



**Tatiane Vidal Dias Gomes**

**Desenvolvimento e validação intralaboratorial do método  
por cromatografia eletrocínética capilar micelar para  
determinação de vitamina K1 e K3 em chá verde e em  
suplementos farmacêuticos.**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio.

Orientadores: Prof. Elisabeth Costa Monteiro  
Dra. Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha  
Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro, março de 2012



## **Tatiane Vidal Dias Gomes**

### **Desenvolvimento e validação intralaboratorial do método por cromatografia eletrocínética capilar micelar para determinação de vitamina K1 e K3 em chá verde e em suplementos farmacêuticos.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora e homologada pela Coordenação Setorial de Pós-Graduação, formalizado pelas respectivas assinaturas.

#### **Comissão Examinadora:**

**Prof. Dra. Elisabeth Costa Monteiro**

Orientadora

Programa de Pós-Graduação em Metrologia (PósMQI/PUC-Rio)

**Dra. Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha**

Co-Orientadora

Departamento de Química

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

**Prof. Dr. Ricardo Queiroz Aucélio**

Co-Orientador

Departamento de Química

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

**Prof. Dr. José Marcus de Oliveira Godoy**

Departamento de Química

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

**Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes**

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

**Prof. Dr. Maurício Nogueira Frota**

Programa de Pós-Graduação em Metrologia (PósMQI/PUC-Rio)

#### **Coordenação Setorial de Pós-Graduação:**

**Prof. José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial de Pós-Graduação do

Centro Técnico Científico (PUC-Rio)

Rio de Janeiro, 21 de março de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

### **Tatiane Vidal Dias Gomes**

Graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (2008). Especialista em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (2010). Possui licenciatura plena em Química pela Universidade Candido Mendes (2010).

### Ficha Catalográfica

Gomes, Tatiane Vidal Dias

Desenvolvimento e validação intralaboratorial do método por cromatografia eletrocinética capilar micelar para determinação de vitamina K1 e K3 em chá verde e em suplementos farmacêuticos / Tatiane Vidal Dias Gomes ; orientadores: Elisabeth Costa Monteiro, Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha, Ricardo Queiroz Aucélio. – 2012.

167 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Metrologia para a Qualidade e Inovação, 2012.

Inclui bibliografia

1. Metrologia – Teses. 2. Vitaminas K1 e K3. 3. Cromatografia eletrocinética capilar micelar. 4. Confiabilidade metrológica. 5. Validação de métodos analíticos. 6. Incerteza de medição. I. Monteiro, Elisabeth Costa. II. Cunha, Alessandra Licursi Maia Cerqueira da. III. Aucélio, Ricardo Queiroz. IV. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Metrologia para a Qualidade e Inovação. V. Título.

CDD: 389.1

“Para alcançar o conhecimento, acrescente coisas todos os dias.  
Para alcançar a sabedoria, remova coisas todos os dias.” **(Lao Tse)**.

A Deus, por estar sempre ao meu lado iluminando o meu caminho, por conceder a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos mudar; coragem para mudar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir uma das outras.

Aos meus pais, Augusto e Sandra, pois de vocês recebi o dom mais precioso a Vida. Já por isso sou infinitamente grata.

Ao Wilson pelo amor e incentivo em todos os momentos da minha vida.

## **Agradecimentos**

A Deus, por sempre iluminar meus pensamentos e guardar meu caminho.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram. Aos meus pais, Augusto Gomes e Sandra Teixeira, pelo carinho, incentivo e compreensão. Aos meus irmãos Elaine e Augusto por sempre torcerem por mim.

Eu agradeço ao Wilson Pinheiro, por sua extensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio.

A meus orientadores, Professora Elisabeth Costa, Alessandra Licursi e Professor Ricardo Aucélio por todo empenho, sabedoria e compreensão.

Ao coordenador do PósMQI da PUC-Rio, Professor Maurício Frota pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Às secretárias do PósMQI da PUC-Rio, Márcia Ribeiro e Paula Guimarães pelo apoio e esclarecimentos.

Aos amigos do LEEA, pelo apoio e colaboração.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Ao CNPQ pela bolsa de estudo fornecida.

A FAPERJ, CNPq, FINEP e Petrobrás pelo financiamento da infraestrutura laboratorial do LEEA.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

## Resumo

Gomes, Tatiane Vidal Dias; Costa Monteiro, Elisabeth; Cunha, Alessandra Licursi M. C.; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento e validação intralaboratorial do método por cromatografia eletrocinética capilar micelar para determinação de vitamina K1 e K3 em chá verde e em suplementos farmacêuticos**. Rio de Janeiro, 2012. 167p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de vitamina K é de fundamental importância considerando a crescente preocupação mundial com questões referentes à qualidade de vida, nutrição, saúde e meio ambiente, além da importância deste micronutriente na saúde. Desenvolveu-se um método baseado na cromatografia eletrocinética capilar micelar (MEKC) para a determinação das vitaminas K1 e K3. As condições ótimas de análise por MEKC foram obtidas a partir de estudo univariado de parâmetros experimentais e instrumentais (tampão borato 3,1 g.L<sup>-1</sup>, pH= 8,5; CTAB 18,2 g.L<sup>-1</sup>; acetonitrila 20% v/v, 25 °C, 30 kV, T= 15 s). Realizou-se um estudo com uma cela de caminho óptico alongado de modo a melhorar o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do método. As curvas analíticas de ambas as vitaminas apresentaram comportamento linear e homoscedástico com valores de r próximos a 0,99. Os valores de LOD e de LOQ para a vitamina K1 e para a vitamina K3 ficaram na ordem de 10<sup>-5</sup> g.L<sup>-1</sup> e 10<sup>-4</sup> g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A precisão do método apresentou valores entre 2 e 7% para a área dos picos. As recuperações obtidas para a vitamina K1 foram de 101 ± 2% e 103 ± 2% para as amostras de suplemento vitamínico e chá verde, respectivamente. Para a vitamina K3, a recuperação obtida foi de 99 ± 3% para a amostra de chá. Testes comparativos realizados entre o método proposto por MEKC e o método de referência baseado em HPLC demonstraram uma boa exatidão ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ). A incerteza associada ao método desenvolvido apresentou valores entre 2 e 30%, sendo as fontes mais relevantes aquelas associadas à construção da curva analítica e ao preparo das soluções. O método analítico desenvolvido pode contribuir para a realização de medições confiáveis e sensíveis de diferentes formas de vitamina K.

## Palavras-chave

Metrologia; Vitaminas K1 e K3; Cromatografia eletrocinética capilar micelar; Confiabilidade metrológica; Validação de métodos analíticos; Incerteza de medição.

## Abstract

Gomes, Tatiane Vidal Dias; Costa Monteiro, Elisabeth (Advisor); Cunha, Alessandra Licursi M. C.; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Development and intralaboratory validation of the method by capillary micellar electrokinetic chromatography for the determination of vitamin K1 and K3 in green tea and pharmaceutical supplements.** Rio de Janeiro, 2012. 167p. MSc. Dissertation - Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The development and validation of an analytical method for determination of vitamin K is of paramount importance considering the growing worldwide concern with questions regarding the quality of life, nutrition, health and environment and the importance of this micronutrient in health. It is developed a method based on capillary micellar electrokinetic chromatography (MEKC) for the determination of vitamin K1 and K3. The optimal condition for analysis by MEKC were obtained by means of experimental and instrumental univariate study (borate buffer  $3.1 \text{ gL}^{-1}$ , pH = 8.5; CTAB  $18.2 \text{ gL}^{-1}$ , 20% acetonitrile v/v  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 kV, T = 15 s). A study with a longer optical path-length capillary cell was performed to improve the detection limit (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of the method. Analytical curves of both vitamins presented linear and homoscedastic behavior, with r values near 0.99. The values of LOD and LOQ for vitamin K1 and vitamin K3 were on the order of  $10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$  and  $10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ , respectively. The precision of the method was between 2 and 7% for the peak area. Recoveries for vitamin K1 were  $101 \pm 2\%$  and  $103 \pm 2\%$  for samples of vitamin supplement and green tea, respectively. For vitamin K3, recovery obtained was  $99 \pm 3\%$  for the sample tea. Comparative tests performed among the proposed method by MEKC and the reference method based on HPLC showed good accuracy ( $t_{\text{calculated}} < t_{\text{tabulated}}$ ). The measurement uncertainty associated with the method developed showed values between 2 and 30%, and the relevant sources were those associated with the analytical curve and the preparation of solutions. The developed analytical method can contribute to achieve sensitive and reliable measurements of different forms of vitamin K.

## Keywords

Metrology; Vitamins K1 and K3; Capillary micellar electrokinetic chromatography; Metrological reliability; Validation of analytical methods; Measurement uncertainty.

# Sumário

1	Introdução	20
1.1.	Objetivos geral e específico	24
1.2.	Estrutura da dissertação	25
2	Vitaminas e Métodos de Determinação	26
2.1.	Vitaminas	26
2.1.1.	Classificação	26
2.1.2.	Propriedades	27
2.1.3.	Vitamina K	28
2.1.3.1.	Ocorrência	30
2.1.3.2.	Absorção, transporte e metabolismo de vitamina K	31
2.1.3.3.	Função	32
2.1.3.4.	Deficiência de vitamina K	34
2.1.3.5.	Toxicidade	35
2.2.	Métodos de determinação de vitaminas	36
2.2.1.	Bioensaios	36
2.2.2.	Métodos físico-químicos	37
3	Eletroforese Capilar	45
3.1.	Conceitos básicos	45
3.1.1.	Fluxo eletrosmótico	47
3.2.	Instrumentação	49
3.3.	Injeção hidrodinâmica de amostra	50
3.4.	Concentração da amostra no capilar	51
3.5.	Sistemas de detecção	53
3.6.	Modos de separação em eletroforese capilar	54
3.6.1.	Cromatografia eletrocinética capilar micelar	55
3.6.1.1.	Micelas	56
3.6.1.2.	Migração em MEKC	57
3.6.1.3.	Resolução: eficiência, seletividade e fator de retenção	59
3.6.1.4.	Parâmetros experimentais para otimização da resolução	62
4	Confiabilidade Metrológica na Determinação de Vitamina K	65
4.1.	Estrutura da Metrologia	66

4.1.1. Contexto Internacional	67
4.1.1.1. BIPM	67
4.1.1.2. OIML	70
4.1.1.3. ILAC	70
4.1.1.4. WHO	71
4.1.1.5. IUPAC	72
4.1.1.6. IFCC	73
4.1.1.7. CITAC	73
4.1.1.8. ISO e IEC	73
4.1.2. Contexto Regional	75
4.1.2.1. Comunidade Européia	75
4.1.2.2. EURACHEM	76
4.1.3. Contexto Nacional	77
4.1.3.1. Inmetro	77
4.1.3.2. Anvisa	79
4.1.3.3. ABNT	81
4.2. Validação de Método Analítico e Incerteza de Medição	82
4.2.1. Validação de método analítico	82
4.2.1.1. Seletividade e Especificidade	83
4.2.1.2. Linearidade	84
4.2.1.3. Faixa de trabalho e faixa linear	84
4.2.1.4. Limite de detecção	85
4.2.1.5. Limite de quantificação	85
4.2.1.6. Tendência/Recuperação	86
4.2.1.6.1. Precisão	86
4.2.1.6.1.1. Repetitividade	87
4.2.1.6.1.2. Precisão intermediária	87
4.2.1.6.1.3. Reprodutibilidade	87
4.2.1.6.1.4. Comparação da precisão entre métodos	87
4.2.1.6.2. Robustez	88
4.2.2. Incerteza de Medição	88
5 Instrumentação, materiais, reagentes e métodos	93
5.1. Instrumentação	93
5.2. Materiais e reagentes	94
5.3. Métodos	95
5.3.1. Cuidados ao manipular o analito	95

5.3.2. Preparo das soluções de referência para vitaminas K e do eletrólito de corrida	95
5.3.3. Extração e preparo das amostras	96
5.3.4. Limpeza do material	97
5.3.5. Medições Eletroforéticas	97
5.3.6. Validação do método analítico e estimativa da incerteza de medição	100
6 Resultados e Discussão	101
6.1. Desenvolvimento do método analítico por cromatografia eletrocínética capilar micelar	101
6.1.1. Testes de solubilidade	101
6.1.2. Composição do eletrólito e condições preliminares de análise	102
6.1.3. Otimização de parâmetros críticos para separação eletroforética	104
6.1.3.1. Parâmetros experimentais	104
6.1.3.2. Parâmetros instrumentais	105
6.1.3.3. Condições de condicionamento, pré-condicionamento e limpeza do capilar	109
6.1.3.4. Tempo de migração, simetria e resolução dos picos	110
6.2. Validação do método desenvolvido	110
6.2.1. Parâmetros da validação do método analítico	111
6.2.1.1. Seletividade	111
6.2.1.2. Linearidade da resposta analítica	113
6.2.1.3. Limite de detecção e de quantificação	123
6.2.1.4. Exatidão	125
6.2.1.5. Precisão	127
6.3. Incerteza de Medição	130
7 Conclusão	136
Referências bibliográficas	138
Anexos	156

## Lista de Figuras

Figura 1: Fórmulas estruturais das vitaminas K (Fonte: Shils, 2003).....	29
Figura 2: Função e regeneração da vitamina K na produção de ácido $\gamma$ -carboxiglutâmico (Fonte: Mahan & Escott-Stump, 2005). .....	33
Figura 3: (a) Dupla camada elétrica formada pelas cargas negativas à superfície da sílica e por cátions adsorvidos. (b) A predominância de cátions na zona difusa da dupla camada produz um fluxo eletroosmótico global no sentido do cátodo, quando se aplica um campo elétrico.....	47
Figura 4: Instrumentação para eletroforese capilar (adaptado de Frazier <i>et al.</i> , 2000).....	50
Figura 5: Esquema representativo do empilhamento da amostra ( <i>stacking</i> ). E = campo elétrico, $v_{ep}$ = velocidade eletroforética, $v_{eo}$ = velocidade eletroosmótica, BGE = eletrólito de corrida. ....	52
Figura 6: Representação esquemática da separação por MEKC usando micelas aniônicas (adaptado de Frazier <i>et al.</i> , 2000). ....	56
Figura 7: Migração de analitos neutros ( $S_1$ e $S_2$ ) em MEKC usando como fase pseudo-estacionária: (a) surfactante aniônico e (b) surfactante catiônico, onde $\mu_{eo}$ é a mobilidade do fluxo eletroosmótico e $\mu_{mc}$ , a mobilidade da micela (Fonte: Khaledi, 1998). ....	58
Figura 8: Capilar com janela óptica feita manualmente e alinhador (DI = diâmetro interno).....	97
Figura 9: Cassete com o capilar e seu respectivo alinhador. ....	98
Figura 10: Cella com caminho óptico alongado e os aparatos adaptados.....	99
Figura 11: Eletroferogramas das vitaminas K3 (pico 1) e K1 (pico 2) em uma mistura padrão (K1: $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ , K3: $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ ). Eletrólito de corrida: $25,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão fosfato $6,8 \text{ g.L}^{-1}$ (a: pH 6,0; b: pH 7,0; c: pH 7,4; d: pH 7,9), 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 $\mu\text{m}$ d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, $V = 25 \text{ kV}$ , $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção em 248 nm.....	103
Figura 12: Eletroferograma das vitaminas K3 (pico 1) e K1 (pico 2) em uma mistura padrão (K1: $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ , K3: $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ ). Eletrólito de corrida: $25,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato de $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ , pH = 8,5, 20% v/v	

- de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  e detecção em 248 nm. .... 103
- Figura 13: Eletroferograma das vitaminas K3 (pico 1) e K1 (pico 2) em uma mistura padrão (K1:  $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ , K3:  $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ ). Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ , 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  e detecção em 248 nm. .... 105
- Figura 14: Eletroferogramas da vitamina K3 ( $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ ) para diferentes temperaturas: (a)  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , (b)  $27,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , (c)  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , (d)  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ , 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s,  $V = 25 \text{ kV}$  e detecção em 248 nm. .... 106
- Figura 15: Eletroferograma das vitaminas K3:  $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$  (pico 1) e K1:  $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$  (pico 2) para duas diferenças de potencial elétrico aplicadas: (a)  $25 \text{ kV}$ , (b)  $30 \text{ kV}$ . Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ , 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  e detecção em 248 nm. .... 107
- Figura 16: Eletroferograma das vitaminas K3:  $1,6 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  (pico 1) e K1:  $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  (pico 2) para diferentes tempos de injeção: (a) 15 s, (b) 30 s, (c) 45 s e (d) 75 s. Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ , 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar),  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  e detecção em 248 nm. .... 108
- Figura 17: Eletroferograma do suplemento vitamínico contendo vitamina K1 ( $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ ) e fortificado com a vitamina K3 ( $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ ). Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ , 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s,  $V = 30 \text{ kV}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  e detecção em 248 nm. .... 112
- Figura 18: Eletroferograma do suplemento vitamínico e solução padrão de vitamina K1 + K3, contendo vitamina K1 na concentração de  $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  e vitamina K3 na concentração de  $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ . Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ , 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s,  $V = 30 \text{ kV}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  e detecção em 248 nm. .... 112
- Figura 19: Curva analítica para a vitamina K1 nas seguintes condições: Eletrólito de corrida:  $18,2 \text{ g.L}^{-1}$  de CTAB, tampão borato  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8,5$ ,

20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 µm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, T= 25 °C, V= 30 kV e detecção em 248 nm. ....	114
Figura 20: Curva analítica para a vitamina K3 nas seguintes condições: Eletrólito de corrida: 18,2 g.L <sup>-1</sup> de CTAB, tampão borato 3,1 g.L <sup>-1</sup> , pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 µm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, T= 25 °C, V= 30 kV e detecção em 248 nm. ....	114
Figura 21: Gráfico de resíduos da curva analítica para a vitamina K1.....	121
Figura 22: Gráfico de resíduos da curva analítica para a vitamina K3.....	121
Figura 23: Diagrama de causa e efeito considerando as fontes de incerteza mais relevantes para o método de determinação de vitamina K desenvolvido.....	131
Figura 24: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u <sub>c</sub> ) da medição de vitamina K1 para as seguintes concentrações: (P1) 2,25 x 10 <sup>-3</sup> g.L <sup>-1</sup> , (P2) 2,25 x 10 <sup>-2</sup> g.L <sup>-1</sup> , (P3) 4,51 x 10 <sup>-2</sup> g.L <sup>-1</sup> . ....	134
Figura 25: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u <sub>c</sub> ) da medição de vitamina K3 para as seguintes concentrações: (P1) 8,61 x 10 <sup>-4</sup> g.L <sup>-1</sup> , (P2) 8,61 x 10 <sup>-3</sup> g.L <sup>-1</sup> , (P3) 1,72 x 10 <sup>-2</sup> g.L <sup>-1</sup> . ....	135

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Estabilidade das vitaminas.....	28
Tabela 2: Métodos físico-químicos para determinação de vitamina K.....	39
Tabela 3: Métodos físico-químicos para determinação de vitamina K (HPLC).....	41
Tabela 4: Divisores para algumas distribuições de probabilidade .....	90
Tabela 5: Relação entre o nível de confiança e o fator de abrangência em uma distribuição normal .....	92
Tabela 6: Resumo das condições de trabalho após otimização do método. ....	108
Tabela 7: Condições para o condicionamento, pré-condicionamento e limpeza do capilar.....	109
Tabela 8: Valores médios dos tempos de migração, simetria dos picos e resolução entre os picos de vitamina K1 e K3, por MEKC, nas condições de trabalho.....	110
Tabela 9: Parâmetros das curvas analíticas para a vitamina K1 .....	115
Tabela 10: Parâmetros das curvas analíticas para a vitamina K3 .....	115
Tabela 11: Análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ( $\alpha=0,05$ ).....	120
Tabela 12: Análise das premissas relativas à linearidade. ....	123
Tabela 13: Limites de detecção e quantificação para as vitaminas K1 e K3, com a cela tradicional e a cela de caminho óptico alongado e valores de LOD e LOQ de métodos de referência.....	124
Tabela 14: Recuperação do analito em função da concentração .....	125
Tabela 15: Coeficientes de recuperação obtidos na análise de amostras de suplemento vitamínico e chá utilizando o método proposto. ....	126
Tabela 16: Resultados encontrados entre o método proposto (MEKC) e o método HPLC de referência para a análise de solução padrão de vitamina K1.....	126
Tabela 17: Resultados encontrados entre o método proposto (MEKC) e o método HPLC de referência para a análise de solução padrão de vitamina K3.....	127
Tabela 18: Avaliação da repetitividade para cada nível de concentração .....	128

Tabela 19: Precisão (repetitividade e precisão intermediária) para a vitamina K1.....	130
Tabela 20: Precisão (repetitividade e precisão intermediária) para a vitamina K3.....	130
Tabela 21: Valores das incertezas das fontes mais relevantes para a vitamina K1.....	133
Tabela 22: Valores das incertezas das fontes mais relevantes para a vitamina K3.....	134

## Lista de Quadros

Quadro 1: Publicações do Codex Alimentarius .....	72
Quadro 2: Publicações EURACHEM. ....	77
Quadro 3: Evolução das revisões do documento orientativo publicado pelo Inmetro sobre a validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008). ....	79
Quadro 4: Algumas publicações relacionadas à vigilância sanitária na área de alimentos, medicamentos, cosméticos e de laboratório. ....	80
Quadro 5: Parâmetros de validação indicados nos documentos da Anvisa (Resolução RE nº 899, de 29/05/2003) e do Inmetro (DOQ-CGCRE-008, de 07/2011). ....	83

## Lista de Abreviaturas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ACN – Acetonitrila  
ANOVA – Análise de variância  
Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BIPM – *Bureau International des Poids et Mesures*  
CITAC – Cooperação Internacional sobre Rastreabilidade em Química Analítica  
CGPM – Conferência Geral de Pesos e Medidas  
CIPM – Comitê Internacional de Pesos e Medidas  
CCEM - Comitê Consultivo para Eletricidade e Magnetismo  
CCAUV - Comitê Consultivo para Acústica, Ultra-som e Vibração  
CCL - Comitê Consultivo para Comprimento  
CCM - Comitê Consultivo para as Massas e as Grandezas Aparentes  
CCPR - Comitê Consultivo para Fotometria e Radiometria  
CCQM - Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria  
CCRI - Comitê Consultivo para Radiações Ionizantes  
CCT - Comitê Consultivo para Termometria  
CCTF - Comitê Consultivo para Tempo e Frequência  
CCU - Comitê Consultivo para as Unidades de Medida  
CMC – Concentração crítica micelar  
CZE – Eletroforese capilar por zona  
EC – Eletroforese capilar  
EOF – Fluxo eletrosmótico  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência  
ISO – *International Organization for Standardization*  
IEC – *International Electrotechnical Commission*  
JCGM - Comitê Conjunto para Guias em Metrologia  
JCRB - Comissão Mista das Organizações Regionais de Metrologia e do BIPM  
JCTLM - Comitê Misto para Rastreabilidade em Medicina Laboratorial  
DCMAS Rede - Rede de Metrologia, Acreditação e Normalização para Países em Desenvolvimento  
FAO – *Food and Agriculture Organization*

GC – Cromatografia Gasosa  
SPME - Microextração em fase sólida  
IDA – Ingestão Diária Aceitável  
IFCC – Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial  
Inmetro- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  
ILAC - *International Laboratory Accreditation Cooperation*  
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada  
LOD – Limite de detecção  
LOQ – Limite de quantificação  
MEKC – Cromatografia eletrocinética capilar micelar  
MeOH – Metanol  
MQ<sub>dentro</sub> – Mínimos quadrados dentro do grupo  
MQ<sub>entre</sub> – Mínimos quadrados entre grupos  
OIML - Organização Internacional de Metrologia Legal  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde  
OEA – Organização dos Estados Americanos  
ONU – Organização das Nações Unidas  
P<sub>mw</sub> – Coeficiente de partição de solutos  
r – Repetitividade  
R – Reprodutibilidade  
pi – Precisão intermediária  
Rs – Resolução  
RSD<sub>R</sub> - Desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade  
SI – Sistema Internacional  
s<sub>r</sub> – Desvio padrão da repetitividade  
s<sub>R</sub> – Desvio padrão da reprodutibilidade  
U – Incerteza expandida  
u<sub>c</sub> – Incerteza combinada  
UV-Vis – Ultravioleta – visível