

Caracterização do Extrato Seco de *Ginkgo biloba* L. em Formulações de Uso Tópico

Daniel BANOV, André Rolim BABY*, Lívia Martins DEL BOSCO,
Telma Mary KANEKO & Maria Valéria Robles VELASCO

Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo,
Avenida Prof. Lineu Prestes, 580, bl. 13 inferior. Conjunto das Químicas.
Cidade Universitária. 05508-900. São Paulo - SP. Brasil

RESUMO. As propriedades terapêuticas do extrato de *Ginkgo biloba* L. estão relatadas na literatura por muito tempo e, atualmente, este tem sido adicionado em formulações de uso tópico devido sua ação antioxidante. Nesta pesquisa, o extrato seco de *Ginkgo biloba* L. foi incorporado nas formas farmacêuticas de emulsão óleo-em-água (O/A) e gel hidrofílico. A identificação dos flavonóides foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD) e seu conteúdo, equivalente em quercetina, foi quantificado por espectrofotometria utilizando como referência a curva analítica de quercetina como padrão de referência secundário. A metodologia analítica foi validada segundo os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão.

SUMMARY. "Characterization of *Ginkgo biloba* L. Dry Extract in Topical Formulations". Therapeutic properties of *Ginkgo biloba* L. extract have been known for centuries and, currently, the extract has been added in pharmaceutical dosage forms claiming antioxidant activity. *Ginkgo biloba* L. dry extract was incorporated in topical formulations, as O/W emulsion and hydrophilic gel. The content of total flavonoids, equivalent in quercetin, was characterized by thin layer chromatography (TLC) and quantified by spectrophotometry using the analytical curve of quercetin as secondary standard. The analytical methodology was validated for linearity, precision and accuracy parameters.

INTRODUÇÃO

A árvore *Ginkgo* é a única representante da ordem das Ginkgoales, um grupo das gimnospermas que compunha a família das Ginkgoaceae e consistia de 15 membros datados da Era Mesozóica, compreendendo 225 milhões de anos. Pode ser considerada a planta de sementes mais antiga, e possui durabilidade extrema, vivendo entre 2.000 e 4.000 anos¹. A literatura oriental, especificamente a primeira Farmacopéia Chinesa, há aproximadamente 5.000 anos, relatou as propriedades terapêuticas de determinadas preparações contendo *Ginkgo biloba* L. O Ocidente iniciou intensamente a pesquisa de seu uso medicamentoso em meados do século XX, e em 1965 o extrato de *Ginkgo biloba* L. foi introduzido na medicina. A literatura indica o emprego do extrato para os distúrbios do sistema nervoso central e periférico, deficiência da circulação sanguínea e aterosclerose cerebral¹⁻³.

Ginkgo biloba L. é uma árvore alta e robusta de folhas com ruptura vertical divididas em dois lóbulos, em forma de leque e extremamente resistente. Pertence ao grupo das gimnospermas, com características morfológicas peculiares devido a disposição estrutural das folhas e o sistema vascular relativamente primitivo^{4,5}. As folhas características da *Ginkgo biloba* L. podem atingir até 8 cm e suas cores são dependentes da estação do ano: verde acinzentado a amarelo esverdeado no verão e, amarelo dourado no outono⁶.

Atualmente, existe a tendência de incorporação de extratos vegetais de atividade ou propriedades biológicas ou fisiológicas comprovadas em produtos de aplicação tópica. Estes devem ser padronizados quali e quantitativamente, exigindo rigoroso estudo da planta, plantio, condições de obtenção do extrato e sua composição⁷. O extrato seco de *Ginkgo biloba* L. exer-

PALAVRAS-CHAVE: Flavonóides; *Ginkgo biloba* L.; Validação de metodologia.

KEY WORDS: Flavonoids; *Ginkgo biloba* L. dry extract; Methodology validation.

* Autor a quem dirigir correspondência. E-mail: andrerb@usp.br; andre_rolim@uol.com.br.

ce suas propriedades biológicas ou fisiológicas devido a presença e atividade combinada de seus princípios ativos ^{1,8}.

A padronização do processo de obtenção do extrato de *Ginkgo biloba* L. foi efetuada no final do século XX, sendo então o mesmo denominado de EGb 761. Neste, foi empregado um processo especial, em que as condições laboratoriais foram controladas e padronizadas, envolvendo varias etapas de extração e eliminação das substâncias indesejáveis, dentre estas os ácidos ginkgólicos e as bioflavonas, e também a determinação da concentração das substâncias ativas de reconhecida atividade terapêutica e eficácia clínica, como os flavonóides glicosídeos e os terpenos ⁹.

No processo de obtenção do extrato de *Ginkgo biloba* L, inicialmente as folhas secas passam pelo processo de extração com acetona e água. Após total eliminação da acetona por evaporação, utiliza-se uma seqüência de tratamentos para a eliminação das demais substâncias indesejáveis. O procedimento de extração e a definição da composição quali e quantitativa do extrato são rigorosamente controlados e padronizados ^{9,10}. O produto final fica submetido ao controle de qualidade e as metodologias analíticas empregadas devem assegurar que a composição final do extrato apresente 24% em conteúdo de flavonóides glicosídeos e 6% de terpenos ¹¹.

O extrato seco de *Ginkgo biloba* L. foi defini-

do primeiramente como uma mistura complexa de flavonóides glicosídeos e demais princípios ativos presentes nas folhas ¹². O estudo fitoquímico das folhas de *Ginkgo biloba* L. conduziu ao isolamento e à caracterização de terpenos e de bioflavonóides específicos da planta ^{13,14}. A Tabela 1 apresenta as classes químicas das substâncias encontradas no extrato de *Ginkgo biloba* L. e seus representantes ^{9,12,14}.

Em função do elevado conteúdo de flavonóides e demais princípios ativos presentes no extrato, a indicação terapêutica principal envolve a circulação cerebral periférica deficiente ^{15,16}. A mais relevante propriedade pela qual os flavonóides são amplamente reconhecidos é a proteção vascular, a capacidade de reduzir a permeabilidade e a fragilidade capilar. Outros efeitos biológicos relatados na literatura envolvem as atividades antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, antiinflamatória, antioxidante, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, anti-lergêncica, antiagregação plaquetária, antienvelhimento e anticelulítica, dentre outras ¹⁷⁻¹⁹. O extrato de *Ginkgo biloba* L. apresenta ação anti-radical livre significativa, promovendo a inativação do radical superóxido (O₂⁻) e posterior interrupção na cadeia de produção de radicais livres ²⁰. A ação antioxidante dos flavonóides ocorre por meio de sua capacidade de inibir a formação do radical superóxido e a atividade da xantina oxidase, explicando sua propriedade vasoprotetora. Os flavonóides presentes no extrato

Classe química	Componentes
Flavonol monoglicosídeo	Canferol-3-O-glicosídeo, Quercetina-3-O-glicosídeo, Isoamnetina-3-O-glicosídeo, Canferol-7-O-glicosídeo, Quercetina-3-O-amnosídeo, 3'-O-Metilmirecetina-3-O-glicosídeo.
Flavonol diglicosídeo	Canferol-3-O-rutinosídeo, Quercetina-3-O-rutinosídeo, Isoamnetina-3-O-rutinosídeo, 3'-O-Metilmirecetina-3-O-rutinosídeo, Siringetina-3-O-rutinosídeo.
Flavonol triglicosídeo	Canferol-3-O-[α-ramnosil-(1-2)-α-ramnosil-(1-6)-]β-glicosídeo, Quercetina-3-O-[α-ramnosil-(1-2)-α-ramnosil-(1-6)-]β-glicosídeo, Canferol-3-O-a-(6'''-p-coumaroiglicosil)-β-1,2-amnosídeo, Quercetina-3-O-a-(6'''-p-coumaroiglicosil)-β-1,2-ramnosídeo.
Flavonol aglicona	Canferol, Quercetina, Isoamnetina.
Bioflavonóide	Amentoflavona, Bilobetina, 5'-metoxibilometina, Ginkgetina, Isoginkgetina, Sciadopitisina.
Terpenos	Bilobalide, Ginkgolide A, Ginkgolide B, Ginkgolide C, Ginkgolide J.
Ácidos orgânicos	Acetato, Ácido shiquímico, 3-Metoxi-4-ácido hidroxibenzóico, 4-Ácido hidroxibenzóico, 3,4-Diidroxibenzóico, 6-Ácido hidroxiquinurênico, Ácido quinurênico, Ácido ascórbico .
Outros compostos	Prodelfinidinas/procianidinas.

Tabela 1. Classes químicas e componentes representantes presentes no extrato de *Ginkgo biloba* L.

removem o superóxido aderido às paredes dos vasos sanguíneos em áreas de trombose e protegem as prostaglandinas da deterioração pelo radical hidroxila e dos peróxidos lipídicos^{21,22}.

Este trabalho de pesquisa teve como objetivo padronizar e validar a metodologia analítica para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, no extrato seco de *Ginkgo biloba* L. e em formas farmacêuticas do tipo emulsão óleo-em-água (O/A) e gel hidrofílico. Envolveu a análise quali e quantitativa do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. isolado e também incorporado em formulações de uso tópico.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação dos flavonóides no extrato seco de *Ginkgo biloba* L.

A cromatografia de camada delgada (CCD) foi empregada para a identificação dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, presentes no extrato seco de *Ginkgo biloba* L., utilizando como fase estacionária a placa de sílica gel 60 F254 (20x20 cm) e, como fase móvel, tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (72:24:16, v/v/v). A distância percorrida foi padronizada em 10 cm, como revelador foi utilizada solução metanólica a 1,0% (v/v) de difenilboriloxietamina e a radiação ultravioleta a 366 nm.

Foram aplicadas na placa cromatográfica soluções de quercetina padrão de referência secundário (pureza = 89,365%, sem prévia purificação - Merck) e do extrato seco de *Ginkgo biloba* L., (Laboratório Centroflora), na concentração de 10 µg/mL em metanol P.A. Foram determinados os valores da relação entre a distância percorrida pela amostra e a da fase móvel (Rf) e avaliados comparativamente àqueles obtidos com padrão de referência secundário.

Linearidade

Para a verificação da linearidade, foi elaborada a curva analítica com a solução estoque de quercetina padrão de referência secundário (pureza = 89,365%) na concentração de 500,0 µg/mL em solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). A partir da solução estoque foram preparadas diluições nas concentrações de 2,68; 3,57; 4,47; 5,36; 6,26; 7,15; 8,04; 8,94; 9,83 e 10,72 µg/mL, que reagiram com 2,0 mL da solução de cloreto de alumínio 2% (p/v), completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Após 30 min de repouso, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 429 nm, utilizando como branco o solvente acrescido da solução de cloreto de alumínio. Elaborou-se a curva analítica, verificando-se a li-

nearidade do método, empregando a observação visual e análise estatística adequada, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear²³⁻²⁵.

Determinação dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina

Extrato seco de *Ginkgo biloba* L.

Foi preparada solução estoque do extrato seco de *G. biloba* L. (Laboratório Centroflora) a 1,0 mg/mL e, a partir desta, diluições no intervalo de concentrações de 80,0 a 320,0 µg/mL. Foi adotado o procedimento experimental descrito no item anterior para a elaboração da curva da resposta da absorbância em função da concentração (µg/mL) de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, utilizando a equação da reta proveniente da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário, sendo avaliada a linearidade.

Formulações cosméticas com extrato de *Ginkgo biloba* L.

Foram empregadas as formas farmacêuticas do tipo emulsão óleo-em-água (O/A) e gel hidrofílico como veículos para a incorporação do extrato de *Ginkgo biloba* L. a 0,3% p/p. A composição qualitativa da emulsão envolveu os componentes: álcool cetosteárilico e monoestearato de sorbitano etoxilado (Croda), metilparabeno (Galena), propilparabeno (Galena), ácido etilenodiaminotetracético (Galena), copolímero carboxivinílico (BF Goodrich), triacetato de gliceromacrogol-7 (Brasquim), trietanolamina (Oxiten), imidazolidinil uréia (Ionquímica), butil hidroxitolueno (Galena), polímero acrílico C10-30 e alquil acrilato (BF Goodrich), álcool cetosteárilico (Cognis), polímero de ciclometicone e dimeticone (Dow Corning), ciclometicone (Dow Corning) e água destilada. A formulação gel hidrofílico apresentou as seguintes matérias-primas: metilparabeno (Galena), propilparabeno (Galena), ácido etilenodiaminotetracético (Galena), copolímero carboxivinílico (BF Goodrich), triacetato de gliceromacrogol-7 (Brasquim), trietanolamina (Oxiten), éter PPG-1/PEG-9 lauril glicol (Cognis) e água destilada.

A quantificação dos flavonóides totais equivalentes em quercetina, nas formulações foi validada em concordância com as recomendações da Legislação Brasileira e as informações dos Compêndios Oficiais, a fim de assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade da metodologia analítica. Foram avaliadas a linearidade, a precisão e a exatidão/recuperação²⁴.

Precisão

A precisão foi verificada por meio da reprodutibilidade de resposta oferecida pelo método espectrofotométrico, avaliando-se a variabilidade entre as absorvâncias pelo desvio padrão relativo (DPR, %), expresso em porcentagem^{24,26}. Foram pesados cerca de 7,0 g das formulações acrescidas do extrato *Ginkgo biloba* L., transferidas para balões de 50 mL, homogenizadas em banho de ultrassom (Thorton T13) com q.s. de solvente. Procedeu-se à centrifugação (centrífuga Excelsa BABY, 208N) a 4.000 rpm, por 5 min. As alíquotas do sobrenadante (n = 10) reagiram com cloreto de alumínio a 2% (p/v) e a quantificação dos flavonóides totais equivalentes em quercetina, foi estimada por meio das absorvâncias obtidas e da equação da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário. Como branco foi utilizado o solvente acrescido da solução de cloreto de alumínio, preparado de forma similar à amostra.

Exatidão/Recuperação

Avaliado por meio da comparação entre a concentração de quercetina obtida das formulações contendo o extrato *Ginkgo biloba* L. e a teórica. Foi verificada também a recuperação da quercetina padrão de referência secundário.

Foram pesadas exatamente cerca de 6,0 g das formulações, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. As alíquotas das formulações acrescidas de quercetina padrão de referência secundário (n = 9) foram obtidas nas concentrações de 40,0; 100,0 e 180,0 µg/mL, compondo as concentrações mínima, intermediária e máxima, em concordância com a curva analítica.

A exatidão/recuperação foi calculada considerando a concentração teórica de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, considerando a equação da reta obtida pelo método dos quadrados mínimos por meio da curva analítica^{25,27}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos flavonóides no extrato seco de *Ginkgo biloba* L.

Os cromatogramas obtidos resultaram em Rf idênticos (iguais a 0,75) para a quercetina padrão de referência secundário e o extrato seco de *Ginkgo biloba* L., confirmando a identificação positiva do flavonóide quercetina.

Linearidade

A metodologia analítica apresentou linearidade

de de resposta no intervalo de concentrações 2,6 e 10,7 µg/mL de quercetina padrão de referência secundário. A equação da reta e o coeficiente de correlação linear foram obtidos pelo tratamento estatístico da regressão linear. A Equação 1 representa a equação da reta da curva analítica da quercetina padrão de referência secundário, onde y é absorvância e x é concentração de quercetina padrão de referência secundário:

$$y = 0,085 x - 0,0169 \quad (1)$$

$$r^2 = 0,9978$$

A partir da obtenção de uma reta para a curva analítica e do coeficiente de correlação linear (r^2) 0,9978, foi verificada a linearidade do método^{24,26,27}.

Quantificação dos flavonóides totais equivalentes em quercetina

Extrato de *Ginkgo biloba*

Na Tabela 2 verifica-se o resultado da quantificação de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, no extrato seco de *Ginkgo biloba* L. com valor médio de 37,04 µg/g.

Concentração do EGb (µg/mL)	Absorvância	CF (µg/g)
80,0	0,2495	39,13
120,0	0,3628	37,18
160,0	0,4901	37,23
200,0	0,5548	37,24
220,0	0,6588	36,09
240,0	0,7220	36,18
260,0	0,8040	37,10
280,0	0,8623	36,89
300,0	0,9186	36,64
320,0	0,9550	36,68
<i>Média = 37,04</i>		

Tabela 2. Quantificação espectrofotométrica dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, presentes no extrato seco de *Ginkgo biloba* L., a 429 nm. EGb: extrato de *Ginkgo biloba* L.; CF: concentração de flavonóides totais, equivalentes em quercetina.

Formulações com extrato de *Ginkgo biloba* L.

A partir dos resultados obtidos na validação do método analítico (Precisão e Exatidão/Recuperação) foi verificado que o procedimento de extração dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, presentes nas formulações cosméticas emulsão e gel atendeu às exigências da literatura^{24,25}.

Precisão

As Tabelas 3 e 4 informam os valores obtidos da precisão calculada por meio do desvio padrão relativo para a emulsão e o gel contendo o extrato seco de *Ginkgo biloba* L.

Em concordância com as informações da literatura o método espectrofotométrico aplicado na quantificação de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, foi validado. O desvio padrão relativo obtido não excedeu o valor limite de 5% (0,51% para a emulsão e 0,58% para o gel) em ambas as formulações em estudo, indicando dispersão reduzida das respostas espectrofotométricas (absorbâncias obtidas a 429 nm) para as alíquotas das amostras (n = 10) (24,27).

Exatidão/Recuperação de quercetina

Na construção das Tabelas 5 e 6 foi considerado o conteúdo de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, no extrato de *Ginkgo biloba* L. igual a 37,04 µg/g. Foram calculados os valores das concentrações de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, nas formas emulsão e gel empregando a equação da reta da curva analítica (Equação 1).

Os valores obtidos na exatidão/recuperação não excederam a ± 10%, representando exatidão próxima a 100% (valores médios de 104,4% para a emulsão e 106,4% para o gel), concordando com a literatura. O método espectrofotométrico empregado para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, nas formas emulsão e gel, foi validado quanto à exatidão, apresentando recuperação do padrão de quercetina nos intervalos de concentração utilizadas (24,25,27).

CONCLUSÕES

A metodologia analítica apresentada por Stahl & Schild²³, modificada para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em

Absorbância	CF (µg/mL)	Desvio padrão (µg/mL)	Desvio Padrão Relativo (%)
0,3850	83,94		
0,3801	82,91		
0,3842	83,77		
0,3882	84,60		
0,3864	84,23		
0,3855	83,94	0,432	0,51
0,3888	84,61		
0,3882	84,60		
0,3842	83,77		
0,3882	84,60		
<i>Média</i>	<i>83,89</i>		

Tabela 3. Precisão do método espectrofotométrico a 429 nm na avaliação da emulsão O/A, contendo 0,3% (p/p) do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. CF: concentração de flavonóides totais, equivalentes em quercetina.

Absorbância	CF (µg/mL)	Desvio padrão (µg/mL)	Desvio Padrão Relativo (%)
0,4188	90,71		
0,4187	90,68		
0,4180	90,54		
0,4187	90,68		
0,4166	90,27		
0,4180	90,54	0,529	0,58
0,4189	90,72		
0,4190	90,75		
0,4251	92,02		
0,4187	90,68		
<i>Média</i>	<i>90,02</i>		

Tabela 4. Precisão do método espectrofotométrico a 429 nm na avaliação do gel hidrofílico, contendo 0,3% (p/p) do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. CF: concentração de flavonóides totais, equivalentes em quercetina.

Cemul (µg/mL)	CE (µg/mL)	CP (µg/mL)	CT (µg/mL)	CR (µg/mL)	Exatidão (%)
72,08	2,67	1,42	4,09	4,32	105,6
72,14	2,67	3,57	6,24	6,48	103,8
72,03	2,67	6,43	9,10	9,44	103,7

Tabela 5. Determinação da concentração de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, na emulsão O/A adicionada do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. e quercetina padrão na avaliação da exatidão/recuperação do padrão do método espectrofotométrico. *CEmul*: concentração (µg/mL) do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. na emulsão O/A; *CE*: concentração (µg/mL) dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, no extrato seco de *Ginkgo biloba* L.; *CP*: concentração (µg/mL) de quercetina padrão de referência secundário; *CT*: concentração teórica (µg/mL) dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, considerando a quercetina padrão de referência secundário e o extrato seco de *Ginkgo biloba* L.; *CR*: concentração (µg/mL) de quercetina calculada na emulsão O/A.

CGel (µg/mL)	CE (µg/mL)	CP (µg/mL)	CT (µg/mL)	CR (µg/mL)	Exatidão (%)
73,55	2,72	1,42	4,14	4,50	108,7
71,91	2,66	3,57	6,23	5,82	107,1
70,43	2,61	6,43	9,04	8,57	103,3

Tabela 6. Determinação da concentração de flavonóides totais, equivalentes em quercetina, no gel hidrofílico adicionado do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. e quercetina padrão na avaliação da exatidão/recuperação do padrão do método espectrofotométrico. *CGel*: concentração (µg/mL) do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. no gel hidrofílico; *CE*: concentração (µg/mL) dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, presentes no extrato seco de *Ginkgo biloba* L.; *CP*: concentração (µg/mL) de quercetina padrão de referência secundário; *CT*: concentração teórica (µg/mL) dos flavonóides totais, equivalentes em quercetina, considerando a quercetina padrão de referência secundário e o extrato seco de *Ginkgo biloba* L.; *CR*: concentração (µg/mL) de quercetina calculada no gel hidrofílico.

quercetina, apresentou facilidade da realização além da vantagem de ser relativamente econômica e gerar resultados diretos em período de tempo reduzido. O procedimento foi adequado para a caracterização e a quantificação dos flavonóides totais presentes no extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba* L., equivalentes em quercetina, e nas formulações emulsão óleo-em-água (O/A) e gel hidrofílico, sendo a metodologia validada quanto a especificidade, linearidade, precisão e exatidão/recuperação do padrão.

Agradecimentos. CNPq e FipFarma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Michel, P.F. (1986) '*Ginkgo biloba*: L'Arbre Qui à Vaincu Le Temps Félin' Ed. John Libbey, Paris, págs. 71-6.
- Kloss, P. & H. Jaggy (1972) *Ger. Offen.* **117**: 429-47.
- Chang, M. & H. But (1987) '*Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*', Word Scientific Publ., Singapore, Vol.2, págs. 1096-101.
- Deng, G.S (1988) *Drug News Perspect.* **1**: 57-8.
- Nakanish, K (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 3546-7.
- Blagoveshchenskil, A.V. (1965) *Otol. Biol.* **13**: 7-13.
- Baby, A.R. (2005) 'Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais' Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), São Paulo, págs. 18-31.
- Defeudis, F.V. (1999) '*Ginkgo biloba* extract (EGB 761), from chemistry to the clinic' Editions Scientifiques Elsevier, Paris, págs. 4-15.
- Bruneton, J. (1991) '*Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*' Editorial Acribia, Zaragoza, págs. 171-2.
- Han, D.S. (1964) *Soul Uidae Chapchi, Korea* **5**: 281-90.
- Sticher, O. (1993) *J. Med. Plant Res.* **59**: 2-11.
- Beck, V., E. Bombardelli & F. Peterlongo (1998) *Fitoterapia* **69**: 197-230.
- Kimura, H. (1968) *Yakugaku Zasshi* **88**: 733-41.
- Kawamura, J. (1995) *J. Chem.* **3**: 89-108.
- Bussolino, F., G. Camussi, F. Turrini & P. Arese (1988) *J. Reserche. Prous* **1**: 245-59.
- Haguenauer, J.P., F. Cantenot, H. Koskas, & H. Pierart (1991) *Arq. Bras. Med.* **65**: 161-4.
- Walle, T. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **36**: 829-37.
- Di Carlo, G., N. Mascolo, A.A. Iizzo & F. Capasso (1999) *Life Sci.* **65**: 337-53.
- Harborne, J.B. & C.A. Williams (2000) *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Clostre, F. (1986) *Presse Med.* **15**: 1529-38.
- Watanabe, C. & M. Takahashi (1991) *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* **133**: 918-25.
- Marocci, L., L. Packer, L.M. Droy, A. Sekaki & A.M. Gardès (1994) *Enzymologia* **4**: 462-75.
- Stahl, E. & W. Schild (1991) '*Pharmazeutische Biologie 4. Drogenanalyse II. Inhaltsstoffe und Tsolierungen*' Verlag., Stuttgart, págs. 126-7.
- Brasil (2003) '*Resolução 899, 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*' (Ministério da Saúde) Diário Oficial da União, Brasília, págs. 1-23
- United States Pharmacopeia (2004) 27 ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, págs. 2622-25.
- Shabir, G.A. (2003) *J. Chromatogr. A* **987**: 57-66.
- Jenke, D.R. (1996) *J. Liq. Chromat. Related Technol.* **19**: 737-57.