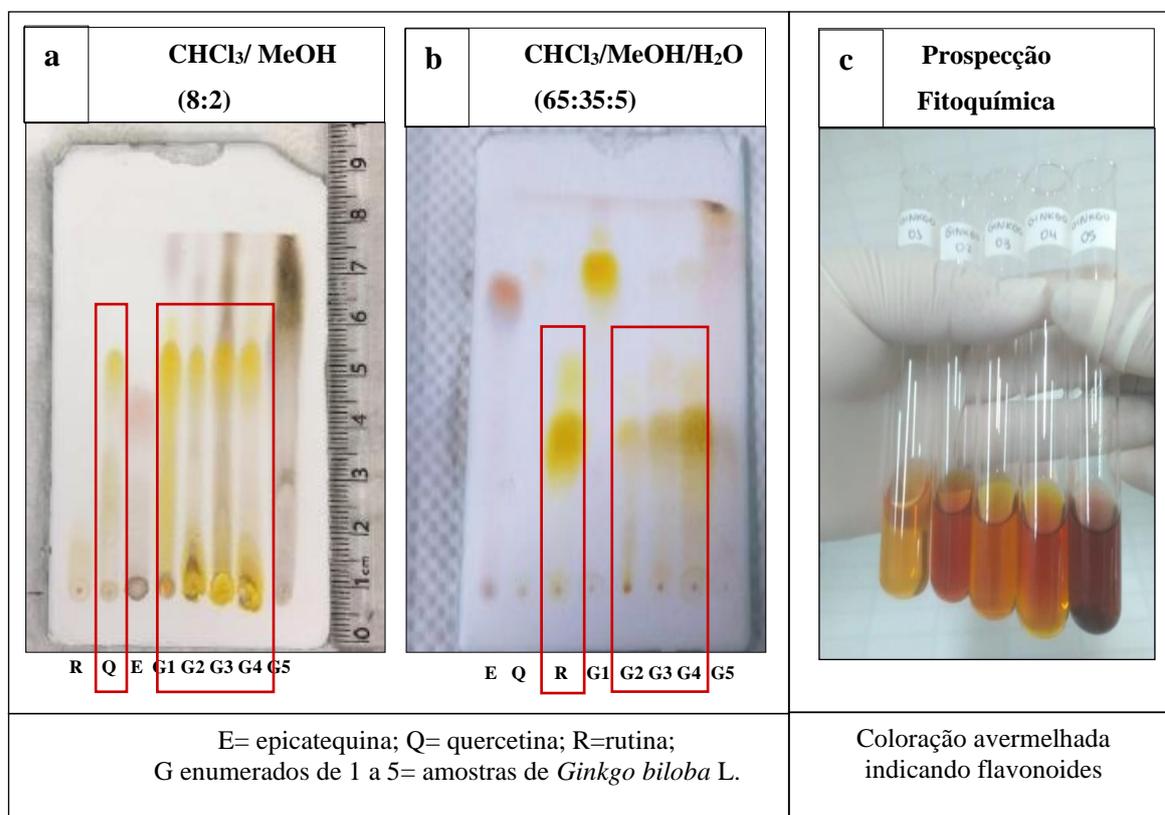


Figura 4.6. Análise por CCD (a e b) e prospecção fitoquímica (c) das amostras de *G. biloba*.

Para as amostras de *B. monnieri*, as amostras B1, B2, B3 e B4 apresentaram características cromatográficas semelhantes, mostrando que as amostras possuem a mesma composição química, além de possuírem Rf próximo do flavanol epicatequina, caracterizada por coloração laranja-avermelhado, possibilitando identificar a existência deste constituinte químico (Figura 4.7b). Na figura 4.7a, as amostras B1, B2, B3 e B4 apresentaram Rf próximo ao esteroide sitosterol, evidenciando os resultados da análise fitoquímica preliminar das amostras de *B. monnieri* (Figura 4.7c, d).

A identificação de diferentes metabolitos secundários pode estar relacionado com a estação do ano, mês, horário e local no qual foram coletadas as espécies vegetais bem como a idade da planta e as partes utilizadas em estudos, [129].

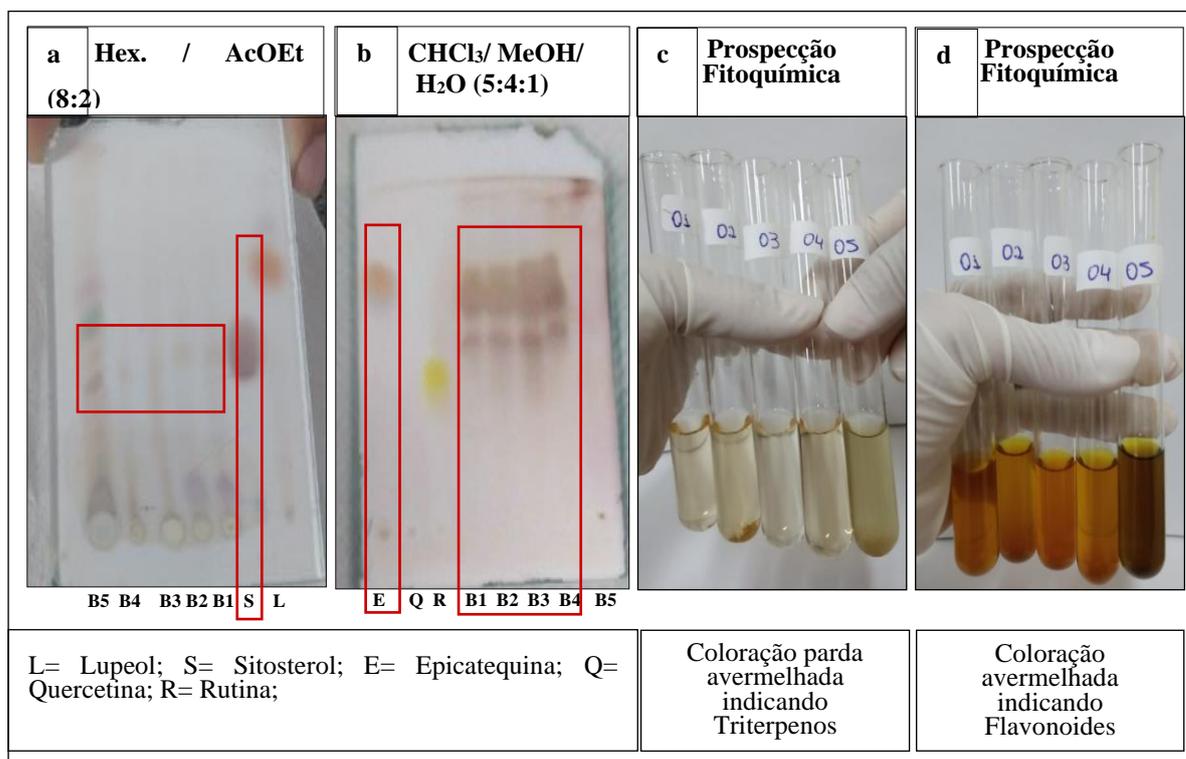


Figura 4.7 Análise por CCD (a e b) e prospecção fitoquímica (c e d) das amostras *B. monnieri*.

1.15 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise fitoquímica das plantas permite conhecer os metabólitos secundários de espécies vegetais e/ou avaliar a presença destes compostos [130]. Os flavonoides são considerados marcadores farmacológicos da espécie *G. biloba*, o extrato padronizado EGb761, deve conter no mínimo 24,0 % de ginkgoflavonoides [131,132]. Comparando os perfis cromatográficos determinados por CLAE dos fitoterápicos (G1, G2, G3 e G4) e a amostra vegetal (G5) de *G. biloba*, foi possível observar a diferença da composição fitoquímica destas amostras. Os cromatogramas das amostras G1, G2, G3 e G4 de *G. biloba*, apresentam perfis cromatográficos de fitofármacos, com tempo de retenção para os

Capítulo 4 - **Resultados e Discussão**

flavonoides rutina e quercetina. O composto rutina apresentou-se em maior concentração nas amostras G2 (544,30 g/kg), G3 (1023,14 g/kg) e G4 (1003,72 g/kg) e o composto quercetina na amostra G1(608,00 g/kg) (Tabela 4.6), corroborando com os resultados de CCD deste estudo (Figura 4.9).

Tabela 4.6. Compostos identificados por CLAE.

COMPOSTOS IDENTIFICADOS												
Concentração (g/kg)												
Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,70	-	608,00
G2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	544,30	8,36	3,90
G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1023,14	-	5,82
G4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1003,72	-	6,30
G5	-	-	-	4,86	-	-	-	-	-	12,30	-	-
B1	-	-	-	2,36	-	-	-	-	-	3,71	4,57	3,50
B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,61	4,13	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,83	-
B4	-	-	-	2,53	-	-	-	-	-	4,29	-	-
B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,65

1-Ácido gálico, 2- Catecol, 3- Catequina, 4- Ácido clorogênico, 5- Ácido caféico, 6 (-) epicatequina, 7 – Siringaldeido, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11 – miricetina, 12- Quercetina, (-) Ausente.

A comparação dos perfis cromatográficos determinados por CLAE dos fitoterápicos (B1, B2, B3 e B4) e a amostra vegetal (B5) de *B. monnieri*, demonstraram composição fitoquímica semelhantes, tratando-se de fitoterápicos com a presença de vários picos com tempos de retenções distintos (Figura 4.10). Nas amostras de *B. monnieri*, foram identificados e quantificados traços de compostos fenólicos, tais como: ácido clorogênico, rutina, miricetina e quercetina (Tabela 4.6). A amostra B1 se destacou com a presença dos quatro compostos, ácido clorogênico (2,36 g/kg), rutina (3,71 g/kg), miricetina (4,57 g/kg) e quercetina (3,50 g/kg), as demais amostras apresentavam apenas dois ou um desses compostos. Os extratos etanólico e aquoso de *B. monnieri* apresentam principalmente as saponinas, os constituintes majoritários desta espécie à presença das saponinas bacosides A e B, responsáveis pelo aprimoramento da memória [133,134].

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Os flavonoides rutina e quercetina, identificados nas amostras de fitoterápicos de *G. biloba* e *B. monnieri*, podem ser também os metabólitos secundários responsáveis, assim como as saponinas esteróidais, pela eficácia destes fitoterápicos para tratamento de distúrbio da memória. A rutina possui importância farmacológica e terapêutica por inibir o processo de formação de radicais livres, além de evitar danos ao sistema nervoso através da modulação da atividade de enzimas como da enzima acetilcolinesterase [135,136,137,138]. A quercetina, possui amplos benefícios terapêuticos que envolvem seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios [3] e sua capacidade neuroprotetora [139]. A quercetina é capaz de prevenir a perda de memória e de aprendizagem e reverter os déficits cognitivos induzidos pela Doença de Alzheimer [140,141].

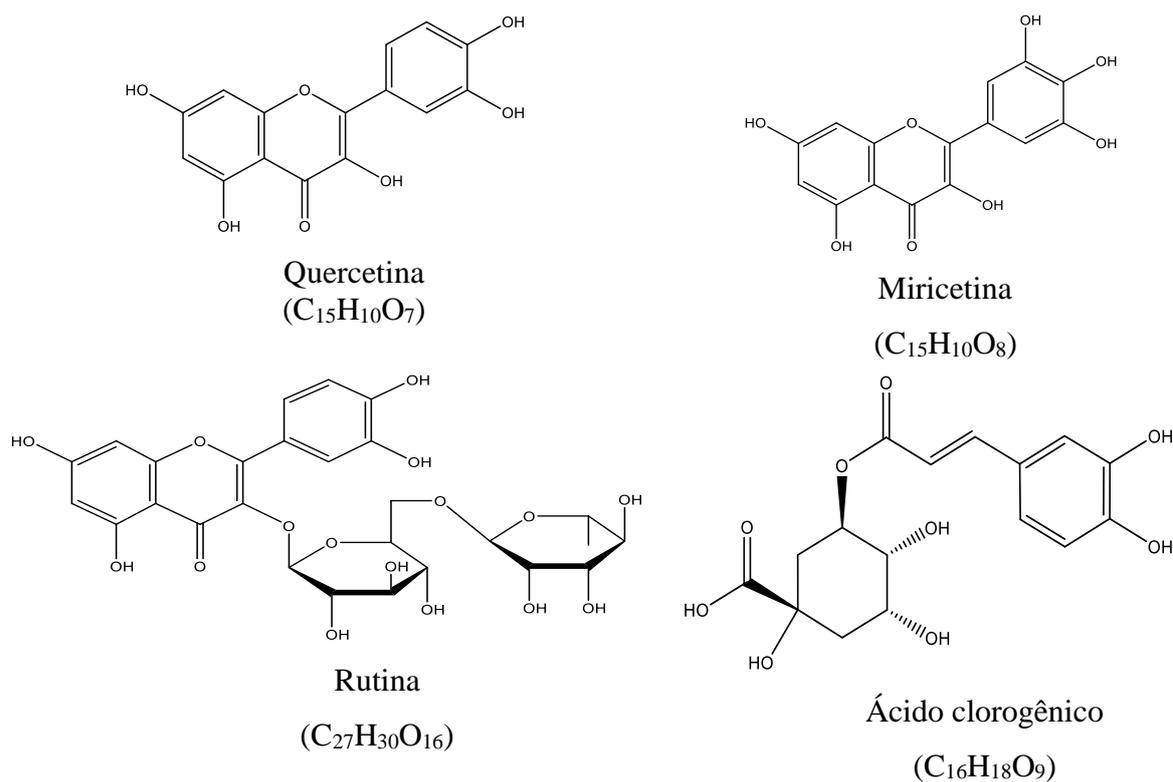


Figura 4.8. Estrutura química dos compostos fenólicos.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

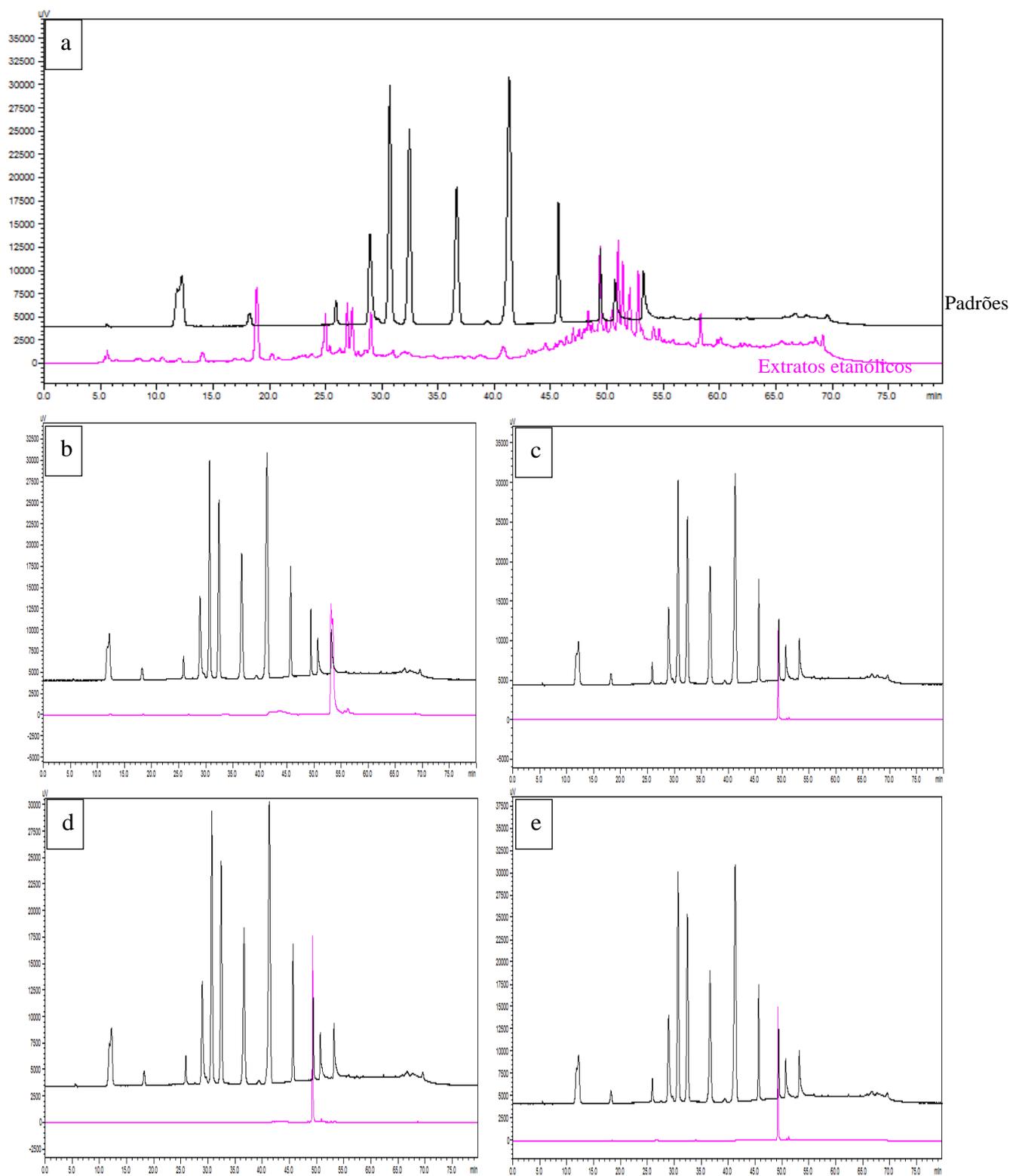


Figura 4.9. Cromatograma mix dos padrões 1-Ácido gálico, 2- Catecol, 3- Catequina, 4- Ácido clorogênico, 5- Ácido caféico, 6 (-) epicatequina, 7 – Siringaldeido, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11 – miricetina, 12- Quercetina e extratos etanólicos das amostras de *G. biloba*. a:G5; b:G1; c:G2; d:G3; e:G4; à 290 nm.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

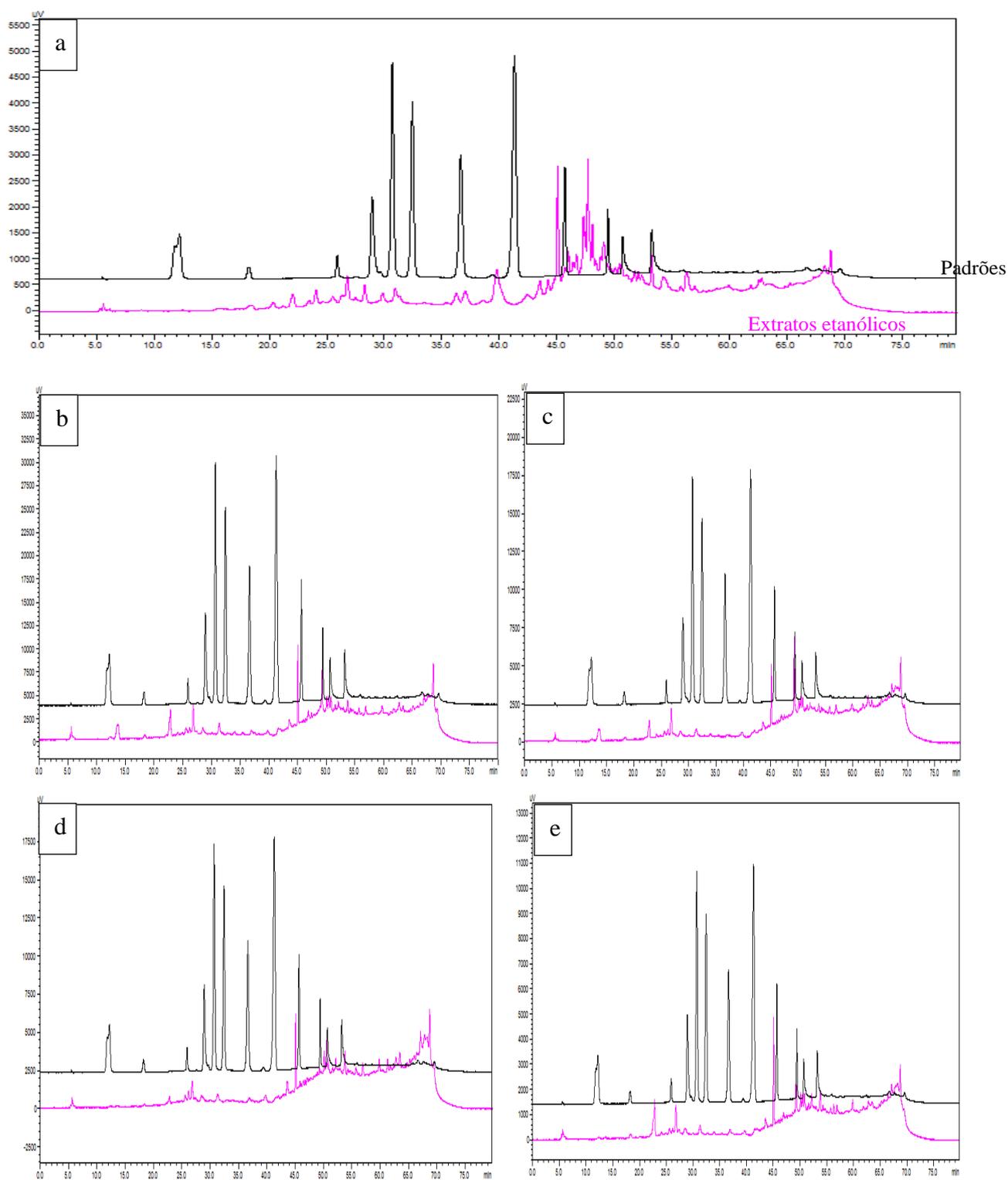


Figura 4.10. Cromatograma mix dos padrões 1-Ácido gálico, 2- Catecol, 3- Catequina, 4- Ácido clorogênico, 5- Ácido caféico, 6 (-) epicatequina, 7 – Siringaldeído, 8- Ácido cumárico, 9- Cumarina, 10- Rutina, 11 – miricetina, 12- Quercetina e extratos etanólicos das amostras de *B.monneri*. a:B5; b:B1; c:B2; d:B3; e:B4; à 290 nm.

1.16 Análise microbiológica

Os testes microbiológicos avaliam a qualidade do produto acabado a fim de descartar possíveis contaminações por bactérias e fungos, que são extremamente patogênicos, podendo vir a agravar de forma irreversível o quadro clínico do cliente que faz uso da medicação fitoterápica [142,143]. As amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, não apresentaram crescimento de espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella ssp*, portanto estão em conformidade com os parâmetros descritos na Farmacopeia Brasileira, que preconiza valor de até 10^4 UFC/mL para aprovação. Em relação ao crescimento fúngico, todas as amostras analisadas apresentaram-se nos padrões de qualidade requeridos (até 10^2 UFC/mL) conforme Tabela 4.7.

Os valores aceitáveis de microrganismos nas amostras analisadas podem estar associados à atividade antimicrobiana descrita para as espécies vegetais *G. biloba* e *B. monnieri*. De acordo com Ibrahim e Nuhu [144], o extrato EGb 761 tem efeito de inibição considerável contra bactérias patogênicas e fungos, isso pode ser devido à presença de variedades de compostos ativos no extrato como flavonoides e taninos. O estudo de Fazlul et al. [145], revelou que os extratos da planta *B. monnieri* possuem propriedades antimicrobianas de amplo espectro, sendo os flavonoides, taninos e compostos fenólicos responsáveis por este efeito de inibição.

Tabela 4.7. Crescimento médio de microrganismos das amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*.

Amostras	<i>Escherichia coli</i> (n=3) *	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=3) *	<i>Salmonella ssp</i> (n=3) *	Fungos (n=3) *
G1	-	-	-	-
G2	-	-	-	-
G3	-	-	-	$0,014 \times 10^2$
G4	-	-	-	-
G5	-	-	-	$0,002 \times 10^2$
B1	-	-	-	$0,002 \times 10^2$
B2	-	-	-	$0,001 \times 10^2$
B3	-	-	-	-
B4	-	-	-	-
B5	-	-	-	$0,003 \times 10^2$

1.17 Atividade anticolinesterásica

A acetilcolinesterase tem sido um alvo no tratamento da DA, principalmente devido ao fato de inibidores reversíveis da AChE poderem aumentar os níveis de ACh no cérebro, sendo relatada melhora da memória e habilidades cognitivas dos pacientes com DA [146]. Vários inibidores reversíveis da AChE são usados em ensaios clínicos como medicamentos para tratamento da DA [147].

Extrato padronizado das folhas de *G. biloba*, rotulado EGb761, tem sido amplamente utilizado desde a sua introdução no mercado para melhorar os déficits de cognição em uma ampla gama de condições, do envelhecimento à demência [148]. Estudos pré-clínicos *in vitro*, *in vivo* e clínicos confirmaram os efeitos neuroprotetores do EGb761, sendo considerada a erva mais vendida para vários transtornos de saúde [124]. Estudos sugerem que as partes aéreas *B. monnieri* possui potencial para melhorar a função de cognição, possivelmente através da redução da atividade da AChE, aumentando a função antioxidante, melhorando o fluxo sanguíneo cerebral e modulação neurotransmissora [149].

Vinutha et al. [75], em seu estudo de inibição da AChE com extratos de plantas medicinais, propuseram a classificação do potencial inibitório das amostras: inibidores fortes (> 50% de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos (< 30% de inibição). Dessa forma as amostras G4, B2 e B5 com valores percentuais acima de 50%, classificaram-se como fortes inibidores da AChE.

Nesta pesquisa, o estudo da atividade inibitória anticolinesterásica mostrou que dos cinco extratos etanólicos de *G. biloba* testados, apenas a G4 mostrou uma inibição acima de 50% (59,92% ± 14,00) com CI₅₀ de 0,8540 mg/mL (Tabela 4.8). Os valores promissores de inibição quantitativa da AChE, foram observados nos extratos etanólicos de *B. monnieri*, para as amostras B2 (56,03% ± 5,96) e B5 (98,61% ± 0,46), apresentando CI₅₀ de 0,9650 mg/mL e 1,8221x10⁻⁵ mg/mL, respectivamente (Tabela 4.8). Estes resultados são relevantes, sendo a amostra B5 mais efetiva, quando comparamos com a rivastigmina CI₅₀ = 1,87x10⁻³ mg/mL [77], que é um medicamento inibidor da AChE amplamente utilizado no tratamento de pessoas com DA [150].

Das e Mukherjee [151], comparou o efeito de extratos etanólicos de *B. monnieri* e *G. biloba* observando a atividade *in vitro* da AChE, nas concentrações 30 mg/kg; 100 mg/kg e 300 mg/kg. Os resultados desta pesquisa mostraram que a atividade anticolinesterásica dos extratos etanólicos *B. monnieri* e *G. biloba* apresentaram inibição dependente da concentração

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

e da atividade enzimática. A AChE foi inibida mais na presença de *G. biloba* em comparação a *B. monnieri*, relatando que nenhum dos extratos de *B. monnieri* mostrou mais de 50% de inibição, diferenciando-se dos resultados obtidos em nosso estudo. O estudo afirma, que a inibição quantitativa da AChE, pode sugerir a melhoria da função colinérgica perturbada, podendo ser um fator importante na propriedade medicinal de extratos de *G. biloba* [151].

A *B. monnieri* tem sido relatada como inibidor direto da atividade da AChE testada por ensaio enzimático *in vitro* [152]. No estudo de Yamchuen [153], o extrato de *B. monnieri* e todos os compostos testados não alteraram a atividade basal celular da AChE. Assim, sua capacidade de reduzir a atividade de AChE foi possivelmente associada a outros mecanismos de ação como a supressão do estresse oxidativo celular.

Usando a metodologia de Ellman [96] modificado por Rhee [97] é possível identificar a inibição da enzima acetilcolinesterase em testes *in vitro*. Os resultados permitiram identificar se as frações obtidas a partir das amostras são promissoras no estudo da atividade anticolinesterásica.

A atividade anticolinesterásica foi averiguada por meio de análise colorimétrica, baseado na taxa de hidrólise da acetilcolina (ACh) pela AChE. Os valores obtidos mostraram que as amostras G4, B2 e B5, possuem uma relevante inibição frente a enzima acetilcolinesterase com 59,92%, 56,03% e 98,61%, respectivamente, sendo possível para ambas a obtenção da concentração de extrato para a inibição da atividade enzimática em 50% (CI₅₀). Portanto os resultados encontrados são promissores na investigação da atividade inibitória da AChE, conforme a Tabela 4.8

Tabela 4.8. Inibição e classificação da intensidade de inibição das amostras *G. biloba* e *B. monnieri* na concentração de 1mg/mL.

Amostras	Percentual de inibição (%)	Intensidade da inibição	Concentração inibitória (CI₅₀) mg/mL
G1	ND	-	-
G2	31,99% ± 19,15	Moderado	-
G3	31,17% ± 26,31	Fraco	-
G4	59,92% ± 14,00	Forte	0,8540
G5	47,92% ± 20,43	Moderado	-
B1	33,89% ± 4,00	Moderado	-
B2	56,03% ± 5,96	Forte	0,9650

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

B3	35,28% ± 10,99	Moderado	-
B4	29,78% ± 13,88	Fraco	-
B5	98,61% ± 0,46	Forte	1,8221x10 ⁻⁵

ND – Não Detectado

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises físico-químicas mostraram divergências nas análises de peso médio, pH, perfis termogravimétricos e colorimétricos, para algumas amostras de fitoterápicos à base de *G. biloba* e *B. monnieri*. As amostras G1 e B3 mostraram parâmetros físico-químicos contraditórios as leis vigentes da ANVISA e Farmacopéia Brasileira, evidenciando a necessidade de padronização no preenchimento das cápsulas, validação das doses unitárias, adição de compostos inorgânicos, erros no armazenamento e manipulação desses fitoterápicos. A análise colorimétrica reforça as diferenças entre as amostras de *G. biloba*, fazendo menção à possível adição de substâncias veículos na manipulação das cápsulas.

A análise fitoquímica preliminar das amostras indicou como principais classes de metabólitos secundários flavonoides, taninos e triterpenos. Na análise de CCD observamos a presença de flavonoides em ambas as amostras de *G. biloba* e *B. monnieri*, como também similaridade entre as amostras *B. monnieri*. Na investigação e quantificação dos compostos bioativos por CLAE, mostrou a presença de compostos fenólicos ácido clorogênico, quercetina, miricetina e rutina, sendo que todas as amostras de *G. biloba*, apresentaram alta concentrações de quercetina ou rutina e para as amostras de *B. monnieri*, apenas a amostra B1 apresentou traços dos quatro de compostos fenólicos.

O teste de inibição da enzima AChE, mostrou que amostra G3 é promissora quando comparada com a amostra vegetal G5 de *G. biloba*. No que se refere as amostras de *B. monnieri* a amostra vegetal B5 apresentou com um potencial de inibição de 98,61% reforçando a importância desse fitoterápico na melhoria de processos cognitivos.

Os resultados obtidos neste estudo poderão ser utilizados como padrão de referência para futuras avaliações da qualidade de cápsulas de *G. biloba* e *B. monnieri* produzidas por farmácias de manipulação. As amostras G1 e B3 não atingiram as especificações da Farmacopéia sendo consideradas reprovadas, compreendendo que medidas devem ser tomadas pela agência reguladora para garantir a implementação adequada das diretrizes regulatórias e práticas de boa fabricação, garantindo que os processos de produção e controle de qualidade sejam adequados.

REFERÊNCIAS

- [1] SILVESTRE NETO, JUAREZ. et al. A fitoterapia como terapêutica complementar no tratamento do Alzheimer. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 2, 2014.
- [2] Brasil. Ministério da Saúde, . Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE no. 89 de 16 de março de 2004. Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Brasília: ANVISA, 2004c.
- [3] OLIVEIRA, A. C. D., ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p.185-198, 2016.
- [4] DAI, C.X., HU, C.C., SHANG, Y.S., XIE, J.. Role of *Ginkgo biloba* extract as an adjunctive treatment of elderly patients with depression and on the expression of serum S100B. **Medicine (Baltimore)**, v. 97, n. 39, p. 12-21, 2018.
- [5] TIAN, J., LIU, Y., CHEN, K., *Ginkgo biloba* Extract in Vascular Protection: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 15, n. 6, p. 532-548, 2017.
- [6] YANG, Y., LI, Y., WANG, J., SUN, K., TAO, W., WANG, Z., XIAO, W., PAN, Y., ZHANG, S., WANG, Y. Systematic Investigation of *Ginkgo Biloba* Leaves for Treating Cardio-cerebrovascular Diseases in an Animal Model. **ACS Chem. Biol**, v. 12, n. 5, p. 1363-1372, 2017.
- [7] YANG, G., WANG, Y., SUN, J., ZHANG, K., LIU, J. *Ginkgo biloba* for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Curr Top Med Chem**, v. 16, n. 5, p. 520-528, 2016.
- [8] NASH, K.M., SHAH, Z.A., 2015. Current Perspectives on the Beneficial Role of *Ginkgo biloba* in Neurological and Cerebrovascular Disorders. **Integr Med Insights**, v.10, p. 1-9, 2015.

- [9] YIN, B., XU, Y., WEI, R., LUO, B., 2014. Ginkgo biloba on focal cerebral ischemia: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Chin. Med*, v. 42, n. 4, p. 769-783, 2014
- [10] KIM, M. S. BANG, J. H. LEE, J. HAN, J. S. BAIK, T. G. JEON, W. K. Ginkgo biloba L. Extract protects against chronic cerebral hypoperfusion by modulating neuroinflammation and the cholinergic system. *Phytomedicine*, v. 23, n. 12, p. 1356–64, 2016.
- [11] PEDRO, M. M. **Pesquisa de actividade inibitória da enzima acetilcolinesterase em extratos aquosos de várias plantas usadas como infusões. Identificação de compostos com maior actividade inibitória.** DQB – FCUL, Lisboa, 2008. (Dissertação de mestrado)
- [12] WHO. Folium *Ginkgo*. WHO. 2018 [cited 2019 Apr 10]. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/18.html>.
- [13] SRINATH R., RAJKUMAR P, KAVIRAJ C, ASRA PARVEEN P. Efficient plant regeneration from leaf explants of *Bacopa monniera* (L.) Wettst.: A threatened medicinal herb. *Annals of Phytomedicine*, v. 1, n. 1, p. 110-117, 2014.
- [14] SINGH, H. K, DHAWAN, B.N. Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic *Bacopa Monniera*Linn. (Brahmi). *Indian J Pharmacol*, v. 29, p. 359–365, 1997.
- [15] RUSSO, A. AND BORRELLI, F. *Bacopa monnieri*, a Reputed Nootropic Plant: An Overview. *Phytomedicine*, v. 4, p. 305-318, 2005.
- [16] SAINI, N.; D. SINGH & R. SANDHIR. Neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Experimental Model of dementia. *Neurochemical Research*, v. 37, n. 9, p. 1928-1937, 2012.
- [17] JADIYA, P.; A. KHAN; S.R. SAMMI; S. KAUR; S.S. MIR & A. NAZIR. Anti-Parkinsonian effects of *Bacopa monnieri*: Insights from transgenic and pharmacological *Caenorha-biditis elegans* models of Parkinson’s disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 413, n. 4, p. 605-610, 2011.

- [18] RADHA P., S. SUMATHI & P.R. PADMA. Antioxidant status of oxidant challenged rats treated with bacopa monnieri leaf extract. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 35-38, 2011.
- [19] MATHEW, J.; J. PAUL; M.S. NANDHU & C.S. PAULOSE. *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 315-322, 2010.
- [20] DIAS, BRUNA MICAELA MAGALHÃES. **Fitoterapia no cansaço, demência e perda de memória**. Universidade de Coimbra. 2019. (Trabalho de conclusão de curso).
- [21] EUN, C. S, LIM, J. S, LEE, J., LEE, S. P, YANG, S. A. The protective effect of fermented *Curcuma longa* L. on memory dysfunction in oxidative stress-induced C6 gliomal cells, proinflammatory-activated BV2 microglial cells, and scopolamine-induced amnesia model in mice. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.
- [22] ADAMS, M.; BERSET, C.; KESSLER, M.; HAMBURGER, M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders – A survey of European herbals from the 16th and 17th century. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne. v. 121, p. 343-359, 2007
- [23] OH, M.H. et al. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 544-548, 2004.
- [24] JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. **Molecules**, 12, 2130- 2139, 2007.
- [25] ANFARMAG. **Manual de Incompatibilidades farmacotécnicas para preparações de uso tópico**. São Paulo. 194p, 2006.
- [26] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição – Primeiro Suplemento.2018. Brasília. 126p.
- [27] RODRIGUES, C. A. A Cultura do Maracujazeiro. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2000.

[28] CARNEIRO, F. M., SILVA, M. J. P., BORGES, L., LALBERNAZ, L. C., COSTA, J. A. (2014). Tendências dos Estudos com Plantas Medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedades, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

[29] TOMAZZONI MI, NEGRELLE RRB, CENTA ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto Contexto & Enfermagem**, v. 13, p. 115-121, 2006.

[30] GONÇALVES NMT, VILA MMDC, GERENUTTI M, CHAVES DSA. Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, p. 632-637, 2013.

[31] ZENI ALB, PARISOTTO AV, MATTOS G, HELENA ETS. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.

[32] CARVALHO ACB, BALBINO EE, MACIEL A, PERFEITO JPS. Situação do Registro de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314- 319, 2008.

[33] BUKAR BB, DAYOM DW, UGURU MO. (2016). The growing economic importance of medicinal plants and the need for developing countries to harness from it: a mini review. **IOSR Journal of Pharmacy**, v.6, p. 42-52, 2016.

[34] BORGES RAM, OLIVEIRA VB. Riscos Associados ao Uso de Plantas Medicinais Durante o Período da Gestação: uma Revisão, **Revista Universidade Andrade**, v. 16, p. 101- 108, 2015.

[35] MOREIRA DL, TEIXEIRA SS, MONTEIRO MHD, DE-OLIVEIRA ACAX, 82 PAUMGARTTEN FJR. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248-257, p. 2014.

[36] Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014b. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o

registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, 14 de maio de 2014.

[37] JESUS NZT, LIMA JCS, SILVA RM, ESPINOSA MM, MARTINS DTO. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como anti-úlceras e anti-inflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p.130-139, 2009.

[38] SILVA MR. A utilização do conhecimento de plantas medicinais como ferramenta para estimular a preservação ambiental. **Revista Monografias Ambientais - REMOA/UFMS**, v. 87, n. 6, p. 1354-1380, 2012.

[39] ARAUJO CRF, SILVA AB, TAVARES EC, COSTA EP, MARIZ SR. Perfil e prevalência de uso de plantas medicinais em uma unidade básica de saúde da família em Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 35, p. 233-238, 2014.

[40] ABRANCHES MV. **Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição**. 1. ed. Viçosa: AS Sistemas, 2015.

[41] MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA-JUNIOR VF. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

[42] SILVA, THIAGO FERREIRA OLIVEIRA DA; MARCELINO, CARLOS EDUARDO; GOMES, ANA JULIA P. SANTINHO. Utilizações e Interações Medicamentosas de Produtos Contendo o Ginkgo Biloba. **Colloquium Vitae**, v. 2, n. 1, p.54-61, 2010.

[43] SILVA, Daniella Trabach. **Análises Comparativa de Embalagens Contendo Ginkgo biloba L.** - Curso de Pós Graduação Latu sensu, Especialista em Tecnologias Indústrias Farmacêuticas, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013. (Especialização).

[44] NAKANISHI, K. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to century. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 17, p. 4987-5000, 2005.

- [45] MEIRA, JULIANA LIMA **Controle físico-químico de Ginkgo biloba L. (Ginkgoaceae) cápsulas**. Ciências Farmacêuticas – UFPE. 2006. (Dissertação de mestrado)
- [46] CAIEIRO, D. M.; MARCUCCI, M. C. Composição Química e Atividade Antioxidante de Formulações Comerciais contendo Ginkgo biloba L. **Revista Fitos**, v. 5, n. 3, p.64-72, 2010.
- [47] OSHIRO, MARIANA CARDOSO et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 4, p.116-122, 2016.
- [48] CHRISTEN Y, MAIXENT JM. 2002. What is Ginkgo biloba extract EGb 761? An overview-from molecular biology to clinical medicine. **Cell Mol Biol**, v. 48, p. 601–611, 2002.
- [49] WHO. Radix Ginseng. WHO. 2018 [cited 2019 Apr 12]. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/19.html>.
- [50] WHO. Folium Ginkgo. WHO. 2018 [cited 2019 Apr 10]. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/18.html>.
- [51] PHAM, H. T. N., PHAN, S. V., TRAN, H. N., PHI, X. T., LE, X. T., NGUYEN, K. M., ... MATSUMOTO, K. *Bacopa monnieri* (L.) ameliorates cognitive deficits caused in a trimethyltin-induced neurotoxicity model mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 1384– 1393, 2019.
- [52] SAESONG, TONGCHAI; TEMKITTHAWON, PRAPAPAN; NANGNGAM, PRANEE; INGGANINAN, KORNKANOK. Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. **Songklanakarín J. Sci. Technol**, v. 2, ed. 41, p. 397-404, 2019.
- [53] JAIN, PUSHPENDRA KUMAR; DAS, DEBAJYOTI. Pharmacognostic comparison of *bacopa monnieri*, *cyperus rotundus*, and *emblica officinalis*. **Innov J Ayuvedic Sci**, v. 4, n. 4, p. 16-26, 2016.

[54] SINGH, D., ARYA, P. V., KOOLWAL, N., SINGH, V., SAXENA, R., SHARMA, M. C., GUPTA, R. S. Protective role of *Bacopa monniera* L. against hepatic oxidative stress in wistar albino rats. **Phytochem.** v. 4, p. 233, 2015.

[55] BANERJEE, R., HAZRA, S., GHOSH, A. K., MONDAL, A. C. Chronic administration of *Bacopa monniera* increases BDNF protein and mRNA expressions: a study in chronic unpredictable stress induced animal model of depression. **Psychiatry Investig**, n.11, p. 297, 2014.

[56] CHAUDHARI, K.S., TIWARI, N.R., TIWARI, R.R., SHARMA, R.S. Neurocognitive effect of nootropic drug Brahmi (*Bacopa monnieri*) in Alzheimer's disease. **Annals of neurosciences**, v. 24, n. 2, p. 111-122, 2017.

[57] RAMASAMY, S., CHIN, S.P., SUKUMARAN, S.D., BUCKLE, M.J.C., KIEW, L.V., CHUNG, L.Y., 2015. In silico and *in vitro* analysis of bacoside A aglycones and its derivatives as the constituents responsible for the cognitive effects of *Bacopa monnieri*. **PloS one**, v.10, n. 5, p. 1-19, 2015.

[58] RASTOGI, R. P., MEHROTRA, B. N. **Compendium of Indian Medicinal Plants**. Central Drug Research Institute, 1990.

[59] CHATTERJI, N., RASTOGI, R., DHAR, M. L. Chemical examination of *Bacopa monniera* Wettst.: part I-isolation of chemical constituents. **Indian J. Chem.** v. 1, p. 212–215, 1963.

[60] BASU, N. Chemical examination of *Bacopa monniera*, Wettst: Part III bacoside B. **Indian J. Chem.** v. 5, p. 84–86, 1967.

[61] BHANDARI, PAMITA; SENDRI, NITISHA; DEVIDAS, SHINDE BHAGATSING. Dammarane triterpenoid glycosides in *Bacopa monnieri*: A review on chemical diversity and bioactivity. **Phytochemistry**, v. 172, p. 1-14, 2020.

- [62] DEEPAK, M., SANGLI, G. K., ARUN, P. C., AMIT, A. Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. **Phytochem.** v. 16, p. 24–29, 2015.
- [63] FAROOQUI AA, FAROOQUI T, MADAN A, ONG JH-J, ONG W-Y. Ayurvedic Medicine for the Treatment of Dementia: Mechanistic Aspects. **Evidence-Based Complement Altern Med.** v. 2018, p. 1–11, 2018.
- [64] **Monograph, Bacopa monniera, Alternative Medicine Review.** 2004 [cited 2019 Apr 13]. v. 9, p. 79–85, 2004: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/9/1/79.pdf>
- [65] NEMETCHEK MD, STIERLE AA, STIERLE DB, LURIE DI. The Ayurvedic plant *Bacopa monnieri* inhibits inflammatory pathways in the brain. **J Ethnopharmacol,** v. 197, p. 92– 100, 2017.
- [66] MIRANDA MV. **Controle de qualidade de amostras comerciais de Schinus terebinthifolius RADDI (AROEIRA) adquiridas em mercados públicos da cidade de São Luís-MA.** Universidade Federal do Maranhão, 2013. (Dissertação de mestrado)
- [67] POUTARAUD A, GIRARDIN P. Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as a example. **Plant Genetic Resources,** v. 3, p.178-189, 2005.
- [68] FATIMA N, NAYEEM N. Toxic Effects as a Result of Herbal Medicine Intake. In: SOLONESKI S, LARRAMENDY ML. Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum, IntechOpen, 2016. p. 194 – 204.
- [69] LIMA IEO, NASCIMENTO LAM, SILVA MS. Comercialização de plantas medicinais no município de Arapiraca-AL. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v. 18, n. 2, p. 462-472, 2016.
- [70] BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 6. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2019a. Disponível em: . Acesso em: 16 ago. 2019.

[71] MARTINAZZO APC, FILHO LC, ROSA DA, TEODORO CES, TOMAZELLI KK. Perfil de utilização de Fitoterápicos nos municípios de volta Redonda e Barra Mansa/RJ. **Revista Fitos**. v. 8, n. 2, p. 103-112, 2013.

[72] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2007.

[73] BRITO MCA. Farmacovigilância em fitoterapia: controle de qualidade do mesocarpo de *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng. (babaçu) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2015. (Dissertação de mestrado)

[74] GONÇALVES MC. Farmacovigilância em fitoterapia: comércio e controle de produtos vegetais adquiridos em estabelecimentos farmacêuticos no município de São Luís, estado do Maranhão. – Universidade Federal do Maranhão. 2016. (Dissertação de mestrado)

[75] VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, p. 359-63, 2007.

[76] CAVALCANTE, CIBELLE DE MELO BASTOS. Inalação de crack aumenta a susceptibilidade a crises epilépticas via redução da atividade da acetilcolinesterase – UFAL. 2018. (Dissertação de mestrado)

[77] MOTA, W.M.; BARROS, M.L.; CUNHA, P.E.L; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C.S.; LEOPOLDO, P.T.G; FERNANDES, R.P.M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012.

[78] VENTURA, ANA L. M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives Of Clinical Psychiatry**, v. 37, n. 2, p.66-72, 2010

[79] PETRONILHO, ELAINE DA CONCEIÇÃO; PINTO, ANGELO C.; VILLAR, JOSÉ DANIEL FIGUEROA. Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, n. 1, p.03-14, 2011

[80] BABADI, VAHID YOUSEFI et al. The Toxic Effect of Manganese on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brains. **Journal Of Toxicology**, v. 2014, p.1-4, 2014.

[81] ARAÚJO, CLEÔNIA ROBERTA M.; SANTOS, VICTÓRIA L. A.; GONSALVES, ARLAN A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p.1818-1834, 2016.

[82] CHIERRITO, TALITA PEREZ CANTUARIA. Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2016. (Tese de doutorado)

[83] COLOVIC, MIRJANA B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p.315-335, 2013.

[84] SOARES, Vanessa de Matas. Efeitos da exposição aguda a nicotina sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro do Peixe-Zebra (Danio rerio) - Curso de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. (Dissertação de mestrado)

[85] COSTA, M. et al. N-Acetyl Cysteine Decreases Mice Brain Acetyl Cholinesterase Activity: An *In Vitro* Kinetic Study. **Enzyme Engineering**, v. 5, n. 1, p.5-11, 2016.

[86] Brasil. Ministério da Saúde Farmacopeia Brasileira. Diário Oficial da União. v. 1, n. 5, 2010.

[87] ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. Premier. n. 6, 568p, 2000

[88] AULTON, M. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. . Porto Alegre: Editora Artmed. cap. 18, 2005, p. 264 -284.

- [89] PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 7. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 786 p, 2008.
- [90] GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2208 p, 2004.
- [91] MCLAREN, K. The Development of the CIE 1976 (L*a*b*) uniform colour-space and colour-difference formula. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**. v. 92, p. 338-341, 2008.
- [92] RAGAIN, J.C. A review of color science in dentistry: colorimetry and color space. **Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy**, v. 4, p. 1–5, 2016.
- [93] Ohta, N., Robertson, A. Colorimetry: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, 2006. p. 197-204.
- [94] MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- [95] CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por ccd: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”. **Química Nova**. v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.
- [96] ELLMAN G.L., COURTNEY K. D., ANDRES V., FEATHERSTONE R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88 - 90, 1961.
- [97] RHEE, I.K. ET AL. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217-223, 2001.
- [98] LOPES, M. W.; TIYO, R.; ARANTES, V. P. Utilização de Passiflora incarnata no tratamento da ansiedade. **Revista Uningá Review**. v. 29, n. 2, p. 81 – 86, 2018.

[99] SILVA, LEANDRO DE OLIVEIRA; SILVA, ROSEMEIRE LIMA DA. Controle de qualidade quanto à determinação de peso nas cápsulas manipuladas em farmácias da cidade de Mogi Guaçu, SP. **FOCO**. v. 7, n. 5, p. 41-59, 2014.

[100] PONTES, FE. Medicamentos manipulados: avaliação dos processos e dos laudos de análise das amostras recebidas pelo Laboratório Central Noel Nutels (2003-2006). Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017. (Especialização)

[101] YANO, H.M.; SANTOS, A.P.; BUGNO, A., AURICCHIO, M.T. Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** .v. 67, n. 1, 2008.

[102] LUCCA, P.S.R; ECKERT, R.G; SMANHOTTO, V; KUHN, L.M.; MINANTI, L.R. Avaliação farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal camomila (*Chamomilla recutita* L.) comercializada como alimento em Cascavel - Paraná. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 2, p. 153-156, 2010.

[103] SILVA, C.; RIBEIRO, A. B.; RIBEIRO, P. R. S. Avaliação da qualidade de plantas medicinais comercializadas no município de Imperatriz, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 13, n. 12, 2017.

[104] AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S.; OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 27-30, 2003.

[105] Brasil. Farmacopeia Brasileira. F.N. 2ª ed. Revisão - 02. Brasília, DF. v1, 2012

[106] PEREIRA, ANA CAROLINA DE MATTOS. Análise de cápsulas de losartana preparadas em farmácias de manipulação - Centro Universitário Braz Cuba, Mogi das Cruzes, 2019. (Trabalho de conclusão de curso)

[107] FERREIRA, A. O. **Guia Prático da farmácia magistral**. 4 ed. –São Paulo: Pharmabooks Editora, 2011.

[108] CIDADE, A. F.; RODRIGUES, D. ; SANTOS, E. S.; ROCHA, E. P. S. ; OLIVEIRA, G. C.; MACEDO, J. M. ; OLIVEIRA, J. V. S. DE; MESQUITA, J. S. DE; PEREIRA, M. V. D. ; SILVA, M. A. DA; ARAÚJO, N. F. DE; TABORDA, R. L. M. ; RODRIGUES, R. DA C. Caracterização físico-química e microbiológica de *Peperomia quadrangularis*. 70ª Reunião Anual da SBPC , UFAL - Maceió / AL, 2018.

[109] FABIANO, V., MAMELI, C. E ZUCCOTTI, G. V. Paediatric pharmacology: Remember the excipients. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 5, p. 362-365, 2011.

[110] SIMCH, F. H. Testes Aplicados Em Estudos De Equivalência Farmacêutica. Palotina-PR, 2013. (Trabalho de conclusão de curso)

[111] NASCIMENTO, M.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; PILON, T. P. F. Padronização de excipientes para cápsulas gelatinosas duras contendo o extrato seco de valeriana officinalis. **Revista Uniara**, v. 189, n. 2, p. 167-175, 2015.

[112] PROVENSI, G. Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (passifloraceae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007. (Dissertação de mestrado)

[113] SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M. Relaxant effect of the aqueous extract of *Erythrina vellutina* leaves on rat vas deferens. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 343-78, 2007.

[114] RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, n. 2, p. 263-270, 2006.

[115] ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

- [116] HOLANDA NETO, MARCELO ABDON DE. Aplicação da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial de uma droga vegetal. - Universidade Estadual da Paraíba, 2013. (Trabalho de conclusão de curso)
- [117] PARDO, P.J.; PÉREZ, A.L.; SUERO, M.I. Na example of Sex-Linked Color Vision Differences, **Inc Col Res Appl.** v. 32, n. 6, p. 433-439, 2007
- [118] FAIRCHILD, Mark D. **Color Appearance Models.** 3. John Wiley & Sons, 2013.
- [119] TOSUN, I.; USTUN, N.; TEKGULER, B. Mudanças físicas e químicas durante a maturação de frutos de amora-preta. **Scientia Agrícola,** v. 65, p. 87-90, 2008.
- [120] ESTEVES, B., MARQUES, A. V., DOMINGOS, I., PEREIRA, H. Heat-induced colour changes of pine (*Pinus pinaster*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood. **Wood Science and Technology,** v. 42, n. 5, p. 369-384, 2008.
- [121] PINCELLI, S.M. et al. Effect of thermal rectification on colors of Eucalyptus saligna and Pinus caribaea woods. Maderas. **Ciencia y tecnología,** v. 14, n. 2, p. 239-248, 2012.
- [122] SOUSA, J. D. DE. Análise fitoquímica e atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos das folhas e frutos de Morinda citrifolia LINN. FACULDADE DE JUAZEIRO DO NORTE, 2015. (Trabalho de conclusão de curso)
- [123] GONDIM , ROBERTA SABRINE DUARTE. Farmacovigilância em fitoterapia: qualidade de drogas vegetais e fitoterápicos empregados em doenças do aparelho digestivo em São Luís, Maranhão, Brasil. – Ufma, 2019. (Dissertação de mestrado)
- [124] PEI, JINXIN V.; KOURGHI, MOHAMAD; DE IESO, MICHAEL L.; CAMPBELL, EWAN M.; DORWARD, HILARY S.; HARDINGHAM, JENNIFER E.; YOOL, ANDREA J. Differential Inhibition of Water and Ion Channel Activities of Mammalian Aquaporin-1 by Two Structurally Related Bacopaside Compounds Derived from the Medicinal Plant Bacopa monnieri. **Molecular Pharmacology** , v. 90, n. 4, p. 496-507, 2016.

[125] RUBABA KARIM, ASHFIA FATIMA KHAN, SABIHA AKTER, NAJIA SULTANA SHUCHI, MST. MALIHA TABACHASUM MADHURI, MD. NAZMUL HOSSAIN. Evaluation of Antiulcerogenic Activity of Bacopa Monnieri (LINN.) on Ethanol-Induced Gastric Injury In Mice. **International Journal of Medical Sciences and Innovative Research**. v. 3, n. 3, p. 196 – 211, 2018.

[126] FARIAS, M.R. **Avaliação de qualidade de matérias-primas vegetais**. In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. da UFSC, 2000.

[127] BANOVA, D.; BABY, A. R.; DEL BOSCO, L. M.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219-224, 2006.

[128] PIMENTEL, K. T.; VARGAS, A. M. P. Análise cromatográfica do extrato de Ginkgo biloba. **Anais VI SIMPAC** – v. 6, n. 1, p. 59-64, 2014.

[129] GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374- 381, 2007 .

[130] MACIEL BA, SOUZA SMZ, BRAZ W DE J, CORREIA JS, MAGALHÃES ACO, CRUZ HC, BENFICA LA, REHEM BC. **Análise de rótulos de chás e folhas comercializadas em farmácias de produtos naturais, em Porto Seguro-BA**. In: 64º Congresso Nacional de Botânica: Sociedade Botânica do Brasil, 2013

[131] SINGH, B, KAUR, P, SINGH, G, AHUJA, P. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. **Fitoterapia**, v. 79, p. 401-418, 2008.

[132] SILVA, NATÁLIA CRISTINA SOUSA et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **Única Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2017.

[133] MORGAN A, STEVENS J. Does *Bacopa monnieri* improve memory performance in older persons? Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **J Altern Complement Med.** v. 16, n. 7, p. 753–759, 2010.

[134] CALABRESE C, GREGORY W.L, LEO M, BONE, K.,OKEN, B. Effects of a standardized *Bacopa monnieri* extract on cognitive performance, anxiety and depression in the elderly: A randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. **J Altern Complement Med,** v. 14, p. 707–713, 2008.

[135] YOUDIM, K.A.; DOBBIE, M.S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A.R.; ABBOTT, N.J.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. **Journal of Neurochemistry,** v. 85, p. 180-192, 2004.

[136] SOOB RATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : Mechanism and actions. **Mutation Research.** v. 579, p. 200-213, 2005.

[137] SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORREA, M.; DA ROSA, M.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology,** v. 610 n. (1-3),p. 42-48, 2009.

[138] PARK, S.Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. **Archives of pharmacal research,** v. 33, n. 10, p. 1589-1609, 2010.

[139] LU, J. et al. Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. **Behav Brain Res,** v. 171, p. 251–60, 2006.

[140] GAYOSO, L.C., MORENO, I., PUERTA, E., SUÁREZ-SANTIAGO, J. E., SANTOS-MAGALHÃES, N. S., RAMIREZ, M. J., IRACHE, J. M. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **Int J Pharm,** v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.

- [141] WANG D, ZHAO J, LI S, SHEN G, HU S. Quercetin attenuates domoic acid-induced cognitive deficits in mice. **Nutr Neurosci.** v. 21, n. 2, p. 123-131, 2018.
- [142] ANDRADE, F. R. O.; SOUZA, A. A.; ARANTES, M. C. B.; DE PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Análise Microbiológica de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia.** v. 2, p. 38-44, 2013.
- [143] BONFILIO, R.; SANTOS, O. M. M.; NOVAES, Z. R.; MATINATTI, A. N. F. Controle de qualidade físico químico e microbiológico em 2347 amostras manipuladas em 2010 e 2011. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 34, n. 4, p. 527-535, 2013.
- [144] IBRAHIM, M.P.; NUHU, A. A. Phytochemical screening and antibacterial/antifungal activities of *Ginkgo biloba* extract EGB 761. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences** , v. 11, p. 43-49, 2016.
- [145] FAZLUL, M.K.K; DEEPTHI, S.P; MOHAMMED, IRFAN; FARZANA, Y; MUNIRA, B; NAZMUL, M.H.M. Antibacterial and antifungal activity of various extracts of *Bacopa monnieri*. **International Journal of Pharmaceutical Research** , v.11, p. 1698-1702, 2019.
- [146] PATHAK, A.K.; BANDYOPADHYAY, T. Unbinding of fluorinated oxime drug from the AChE gorge in polarizable water: a well-tempered metadynamics study. **Phys. Chem. Chem. Phys. Pccp.**, v. 9, n. 7, p. 55 - 60, 2017.
- [147] ZHANGA, L.; LI, D.; CAO, F.; XIAO, W.; ZHAO, L.; DING, G.; WANG, Z.Z. Identification of Human Acetylcholinesterase Inhibitors from the Constituents of EGb761 by Modeling Docking and Molecular Dynamics Simulations. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.21, n. 1, 2018.
- [148] MÜLLER, W. E.; ECKERT, A. ; ECKERT, G. P.; FINK, H. ; FRIEDLAND, K. ; GAUTHIER, S. ; HOERR, R. ; IHL, R. ; KASPER, S. ; MÖLLER, H. Therapeutic efficacy of the Ginkgo special extract EGb761® within the framework of the mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease. **The World Journal of Biological Psychiatry.** v. 20, n. 3, p. 1814-1412, 2019.

- [149] KONGKEAW C., DILOKTHORNSAKUL P., THANARANGSARIT P., LIMPEANCHOB N., NORMAN S. C. Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. **J Ethnopharmacol.** v. 151, n. 1, p. 528-35, 2014.
- [150] SERENIKI, M.A.B.F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. Vital, **Rev. de Psiquiatria**, v. 30, p. 1-17, 2008.
- [151] DAS B.K. AND MUKHERJEE S.C. A histopathological study of carp, *Labeo rohita* exposed to hexachlorocyclohexane. **Veterinarski Arhiv.** v. 70, n. 4, p. 169-180, 2002.
- [152] LE X.T, PHAM H.T, DO P.T, FUJIWARA H, TANAKA K, LI F, NGUYEN, T.V., NGUYEN, K.M., MATSUMOTO, K. *Bacopa monnieri* ameliorates memory deficits in olfactory bulbectomized mice: possible involvement of glutamatergic and cholinergic systems. **Neurochem Res.** v. 38, n. 10, p. 2201-2215, 2013.
- [153] YAMCHUEN, P. ; CHAIWIANG, N. ; LAPPHANICHAYAKOOL, P. ; INGKANINAN, K. ; LIMPEANCHOB, N. Neuroprotective Effect of *Bacopa monnieri* Extract on Oxidized Low Density Lipoprotein-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. **Thai J Pharmacol**, v. 39, n. 1, p. 5 – 18, 2017.