

Validação de método espectrofotométrico para detecção de compostos fenólicos de *Spirulina sp.* LEB-18

Spectrophotometric method validation for detection of phenolic compounds of *Spirulina sp.* LEB-18

Anelise Christ-Ribeiro

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS
anelise.christ@hotmail.com

Pâmela Goularte

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS
engpami@yahoo.com.br

Leonor Almeida de Souza-Soares

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS
leonor.souza-soares@gmail.com

Resumo: O uso de bioativos provenientes de fontes naturais requer a extração e purificação destes compostos para aplicação em aditivos e ingredientes alimentares, farmacêuticos e cosméticos. Este trabalho teve por objetivo validar a quantificação de compostos fenólicos a partir da microalga *Spirulina sp.* LEB-18. A validação da metodologia seguiu o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e International Conference on Harmonisation (ICH), sendo avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. O método apresentou coeficiente de correlação de 0,9978, confirmando a linearidade do método. Nas análises de precisão intermediária para amostras desengorduradas não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre analistas e o desvio padrão relativo não ultrapassou de 2%, assim como na análise de reprodutibilidade de amostras *in natura* integral e desengordurada. Na análise de exatidão observou-se boa recuperação, dentro da faixa de 80 a 120%. A validação da metodologia analítica demonstrou-se apropriada para determinar a concentração de compostos fenólicos em extratos de *Spirulina sp.* LEB-18.

Palavras-chave: compostos fenólicos; linearidade; microalga; validação analítica.

Abstract: The use of bioactive compounds in the preparation of food additives and ingredients as well as pharmaceuticals and cosmetics, requires the extraction and purification of these compounds from natural sources. This study aimed to validate the quantification of phenolic compounds in *Spirulina sp.* LEB-18 samples. The validation of the methodology followed INMETRO and ICH, and evaluated the specific parameters, linearity, ruggedness, detection limit, quantification limit, precision and accuracy. The method presented correlation coefficient of 0.9978, confirming the linearity of the method. In the intermediate precision analysis to degreased samples there was no significant difference ($p < 0,05$) between analysts and the relative standard deviation did not exceed 2%, as well as the reproducibility of analysis of samples *in natura* full and degreased. For accurate analysis good recovery was

observed within the range of 80 to 120%. Validation of analytical methodology proved to be suitable for determining the concentration of phenolic compounds in extracts from *Spirulina sp.* LEB-18.

Key words: phenolic compounds, linearity, microalgae, analytical validation.

1 Introdução

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa, que, possui como metabolismo principal a fotossíntese onde a fonte principal de energia é a luz solar. A *Spirulina* é constituída de altos teores de proteínas (64-74%), ácidos graxos poli-insaturados e vitaminas além de propriedades antioxidantes e antimutagênicas, devido à presença de compostos fenólicos, favorecendo o seu uso como alimento funcional [1, 2].

Compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático, com um ou mais grupos substituintes hidroxílicos, incluindo seus derivados funcionais (ésteres, metil ésteres, glicosídeos, dentre outros). A natureza dos polifenóis varia a partir de simples moléculas como os ácidos fenólicos, até as altamente polimerizadas como os taninos. Estudos sobre compostos bioativos extraídos de microalgas têm enfatizado e demonstrado a sua atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e propriedades de inibição enzimática entre outras [3, 4, 1]. Estas características têm despertado interesse no uso terapêuticos das microalgas, para cura ou prevenção de doenças crônicas tais como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia e outras [5]. Dentre as microalgas, destaca-se a *Spirulina*, classificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) emitido pelo Food and Drug Administration (FDA) [6].

A extração e purificação de fitoquímicos a partir de fontes naturais são necessárias, uma vez que estes bioativos são muitas vezes utilizados na preparação de suplementos dietéticos, nutracêuticos, ingredientes para alimentos funcionais, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e cosméticos [7]. Por isso, é essencial a validação de uma metodologia específica, robusta, sensível, precisa e exata para a detecção de compostos fenólicos da microalga *Spirulina sp.* LEB-18, constituindo-se de fundamental importância para o controle de qualidade dos produtos, e sendo parte das normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle [8, 9]. A Resolução Específica (R.E.) nº 899, de 29 de maio de 2003, “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” da ANVISA [10], determina que para validar uma metodologia faz-se necessário avaliar os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Apesar das vantagens indiscutíveis na utilização da técnica cromatográfica CLAE, esta apresenta algumas limitações como o alto custo da instrumentação e da operação, tempo relativamente longo de análise e ainda a necessidade de experiência no manuseio do equipamento e tratamento de amostras [11].

O objetivo deste trabalho foi validar a quantificação de compostos fenólicos em amostras de microalga *Spirulina sp.* LEB-18 seguindo normas do INMETRO e ICH.

2 Desenvolvimento

2.1 Materiais

A microalga *Spirulina sp.* LEB-18 foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Amostras *in natura* integrais e desengorduradas pelo método de Soxhlet utilizando éter de petróleo [12] foram utilizadas.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Ciência de Alimentos e de Engenharia Bioquímica da FURG. Como padrão para quantificação dos compostos fenólicos, foi utilizado o ácido gálico (Merck), com grau de pureza de 99% em espectrofotômetro UV-Vis marca Varian, modelo Cary 100.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos da biomassa *Spirulina sp.* LEB-18 foram extraídos a frio com metanol, na proporção de 1:5 (p/v) a 25°C durante 60 minutos, sob agitação orbital (Tecnal, TE-141) a 160 rpm, com uma interrupção de 15 minutos e agitação novamente por mais 60 min, com a adição do solvente (10 mL), seguida por partição com hexano. As soluções metanólicas foram secas em rotaevaporador (Quimis®, Q-344B2) e o resíduo foi dissolvido em água destilada. O extrato foi clarificado com 5 mL de hidróxido de bário 0,1 mol/L e 5 mL de sulfato de zinco a 5%, deixado em repouso por 20 minutos, centrifugado a 3220g por 15 minutos, filtrado e avolumado com água destilada em balão volumétrico. O conteúdo fenólico livre foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, que consiste na oxidação dos fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W devido à solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoli-ácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos [13], permitindo a determinação da concentração por espectrofotometria (Varian, Cary 100) no comprimento de onda 750 nm, utilizando uma curva padrão de ácido gálico (2,5 a 22,5 $\mu\text{g/mL}$) [14].

2.3 Parâmetros de validação

2.3.1 Faixa de trabalho e linearidade

A linearidade do método foi verificada através da leitura em espectrofotômetro (750nm) a partir de uma curva padrão de ácido gálico cujas concentrações variaram de 2,5 a 22,5 $\mu\text{g/mL}$. Através dos valores de absorvância obtidos, construiu-se um gráfico de concentração versus absorvância utilizando-se como critério de aceitação um coeficiente de correlação (R) maior que 0,90 de acordo com o INMETRO [15] e maior ou igual a 0,99 de acordo com a ANVISA [10]. Com os dados da curva de calibração, calculou-se o coeficiente angular da reta e o seu ponto de intersecção no eixo y, conforme Equação 1.

$$y = ax + b, \quad (1)$$

sendo y \equiv resposta média, x \equiv concentração, a \equiv inclinação da curva de calibração (sensibilidade) e b \equiv interceptação com o eixo y.

2.3.2 Sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A sensibilidade foi determinada simultaneamente ao teste de linearidade e expressa pelo coeficiente angular da curva de calibração, sendo dependente da natureza do analito e da técnica de detecção [16] e calculada de acordo com a Equação 2.

$$S = \frac{dy}{dx}, \quad (2)$$

sendo $S \equiv$ sensibilidade, $dx \equiv$ variação da resposta e $dy \equiv$ variação da concentração.

O LD foi calculado pela soma das médias dos brancos (9 repetições) mais três vezes o desvio padrão dividido pela sensibilidade do método conforme Equação 3 [17].

$$LD = \frac{\bar{x} + 3s}{S}, \quad (3)$$

sendo $\bar{x} \equiv$ média dos valores dos brancos e $s \equiv$ desvio padrão dos brancos.

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como o padrão de calibração da curva analítica de menor concentração (excluindo o branco) medido de forma quantitativa com nível aceitável de precisão e exatidão conforme Equação 4, foram analisados 10 brancos e calculados a média e o desvio padrão [17].

$$LQ = \frac{\bar{x} + 10s}{S}, \quad (4)$$

2.3.3 Precisão

Este parâmetro foi medido a partir da repetitividade dos resultados, utilizando a curva da faixa de trabalho. A precisão da metodologia foi expressa em termos de desvio padrão relativo [18]. Neste estudo, a precisão na validação de métodos foi considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

2.3.3.1 Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em um curto tempo. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio [19, 20] ou intra-corrida [10] e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo.

2.3.3.2 Precisão intermediária

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores [21]. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo.

2.3.3.3 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, sob diferentes condições [15]. A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre diferentes laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos. Comumente são observadas variações entre os resultados. Por isso, dados originários de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método. Estudos colaborativos são indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, e também podem ser importantes para testar a exatidão do método [22].

2.3.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza [23]. Para a avaliação da exatidão da metodologia, foi calculada a adição de padrão (ácido gálico) do analito em amostras fortificadas: amostras de *Spirulina sp.* LEB-18 foram adicionadas de material de referência certificado em 3 diferentes concentrações (70, 140 e 210 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico). As análises foram realizadas em triplicata e calculadas de acordo com a Equação 5 [24].

$$E = \left(\frac{cm}{cr} \right) \times 100, \quad (5)$$

sendo $E \equiv$ exatidão, $cm \equiv$ concentração média detectada e $cr \equiv$ concentração real certificada.

2.3.5 Robustez

Para avaliar a robustez, o método variou 2 amostras e uma etapa de clarificação da extração de compostos fenólicos. Primeiramente foram utilizados 2 tipos de amostras (in natura e desengordurada) onde a gordura retirada da amostra desengordurada correspondeu em média 2,13% de lipídeos. A segunda mudança foi à remoção da etapa de lavagem com hexano.

2.4 Análise estatística

A análise estatística de repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade, exatidão e robustez foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA® versão 7.0 [26] com a aplicação da Análise de Variância ANOVA e Teste de Tukey.

3 Resultados

3.1 Linearidade

Os resultados da linearidade estão indicados na Figura 1. O método demonstrou boa linearidade, 0,9978, sendo que, segundo a ANVISA e o INMETRO, as soluções preparadas apresentaram leituras de absorção diretamente proporcionais à concentração do analito, confirmando a linearidade do método. A equação da reta obtida foi $y = 0,0233x + 0,0018$.

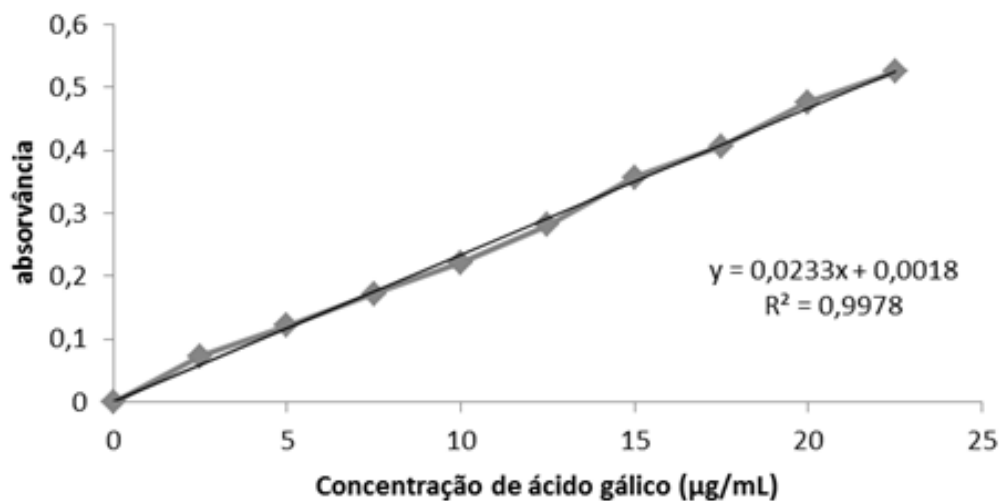


Figura 1. Linearidade para o método de quantificação de compostos fenólicos.

Os resultados da linearidade da metodologia na faixa de trabalho dependem da sensibilidade do equipamento utilizado, complexidade do método, reagentes utilizados, extração do analito, condições do equipamento e do meio ambiente, além da habilidade do analista [27]. O método demonstrou boa linearidade, $R = 0,9978$, sendo que, segundo a ANVISA e o INMETRO, as soluções preparadas apresentaram leituras de absorção diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico, confirmando a linearidade do método. A equação da reta obtida foi $y = 0,0233x + 0,0018$.

3.2 Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade da metodologia foi calculada utilizando-se o coeficiente angular do gráfico analítico correspondente a 0,0018. A média ($n = 9$) dos valores do branco foi quantificada em 0,10179 de absorvância da solução de mistura x (Na_2CO_3 , $CuSO_4$, $KNaC_4H_4O_6$) e *Folin-ciocalteau*, apresentando desvio padrão de $\pm 0,000012$. A menor concentração do analito de interesse que pôde ser detectada pela técnica instrumental, isto é, limite de detecção, observado para o método foi de $71 \mu g/mL$ de amostra. A mais baixa concentração que pôde ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método durante as operações, isto é, limite de quantificação, observado foi de $106 \mu g/mL$ de amostra.

3.3 Precisão

Para a validação da metodologia em questão, somente os parâmetros de repetitividade (concordância entre os resultados com o mesmo analista e mesma instrumentação), precisão intermediária (concordância entre os resultados de um mesmo laboratório em dias diferentes com analistas diferentes e equipamentos iguais), e reprodutibilidade (concordância entre os resultados de laboratórios diferentes com analistas diferentes e equipamentos diferentes) foram avaliados. Para avaliação da repetitividade foram realizados 6 experimentos da amostra *in natura* em triplicatas para avaliação da repetitividade e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. *Repetitividade dos dados para amostras in natura*

Replicatas	<i>in natura</i> (mg/g de Spirulina)
1	1,31 ^a ± 0,02
2	1,39 ^a ± 0,02
3	1,39 ^a ± 0,03
4	1,32 ^a ± 0,01
5	1,38 ^a ± 0,01
6	1,31 ^a ± 0,01

Letras minúsculas e idênticas indicam que não há diferença significativa entre as amostras.

Pode-se notar que os resultados de desvio padrão foram aceitáveis, pois apresentaram valores menores que 2% de desvio padrão mostrando que as médias não diferem significativamente entre si, esse resultado é confirmado também pela análise estatística aplicada. As análises de precisão intermediária foram realizadas e as médias e desvio padrão estão explicitados na Tabela 2.

Tabela 2. *Precisão intermediária para amostras desengorduradas*

Amostras	Analista 1 (mg/g de Spirulina)	Analista 2 (mg/g de Spirulina)
Desengordurado 1	1,56 ^a ± 0,04	1,49 ^a ± 0,06
Desengordurado 2	1,50 ^a ± 0,05	1,49 ^a ± 0,07
Desengordurado 3	1,50 ^a ± 0,03	1,55 ^a ± 0,04

Letras minúsculas e idênticas indicam que não há diferença significativa entre as amostras.

Analisando os dados da Tabela 2 pode-se observar que há compatibilidade dos dados como a análise estatística demonstra que não há diferença significativa entre os analistas e o desvio padrão das análises não ultrapassou de 2%. As análises de reprodutibilidade foram realizadas em laboratórios distintos e os resultados foram quantificados e calculados de acordo com as curvas calculadas para cada espectro como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. *Reprodutibilidade de amostras in natura e desengorduradas de Spirulina.*

Amostras	(mg/g de Spirulina)
<i>In natura</i> 1 LEB	1,276 ^a ± 1,0
<i>In natura</i> 1 LAB	1,313 ^a ± 1,1
Desengordurado 1 LEB	1,274 ^a ± 0,8
Desengordurado 1 LAB	1,360 ^a ± 0,7
<i>In natura</i> 2 LEB	1,340 ^a ± 1,0
<i>In natura</i> 2 LAB	1,396 ^a ± 1,0
Desengordurado 2 LEB	1,248 ^a ± 0,5
Desengordurado 2 LAB	1,322 ^a ± 0,3
<i>In natura</i> 3 LEB	1,274 ^a ± 0,6
<i>In natura</i> 3 LAB	1,304 ^a ± 0,6
Desengordurado 3 LEB	1,253 ^a ± 0,2
Desengordurado 3 LAB	1,424 ^a ± 0,3

Letras minúsculas e idênticas indicam que não há diferença significativa entre as amostras. LEB e LAB – Laboratórios 1 e 2 respectivamente, onde foram realizadas algumas análises.

De acordo com a Tabela 3, a análise estatística aplicada e o desvio padrão observa-se que todas as análises não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) indicando que o método é preciso. De acordo com Filho *et al.* [28] no desenvolvimento e validação do método para dosagem de alfacaroteno e betacaroteno em *Spirulina platensis* (CLAE – DAD), o método mostrou-se linear ($R = 0,9937$) e exato e na exatidão/recuperação foi obtida uma recuperação acima de 95%. Estes resultados evidenciam compatibilidade com este estudo, apesar da utilização de equipamentos diferentes, as metodologias apresentam ótimos resultados dos parâmetros de validação.

3.4 Exatidão

Para a análise de exatidão foi realizado o teste de adição de padrão, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Adição de padrão em extratos fenólicos de *Spirulina sp.* LEB-18

Resultado real	Resultado obtido	Recuperação(%)
1,362	1,42	104
1,395	1,41	101
1,293	1,39	107

Analisando a Tabela 4 pode-se observar que foi obtida uma boa recuperação, pois de acordo com a FDA [29] os limites para recuperação do analito devem estar entre 80 a 120%.

Rabelo, Paula e Bara [30] validaram o método espectrofotométrico para determinação do teor de fenóis totais da *Trichillia. catigua A. Juss (Meliaceae)* e comprovaram que este é seletivo, linear, preciso, exato e robusto, apresentado resultados de 95% de exatidão o que é coerente com o trabalho estudado. Portanto, esse método representa uma possibilidade para a determinação e quantificação destes compostos uma vez que apresenta confiabilidade requerida para um método analítico, além de simples, rápido e de baixo custo.

3.5 Robustez

De acordo com a metodologia e as modificações citadas no trabalho correspondente a robustez, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Robustez dos métodos de extração dos compostos fenólicos

Amostras	(mg/g de <i>Spirulina</i>)
<i>In natura</i> com hexano	$1,36^c \pm 0,02$
Desengordurado com hexano	$1,36^c \pm 0,03$
<i>In natura</i> sem hexano	$1,48^b \pm 0,05$
Desengordurado sem hexano	$1,70^a \pm 0,05$

Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença entre os métodos ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 5 observa-se que há diferença significativa entre as modificações do método aplicado, onde a maior extração dos compostos fenólicos obtida foi a partir de uma amostra natural sem a etapa de clarificação com hexano. A robustez avaliada por Marques *et al.* [31] foi testada preliminarmente na avaliação de procedimentos para quantificação

espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata link*, através da avaliação de 3 parâmetros (influência da luminosidade, estabilidade da solução extrativa e fabricante do solvente) cujo os dados mostraram que ambos os procedimentos mostraram robustos quanto aos parâmetros analisados.

4 Conclusão

A validação da metodologia analítica demonstrou-se apropriada para a finalidade pretendida, pois pode ser considerada linear, precisa e exata. Dentro do intervalo estudado, a metodologia demonstrou ser reprodutível e representativa. Além disso, trata-se de uma metodologia simples, envolvendo poucas etapas de preparação de amostras e reagentes e pouco dispendiosa, sendo adequada para determinar a concentração de compostos fenólicos em extratos a partir de *Spirulina sp.* LEB-18.

Referências

- [1] SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.
- [2] TANTAWY, S. T.A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 9, n. 1, p. 663-666, 2011.
- [3] COLLA, L. M.; BADIALE-FURLONG, E.; COSTA, J.A.V. Antioxidant Properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- [4] HAJIMAHMOODI, M.; FARAMARZI, M. A.; MOHAMMADI, N.; SOLTANI, N.; OVEISI, M. R.; NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal Applied Phycology*, v. 22, p.43-50, 2010.
- [5] BELAY, A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *Journal American Nutraceutical Association*, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.
- [6] FDA - Food and Drug Administration. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127 CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153944.html>
- [7] VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 19, n. 46, p. 4113-4117, 1998.
- [8] PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Quim. Nova*, v.19, n.3, p.268- 277, 1996.

- [9] BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim. Nova*, v.25, n.5, p.856- 865, 2002.
- [10] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- [11] SIQUEIRA-MOURA, M. P. DE; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 44, n. 4, p. 621-628, 2008.
- [12] Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Association of Official Analytical chemists, Arlington, VA, 1990.
- [13] NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M. de; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Braz. J. Food Technol.*, VII BMCFB,p.107-110, junho 2009.
- [14] SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 68, n. 2., p. 92-200, 2009.
- [15] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, 2ª ed., 2000.
- [16] TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory, II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 535-550, 2004.
- [17] FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. *Analytica Chimica Acta*, n. 391, p. 239-252, 1998.
- [18] MOHAMED, F. A.; MOHAMED, H. A.; HUSSEIN, S. A.; AHMED, S. A. A validated spectrofluorimetric method for determination of some psychoactive drugs. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 1-2, p. 139-146, 2005.
- [19] GREEN, J. M.; *Anal. Chem.* 1996, 68, A305.
- [20] SHABIR, G.A., Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the U.S. Food and Drug Administration, the U.S. Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, v. 987 n. 1-2, p. 57-66, 2003.
- [21] International Conference on Harmonisation; Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- [22] VIAL, J.; JARDY, A.; Interlaboratory studies: The best way to estimate the characteristics of dispersion of an HPLC method and a powerful tool for analytical transfers. *Chromatographia*, v. 53, p. S141-S148, 2001.

- [23] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.
- [24] GARBELOTTI, M. L.; TORRES, E. A. F. S.; MARSIGLIA, D. A. P. Determination and validation of dietary fiber in food by the enzymatic gravimetric method. *Food Chemistry*, v. 83, p. 469-473, 2003.
- [25] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- [26] STATSOFT, INC. Programa computacional Statistica 7.0. E.A.U. 2004.
- [27] BURIN, R.; BURIN, V. M.; TAHA, P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Validação de uma metodologia analítica para determinação de cálcio em produtos cárneos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4): 973-978, out.-dez. 2008.
- [28] FILHO, J. T. P.; SILVA, A. L. DA.; FILHO, E. A. DOS S.; PINHEIRO, F.; VIANA, G. S. DE B.; LEAL, L. K. A. M. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle de qualidade da microalga spirulina platensis por clae – dad: dosagem de alfacaroteno(ac) e betacaroteno(bc). XXIX Encontro de Iniciação Científica. 2010.
- [29] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Ora Laboratory Procedure. Methods, method verification. Rockville, 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/FieldScience/ucm171877.html>.
- [30] RABELO, D.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Quantificação de fenóis totais presentes nas cascas de *Trichillia catigua* A. Juss (Meliaceae). *Rev. bras. plantas med.* vol.15, n.2, 2013.
- [31] MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M. M.; LEÃO, W. DE F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. DE L. Avaliação de procedimentos para espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* link. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 3, 517-522, 2012.