

6 Resultados e Discussão

No presente capítulo são descritos os resultados obtidos ao longo das etapas de desenvolvimento, validação (incluindo a estimativa da incerteza de medição) do método analítico por cromatografia eletrocinética capilar micelar utilizando detecção espectrofotométrica na região do UV-Vis, além dos resultados das análises de amostras visando à determinação das vitaminas K1 e K3.

6.1. Desenvolvimento do método analítico por cromatografia eletrocinética capilar micelar

Para desenvolver o método analítico por cromatografia eletrocinética capilar micelar foram realizados testes para seleção do sistema de solventes adequado ao método (item 6.1.1); estudos para definição da composição do eletrólito de corrida para obtenção de migração diferenciada para as duas vitaminas K (item 6.1.2); e otimização de parâmetros experimentais e instrumentais críticos para a garantia de boa resolução na separação dos analitos (item 6.1.3).

6.1.1. Testes de solubilidade

Sendo as vitaminas K substâncias lipossolúveis, inicialmente, para o desenvolvimento da metodologia analítica, foi realizado um estudo visando encontrar um sistema de solventes adequado para dissolver os analitos e que fosse compatível com a abordagem por eletroforese capilar, já que a técnica escolhida para a separação das mesmas (MEKC) normalmente é realizada em meio aquoso.

Testes foram realizados tomando como base alguns trabalhos da literatura (Cao *et al.*, 2009; Souza, 2008) que envolvem a separação de substâncias neutras. Os seguintes sistemas foram testados: i) H₂O + SDS (28,8 g.L⁻¹), ii) H₂O:MeOH 95:5% v/v, iii) H₂O:MeOH 95:5% v/v + SDS (28,8 g.L⁻¹), iv) ACN:H₂O

30:70% v/v, v) H₂O:ACN 95:5% v/v, vi) H₂O:ACN 95:5% v/v + SDS (28,8 g.L⁻¹). No entanto os resultados não foram satisfatórios, pois em nenhum dos testes houve dissolução completa de ambos os analitos. A vitamina K3 foi completamente solúvel em todos os meios testados, porém quando a vitamina K1 foi adicionada, todos os sistemas testados se apresentaram turvos, indicando solubilização incompleta de componentes.

Sendo o SDS um surfactante aniônico optou-se, em um primeiro momento, por modificar o tipo de surfactante utilizado, alterando para um surfactante catiônico, no caso, o CTAB. Em soluções contendo até 90% v/v de água foi possível dissolver ambas as vitaminas K1 e K3. Sendo assim, o sistema de solventes eleito foi uma solução contendo: H₂O:ACN 90:10% v/v + CTAB (18,2 g.L⁻¹).

6.1.2.

Composição do eletrólito e condições preliminares de análise

A composição do eletrólito de corrida foi otimizada de modo a se obter a migração diferenciada para as duas vitaminas K. Inicialmente utilizou-se 25,5 g.L⁻¹ de CTAB, 20% de acetonitrila e solução tampão em diferentes faixas de pH. A acetonitrila foi introduzida como modificador químico de modo a melhorar as características de migração e garantir a solubilização dos analitos no meio essencialmente aquoso e com alta força iônica. Os seguintes tampões foram utilizados: acetato (pH 4,0), fosfato (pH 6,7; 7,0; 7,4 e 7,9) e borato (pH 8,5). Para os testes iniciais, com base em procedimentos descritos na literatura para separação de outras espécies neutras por EC (Frazier *et al.*, 2000), utilizou-se temperatura de 25 °C, diferença de potencial de 25 kV e tempo de injeção de amostra de 15 s. Utilizando-se o tampão acetato, não foi possível visualizar picos de absorvância das vitaminas. Na Figura 11 são apresentados os resultados obtidos com o tampão fosfato, observando-se uma divisão do pico da vitamina K3. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o sistema tampão borato na concentração de 3,1 g.L⁻¹, apresentando uma completa separação dos picos de absorvância das vitaminas K1 e K3 (Figura 12).

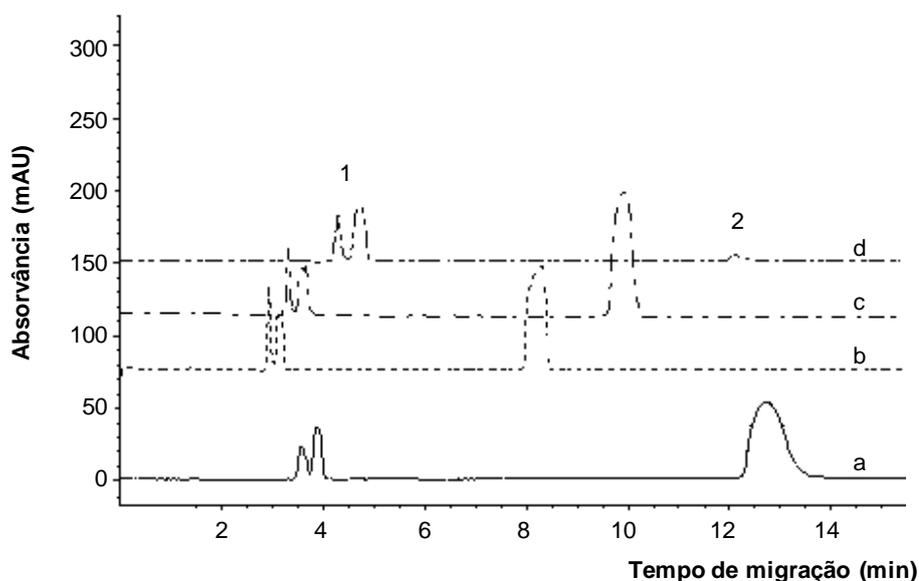


Figura 11: Eletroferogramas das vitaminas K3 (pico 1) e K1 (pico 2) em uma mistura padrão (K1: $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$, K3: $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$). Eletrólito de corrida: $25,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão fosfato $6,8 \text{ g.L}^{-1}$ (a: pH 6,0; b: pH 7,0; c: pH 7,4; d: pH 7,9), 20% v/v de acetonitrila, capilar de $60 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ 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.

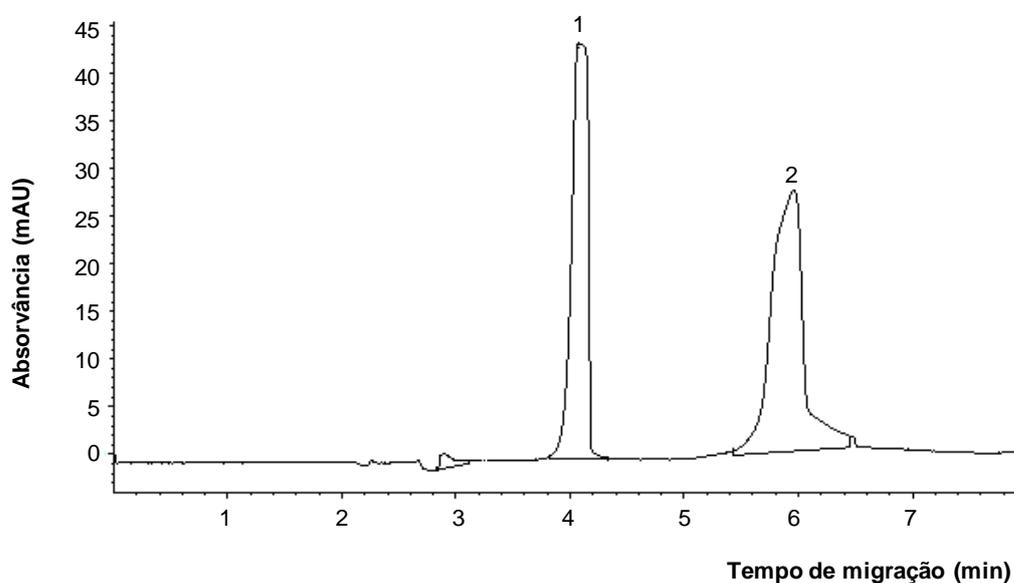


Figura 12: Eletroferograma das vitaminas K3 (pico 1) e K1 (pico 2) em uma mistura padrão (K1: $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$, K3: $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$). Eletrólito de corrida: $25,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato de $3,1 \text{ g.L}^{-1}$, pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de $60 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ 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.

Em separações de substâncias neutras, o ajuste do pH tem pouco efeito sobre a seletividade, no entanto, deve-se selecionar um valor de pH para o

sistema no qual as micelas do surfactante se encontrem ionizadas de tal forma que permita sua migração em uma taxa diferente da taxa do EOF. Optou-se por manter constante tanto a concentração quanto o valor de pH de 8,5 do tampão borato utilizado nos testes iniciais por terem se apresentado satisfatórios, resultando em uma boa separação dos analitos nessas condições (Figura 12).

Em relação ao percentual de solvente orgânico, no caso a acetonitrila, presente no eletrólito de corrida, optou-se, após análise dos resultados, por mantê-lo em 20%. Solventes orgânicos miscíveis em água como a acetonitrila provocam redução do fator de retenção, alterando, portanto a seletividade da separação. Os mesmos quando adicionados na solução do eletrólito de corrida alteram a polaridade da fase aquosa do eletrólito causando um aumento na atração do analito para essa fase. No entanto, se presentes em alta concentração podem dividir a estrutura da micela, sendo recomendado portanto que a fração de volume não exceda 30% da composição (Frazier *et al.* 2000).

6.1.3.

Otimização de parâmetros críticos para separação eletroforética

Definidas as condições preliminares de trabalho, estudos univariados dos parâmetros experimentais e instrumentais críticos foram realizados de modo a se conhecer a influência de cada uma das variáveis e otimizá-las, garantindo boa resolução na separação dos analitos.

6.1.3.1.

Parâmetros experimentais

Na condição inicial escolhida observou-se que após algumas corridas consecutivas ocorria a deformação nos picos de absorvância e entupimento do capilar. Isso acontecia, provavelmente, pela alta concentração do surfactante CTAB. Não foi possível reduzir a concentração de CTAB nas soluções do analito, já que o mesmo é essencial para a completa dissolução. Então, com o objetivo de melhorar a resolução dos picos e solucionar os problemas quanto ao entupimento do capilar, optou-se por reduzir a concentração de CTAB no eletrólito de corrida. Estudou-se o efeito da concentração do surfactante numa faixa entre 7,3 e 25,5 g.L⁻¹, faixa de concentração acima da CMC, cujo valor de referência em água é 0,34 g.L⁻¹ (Frazier *et al.*, 2000). Utilizando-se a concentração de 18,2 g.L⁻¹ de CTAB no eletrólito de corrida obteve-se a melhor resolução dos picos (Figura 13) com tempo de análise de cerca de 7 min. Esta

concentração do surfactante também minimizou o entupimento do capilar, possibilitando a realização de um maior número de corridas com um mesmo capilar, sem interrupção para condicionamentos.

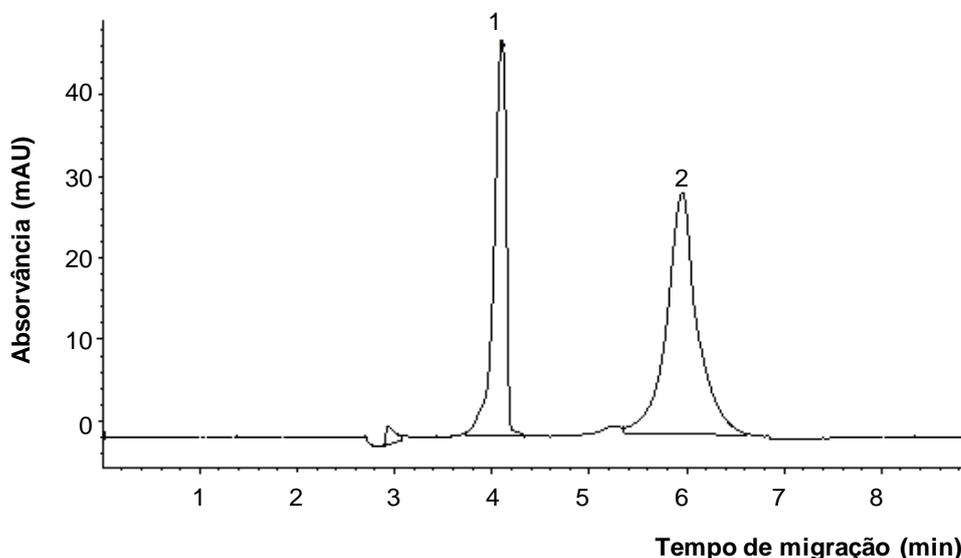


Figura 13: Eletroferograma das vitaminas K3 (pico 1) e K1 (pico 2) em uma mistura padrão (K1: $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$, K3: $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$). Eletrólito de corrida: $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato $3,1 \text{ g.L}^{-1}$, pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 μm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, V = 25 kV, T = 25 °C e detecção em 248 nm.

6.1.3.2. Parâmetros instrumentais

Estudos para otimização de parâmetros instrumentais como temperatura, diferença de potencial aplicado e tempo de injeção da amostra também foram realizados. A temperatura é um parâmetro que deve ser mantido constante durante as análises, pois um aumento na temperatura pode levar à redução da viscosidade do tampão, aumentando assim a velocidade do EOF e das micelas. Isso provoca uma redução dos tempos de migração dos picos, podendo afetar a resolução, com o alargamento das zonas, e alterar a simetria dos picos. Em testes preliminares utilizando somente a vitamina K3, com objetivo de verificar a influência da temperatura, observou-se não haver diferença significativa na largura e simetria do pico e no tempo de migração, para a faixa entre 25 °C e 35 °C (Figura 14). Assumindo-se que o mesmo comportamento ocorreria para a vitamina K1, escolheu-se a temperatura de 25 °C para a continuidade dos testes.

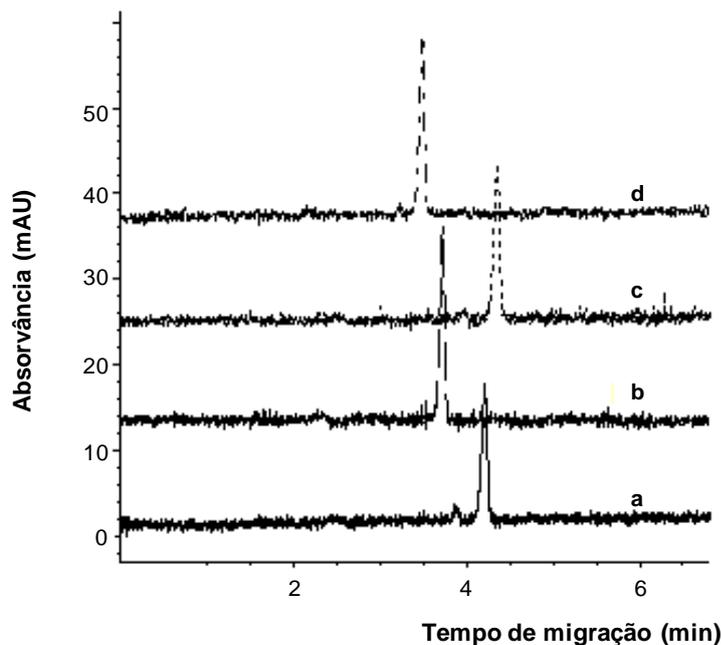


Figura 14: Eletroferogramas da vitamina K3 ($6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$) para diferentes temperaturas: (a) 25 °C, (b) 27,5 °C, (c) 30 °C, (d) 35 °C. Eletrólito de corrida: 18,2 g.L^{-1} de CTAB, tampão borato 3,1 g.L^{-1} , pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 μm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, $V = 25 \text{ kV}$ e detecção em 248 nm.

Em relação ao valor da diferença de potencial aplicada, foram realizados testes utilizando dois valores: 25 e 30 kV. Como a força do campo elétrico é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada (Equação 2) e a magnitude do EOF é diretamente proporcional à força do campo elétrico, o aumento do potencial aplicado levaria à redução do tempo de migração. No entanto o aumento do EOF pode levar a redução da resolução entre os picos devido à diminuição da janela de detecção. Os resultados do teste realizado estão apresentados na Figura 15, onde se pode observar que o aumento da voltagem provocou a diminuição do tempo de migração das vitaminas, com nenhum impacto na resolução dos picos de absorvância correspondentes. Logo o potencial de 30 kV foi selecionado para a continuidade dos testes.

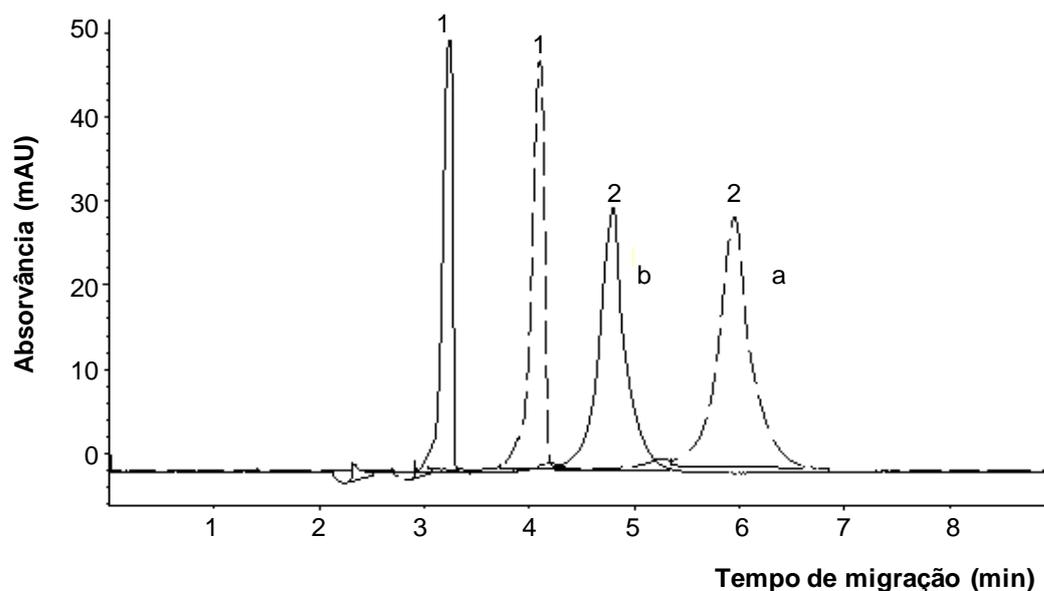


Figura 15: Eletroferograma das vitaminas K3: $6,9 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ (pico 1) e K1: $1,8 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ (pico 2) para duas diferenças de potencial elétrico aplicadas: (a) 25 kV, (b) 30 kV. Eletrólito de corrida: $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato $3,1 \text{ g.L}^{-1}$, 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 e detecção em 248 nm.

Considerando o fato de que as variações na temperatura e valores da diferença de potencial aplicado não provocaram alteração da área dos picos, resolução e eficiência de separação das vitaminas K1 e K3 ($CV < 5\%$), pode-se afirmar que o método se apresenta robusto em relação a variação de tais parâmetros, podendo os mesmos serem incorporados ao procedimento.

Outro parâmetro instrumental avaliado foi o volume de injeção de amostra no capilar. O volume injetado depende essencialmente do tempo de injeção. Um aumento no tempo de injeção serve muitas vezes para melhorar a sensibilidade do método, pois se aumenta a quantidade de material a ser analisado. Assim, realizaram-se testes utilizando os tempos de 15, 30, 45 e 75 s de injeção hidrodinâmica (Figura 16). No entanto, foi observado que nos tempos maiores que 15 s houve uma significativa ampliação na largura dos picos, causando a deformação dos mesmos, resultante da alteração da homogeneidade do campo elétrico ao longo do capilar. No tempo de 75 s não foi possível visualizar os picos das vitaminas separadamente devido à deformação dos mesmos. Esse efeito decorre da menor condutividade da solução da amostra, o que provoca um aumento da impedância do sistema no local da injeção da amostra. Assim sendo utilizou-se o tempo de injeção de 15 s para a continuidade dos testes.

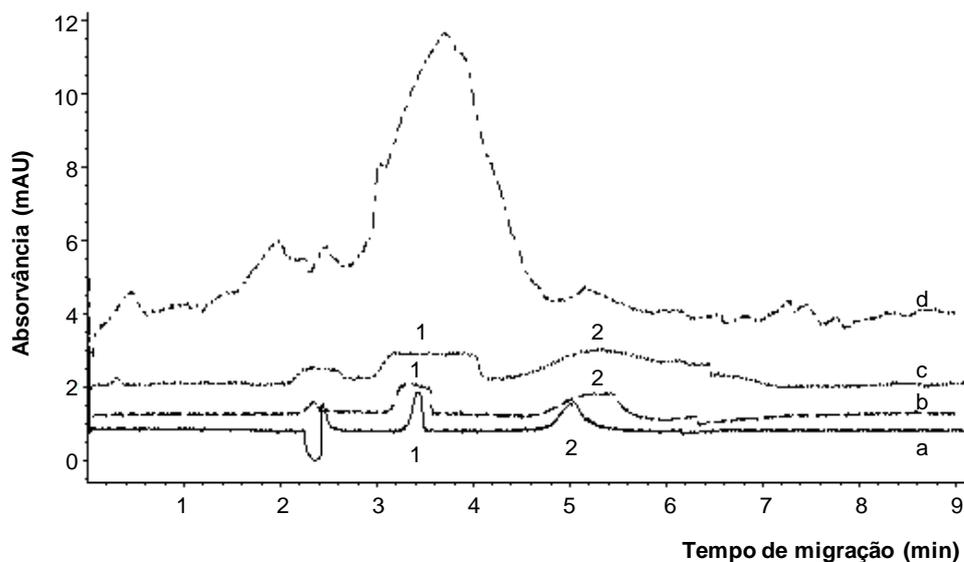


Figura 16: Eletroferograma das vitaminas K3: $1,6 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ (pico 1) e K1: $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ (pico 2) para diferentes tempos de injeção: (a) 15 s, (b) 30 s, (c) 45 s e (d) 75 s. Eletrólito de corrida: $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato $3,1 \text{ g.L}^{-1}$, pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 μm d.i., injeção por pressão (50 mbar) , T= 25 °C e detecção em 248 nm.

Finalizada esta etapa de otimização, as condições de trabalho escolhidas são descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Resumo das condições de trabalho após otimização do método.

Parâmetro	Condição selecionada
Tampão	$3,1 \text{ g.L}^{-1}$ de borato
Surfactante	$18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB
Modificador orgânico	20% v/v de ACN
pH	8,5
Potencial	30 kV
Temperatura	25 °C
Pressão de injeção	50 mbar
Tempo de injeção	15 s
Tamanho do capilar	60 cm comprimento total (52 cm até o detector)
Diâmetro interno do capilar	75 μm
Composição da solução da amostra	10% v/v de ACN $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB

6.1.3.3.

Condições de condicionamento, pré-condicionamento e limpeza do capilar

De modo a se obter uma maior robustez do sistema, com a manutenção da boa repetitividade das respostas analíticas e o maior número de corridas com o mesmo capilar, partiu-se para a otimização de condicionamento, pré-condicionamento e limpeza do capilar que são realizadas no início de cada experimento, entre as corridas e no final de cada experimento, respectivamente. As condições escolhidas, após otimização, são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições para o condicionamento, pré-condicionamento e limpeza do capilar.

Etapa	Condição Selecionada
Condicionamento	(i) 5 min de ACN
	(ii) 15 min de H ₂ O
	(iii) 10 min de NaOH (40,0 g.L ⁻¹)
	(iv) 10 min de eletrólito de corrida
Pré-condicionamento	(i) 2 min de H ₂ O
	(ii) 2 min de ACN
	(iii) 2 min de H ₂ O
	(iv) 2 min de NaOH (40,0 g.L ⁻¹)
	(v) 5 min de Tampão Borato
Limpeza	(i) 8 min de H ₂ O
	(ii) 5 min de ACN
	(iii) 5 min de ACN/H ₂ O 50/50% v/v

A passagem de água durante dois minutos no início da etapa de pré-condicionamento foi necessária para impedir a deposição do CTAB nas paredes do capilar, evitando assim o entupimento dos mesmos durante as análises. A etapa de limpeza, inicialmente realizada a 25 °C, teve sua temperatura alterada para 40 °C de modo a remover todo o surfactante utilizado, já que o mesmo se apresenta sólido em temperatura ambiente e quando não removido totalmente se acumula nas paredes do capilar, provocando o entupimento dos mesmos. A substituição dos *via/s* contendo a solução eletrolítica foi realizada a cada seis corridas, pois observou-se que durante as análises a mesma sofria um processo de oxidação, o que é provocado pela alteração da composição química resultante da aplicação sucessiva de potencial elétrico elevado.

O tempo total de análise ficou em torno de 20 min, já que a etapa de condicionamento (40 min) é realizada apenas no início de cada dia de trabalho e

a etapa de limpeza (18 min) no fim de cada dia. Sendo realizado apenas a etapa de pré-condicionamento entre corridas.

6.1.3.4.

Tempo de migração, simetria e resolução dos picos

Os valores médios dos tempos de migração, simetria e resolução dos picos das vitaminas K1 e K3, obtidos por MEKC nas condições de trabalho são apresentados na Tabela 8. Picos simétricos são obtidos quando a mobilidade dos analitos dentro do capilar é próxima à mobilidade do tampão. Os valores de simetria dos picos para as vitaminas K1 e K3 ficaram em torno de 1, considerado o valor ideal, indicando um bom resultado ao longo das análises. A resolução entre os picos de absorvância foi obtida a partir da Equação 18, a qual utiliza o critério da largura de cada um dos picos à meia altura.

$$R = 1,176 \left\{ \frac{(t_1 - t_2)}{w_{1(1/2)} + w_{2(1/2)}} \right\} \quad (18)$$

onde: t_1 e t_2 são os tempos de migração dos analitos 1 e 2, $w_{1(1/2)}$ e $w_{2(1/2)}$ são as larguras dos picos 1 e 2 calculadas a meia altura e 1,176 é o fator de multiplicação. A resolução entre os picos das vitaminas K1 e K3 foi de $6,20 \pm 0,27$, valor considerado satisfatório já que o valor ótimo é de 1,5 (Neue, 1997).

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.

Analitos	Tempo de migração (min)	Simetria	Resolução de linha base
K1	$5,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,3$
K3	$3,4 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,0$	

6.2.

Validação do método desenvolvido

A validação de métodos analíticos desenvolvidos no laboratório é um processo contínuo que se inicia no planejamento do método e continua durante o desenvolvimento e otimização. Para se garantir a geração de informações confiáveis sobre as amostras em análise, o método analítico deve ser validado.

De acordo com a RE nº 899, de 29/5/2003 da Anvisa, métodos analíticos e bioanalíticos devem ser validados de acordo com os critérios estabelecidos pela mesma. O presente trabalho utilizou como base para a validação do método desenvolvido além desta resolução o documento do Inmetro DOC-CGCRE-008:2011 (documento orientativo sobre validação de métodos analíticos), bem como o documento sobre validação de métodos de análise da IUPAC (IUPAC, 2010). A validação da metodologia analítica foi realizada empregando-se as condições descritas na Tabela 8 (item 6.1.3.2).

6.2.1. Parâmetros da validação do método analítico

Para validar o método analítico desenvolvido foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade da resposta analítica, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

6.2.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi verificada a partir da análise de amostras de suplemento vitamínico, as quais continham diversas vitaminas e minerais, além da vitamina K1. As amostras foram fortificadas com a vitamina K3 para a realização das análises. Em seguida compararam-se os resultados obtidos utilizando-se soluções padrões de vitaminas K1 e K3, de modo a confirmar a seletividade.

A Figura 17 apresenta o eletroferograma das soluções de vitaminas K1 e K3 do suplemento vitamínico contendo a vitamina K1 e fortificado com a vitamina K3. A Figura 18 apresenta a sobreposição dos eletroferogramas obtidos através da análise das amostras de suplemento vitamínico e da solução padrão.

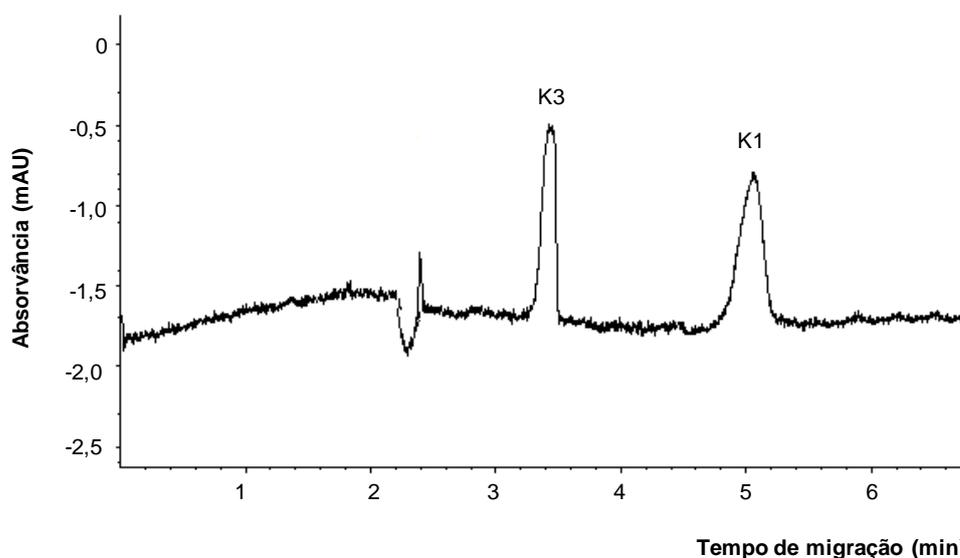


Figura 17: Eletroferograma do suplemento vitamínico contendo vitamina K1 ($4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$) e fortificado com a vitamina K3 ($1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$). Eletrólito de corrida: $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato $3,1 \text{ g.L}^{-1}$, pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 μm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, V= 30 kV, T= 25 °C e detecção em 248 nm.

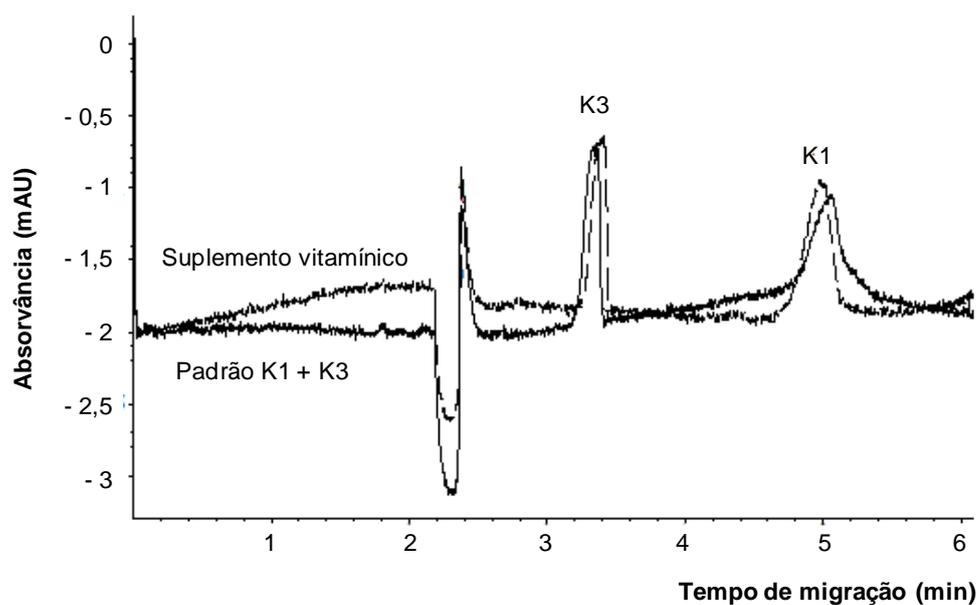


Figura 18: Eletroferograma do suplemento vitamínico e solução padrão de vitamina K1 + K3, contendo vitamina K1 na concentração de $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ e vitamina K3 na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. Eletrólito de corrida: $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ de CTAB, tampão borato $3,1 \text{ g.L}^{-1}$, 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, V= 30 kV, T= 25 °C e detecção em 248 nm.

A partir do eletroferograma apresentado na Figura 17, pode-se afirmar que o método apresenta boa seletividade para as vitaminas K1 e K3, já que não há

picos interferentes próximos aos picos das mesmas. A seletividade pode ainda ser comprovada a partir da média do percentual de recuperação e respectivo coeficiente de variação apresentados no item 6.2.1.4. As recuperações foram obtidas por meio de soluções padrões fortificadas com as vitaminas K1 e K3. A presença de outras vitaminas e minerais não influenciou a separação, o tempo de migração dos analitos, bem como a área dos picos (Figura 18).

6.2.1.2. Linearidade da resposta analítica

Os parâmetros da curva de calibração podem ser obtidos pela regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados, quando a variância é homogênea ao longo dos pontos amostrados, isto é, quando existe homoscedasticidade.

Segundo o documento DOQ-CGCRE-008, a linearidade da resposta analítica de um método deve ser avaliada por meio do coeficiente de correlação linear (Inmetro, 2011). Entretanto, o mesmo documento também destaca que é necessário avaliar a homogeneidade das variáveis. Isso pode ser feito por meio de alguns testes estatísticos (teste *t* de *Student*, a prova F de Fischer, entre outros). De acordo com a IUPAC a avaliação da linearidade deve ser feita a partir da construção de uma curva analítica com níveis de concentração igualmente espaçados entre si, na faixa de concentração de interesse, e abranger a faixa de 0 a 150% do valor esperado. Os padrões analíticos devem ser analisados no mínimo em duplicata, e em ordem aleatória (IUPAC, 2010).

A avaliação da linearidade foi realizada através de ensaios com soluções padrão. Construiu-se três curvas analíticas, utilizando-se sete pontos cada, sendo cada ponto da curva o resultado médio de três medições com respectivos desvios. A faixa linear obtida cobriu as concentrações de analito entre $9,0 \times 10^{-4}$ a $4,5 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ para a vitamina K1, e $3,4 \times 10^{-4}$ a $1,7 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ para a vitamina K3. A Figura 19 e a Figura 20 apresentam, respectivamente, uma das curvas analíticas construídas para as vitaminas K1 e K3. A inclinação, intercessão e o coeficiente de correlação das curvas analíticas das vitaminas K1 e K3 encontram-se na Tabela 9 e Tabela 10.

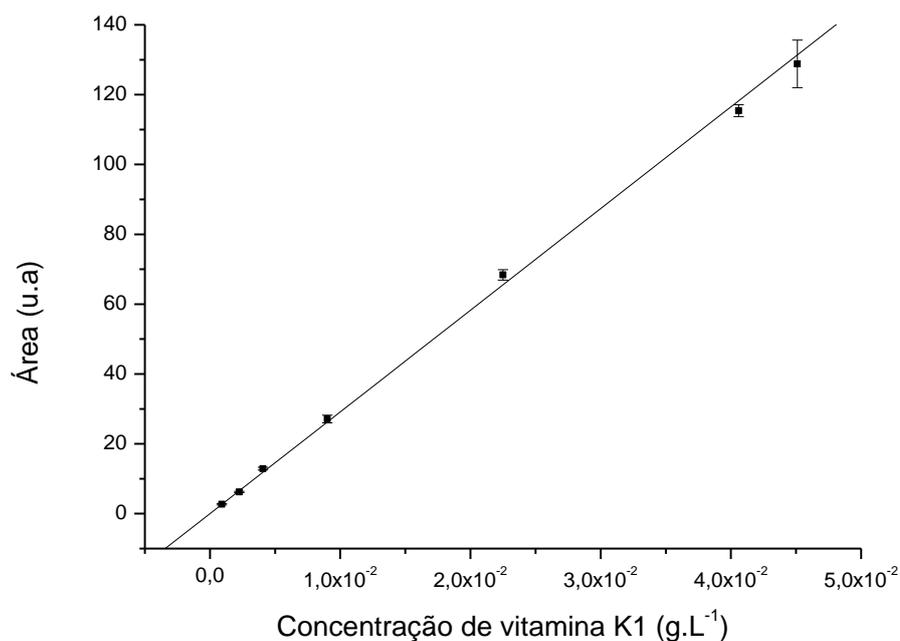


Figura 19: Curva analítica para a vitamina K1 nas seguintes condições: Eletrólito de corrida: 18,2 g.L⁻¹ de CTAB, tampão borato 3,1 g.L⁻¹, pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 μm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, T= 25 °C, V= 30 kV e detecção em 248 nm.

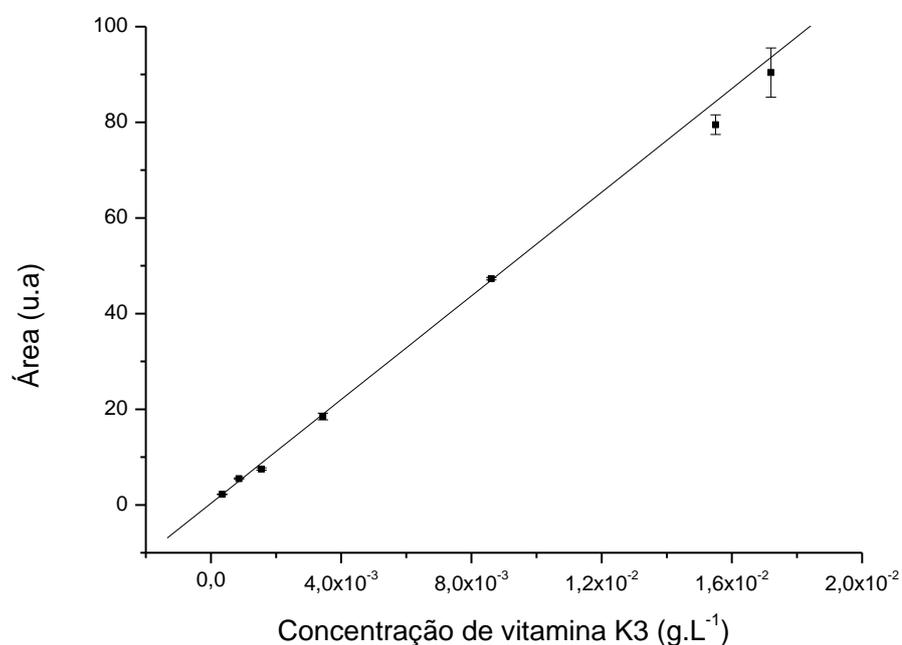


Figura 20: Curva analítica para a vitamina K3 nas seguintes condições: Eletrólito de corrida: 18,2 g.L⁻¹ de CTAB, tampão borato 3,1 g.L⁻¹, pH = 8,5, 20% v/v de acetonitrila, capilar de 60 cm x 75 μm d.i., injeção por pressão (50 mbar) por 15 s, T= 25 °C, V= 30 kV e detecção em 248 nm.

Tabela 9: Parâmetros das curvas analíticas para a vitamina K1

Parâmetros	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Inclinação	$2,8 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$
Interseção	1,0	-1,2	-3,8
r	0,99	1,0	1,0

Tabela 10: Parâmetros das curvas analíticas para a vitamina K3

Parâmetros	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Inclinação	$5,2 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$
Interseção	0,6	0,3	0,2
r	0,99	1,0	1,0

Utilizou-se o teste de Grubbs para tratamento dos valores aberrantes. O método dos mínimos quadrados parte do pressuposto que os resíduos seguem uma distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo x e são independentes, ou seja, não há auto-correlação dos resíduos. Deste modo as premissas relativas à análise da regressão verificadas foram: normalidade (Ryan & Joiner, 1976), homoscedasticidade (Levene, 1960; Brown & Forsythe, 1974) e independência dos resíduos da regressão (Durbin & Watson, 1951). Para verificar o ajuste ao modelo linear utilizou-se o teste F (Draper & Smith, 1998).

O teste de Grubbs é primeiramente realizado de modo a verificar a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto. Se nesta primeira análise, um dos dois valores for considerado disperso, ele é rejeitado, retirado do conjunto e novo teste, verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto, é realizado e assim sucessivamente, caso contrário, se nesta primeira análise, ambos os valores forem aceitos como não dispersos, o teste é então realizado verificando-se a existência de dois valores dispersos em cada extremidade do conjunto. Se nesta segunda análise os dois resultados de uma das extremidades forem considerados como dispersos, eles devem ser rejeitados, retirados do conjunto e novo teste verificando a existência de dois valores dispersos em cada extremidade do conjunto é realizado e assim sucessivamente (Leão, 2007). Este teste se utiliza da seguinte estatística:

$$|G_{calc}| = \frac{(x_i - x_{médio})}{s} \quad (19)$$

Onde:

x_i - valor suspeito de ser aberrante;

$X_{\text{médio}}$ - média;

s - desvio padrão amostral.

Esta estatística testa as seguintes hipóteses:

H_0 : x_i é uma observação considerada como valor extremo;

H_1 : x_i não é uma observação considerada como valor extremo.

Rejeita-se a hipótese H_0 com nível de significância de α , se $G > G_c$, sendo G_c um valor crítico baseado na distribuição Z , o qual se encontra tabelado para alguns valores de α (Anexo VII).

O teste de Ryan-Joiner, faz uso do teste de hipóteses de modo a confirmar se os resíduos seguem a distribuição normal e, portanto, os desvios da normalidade não seriam significativos (Bomfim, 2008). A estatística do teste é o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. Rejeita-se a hipótese nula quando os coeficientes R são inferiores aos valores críticos estabelecidos. Construiu-se um gráfico dos resíduos ordenados de uma amostra (e_i) de tamanho n versus os pontos dos percentis de uma distribuição normal reduzida (q_i). Os quantis normais foram obtidos pela Equação 20.

$$q_i = \phi^{-1} \left\{ \frac{(i-3/8)}{(n+1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n \quad (20)$$

Sendo:

q_i = valor normal esperado;

ϕ^{-1} = inverso de uma função de distribuição normal padrão.

O coeficiente de correlação entre e_i e q_i foi obtido a partir da Equação 21:

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} - S_{qq}}} \quad (21)$$

Sendo:

$$s_{eq} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}) = \frac{\sum_{i=1}^n e_i q_i - \sum_{i=1}^n e_i \sum_{i=1}^n q_i}{n} \quad (22)$$

$$s_{ee} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 = \frac{\sum_{i=1}^n e_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n e_i \right)^2}{n} \quad (23)$$

$$s_{qq} = \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 = \frac{\sum_{i=1}^n q_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n q_i \right)^2}{n} \quad (24)$$

$$\bar{e} = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n} \quad (25)$$

$$\bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^n q_i}{n} \quad (26)$$

Os dados seguem uma distribuição normal caso o gráfico seja uma linha reta. Caso contrário, o gráfico apresentará algum grau de curvatura ou distribuição aleatória de dados, sendo os mesmos provenientes de outra distribuição de probabilidade. A partir da Equação 27 obtiveram-se os coeficientes de correlação críticos para conjunto de dados pertencentes à distribuição normal para o nível de significância de 0,05 (Ryan & Joiner, 1976). O coeficiente R é utilizado para confirmar o resultado gráfico.

$$R_{crit} \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad (27)$$

A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene (Levene, 1960) modificado por Brown e Forsythe (1974), onde se testou a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homoscedasticidade. A hipótese alternativa foi a de que as variâncias dos resíduos seriam diferentes, ou seja, há heteroscedasticidade. A estatística do teste é o F de Levene (F_L). Dividiram-se os resíduos em dois grupos n_1 e n_2 , para 1 grau de liberdade, em que $t = \sqrt{F}$, e calculou-se a estatística t de Levene t_L . Rejeita-se a hipótese nula se t_L for superior ao t crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$. Distribuíram-se então os grupos equitativamente, não separando repetições de um mesmo nível em grupos distintos. Calculou-se as medianas dos resíduos de cada grupo \bar{e}_1 e \bar{e}_2 e obteve-se as diferenças absolutas entre as medianas e os resíduos (e_{kj}) dos respectivos grupos. A média das diferenças \bar{d}_k e a soma dos quadrados dos desvios SQD_k dos valores \bar{d}_{kj} de cada grupo $k = 1$ e $k = 2$ foram calculadas. O valor de t_L foi obtido pela Equação 28:

$$t_L = \frac{(\bar{d}_1 - \bar{d}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) S_p^2}} \quad (28)$$

Sendo:

$$\bar{d}_k = \frac{\sum |\tilde{e} - e_{kj}|}{n_k} \quad (29)$$

\bar{d}_k = média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana de cada grupo $k = 1$ e $k = 2$;

n_k = número de observações em cada grupo;

e_k = mediana de cada grupo.

$$s_p^2 = \frac{(SQD_1 + SQD_2)}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (30)$$

$$SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (\tilde{e}_k - e_{kj})^2 \quad (31)$$

s_p^2 = variância combinada;

SQD_k = soma dos quadrados dos desvios entre cada j-ésimo resíduo e a mediana de seu k-ésimo grupo, para cada grupo.

Se t_L for inferior ao valor crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$, não há razões para rejeitar a hipótese nula, logo aceita-se que a variância dos resíduos seja constante ou seja há homoscedasticidade. A significância p também deve ser superior a 0,05 (Levene, 1960; Brown & Forsythe, 1974).

A independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson, o qual considera como hipótese nula há não autocorrelação entre os resíduos, ou seja, a independência entre os resíduos; a hipótese alternativa é a de que há autocorrelação entre os resíduos, não sendo portanto, independentes. Assumindo-se que os resíduos e_i são variáveis independentes, a autocorrelação entre os resíduos seria $\rho_s = 0$ (hipótese nula). Sendo a hipótese alternativa $\rho_s = \rho$ ($\rho \neq 0$ e $|\rho| < 1$). Utiliza-se a estatística de Durbin-Watson para a avaliação (Equação 32).

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (32)$$

Existem dois limites críticos d_L (inferior) e d_U (superior) para cada grupo de dados. O teste é inconclusivo quando o valor de d se encontra entre esses limites. Há indicação de autocorrelação quando se obtém valores de $d < d_L$, neste caso rejeita-se a hipótese nula para um nível de significância de 2α ; já valores de $d > d_U$ indicam independência e a não rejeição da hipótese nula. O valor de d varia de zero a quatro, se o mesmo converge para dois significa que não há autocorrelação e os resíduos são independentes. Se os valores de d se afastam de dois para zero ou quatro a autocorrelação aumenta. Pode-se utilizar como pontos de corte inferior e superior valores entre 1,5 e 2,5 (Durbin & Watson, 1951). Os valores limites de d são estimados pelas Equações 33 e 34 para nível de significância igual a 0,05 (Bomfim, 2008).

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad (33)$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2} \quad (34)$$

A Tabela 11 apresenta as equações utilizadas para análise de variância do teste de significância da regressão. A estatística do teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de F com os graus de liberdades correspondentes.

Tabela 11: Análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ($\alpha=0,05$).

FV	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	$\left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \right]^2$	$\frac{SQ_{regr}}{GL_{regr}}$	$\frac{QM_{regr}}{s_{res}^2}$
Resíduos	n - 2	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{regr}}{GL_{regr}} = s_{res}^2$	
Desvio da linearidade	u - 2	$\sum_{k=1}^u n_k (\hat{y}_k - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{desv}}{GL_{desv}}$	$\frac{QM_{desv}}{QM_{Erropuro}}$
Entre níveis	u - 1	$\sum_{k=1}^u n_k (\bar{y}_k - \bar{y})^2$		
Erro puro	n - u	$\sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} (y_{kj} - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{Erropuro}}{GL_{Erropuro}}$	
Total	n-1	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$	

Sendo:

FV = fonte de variação;

GL = graus de liberdade;

SQ = soma dos quadrados;

QM = quadrado médio;

F = razão entre variâncias;

n = número de i pontos de curva analítica;

u = número de níveis de concentração;

n_k = número de pontos j em cada nível de concentração k;

y_i = resposta medida;

x_i = concentração conhecida do analito;

\hat{y}_i = variável dependente estimada pela equação de regressão;

\bar{y} = média das respostas medidas;

\bar{x} = média das concentrações conhecidas;

y_{kj} = j-ésima resposta medida do k-ésimo nível de concentração;

y_k = média de respostas medidas do k-ésimo nível de concentração;

\hat{y}_k = variável dependente estimada pela equação de regressão para o k-ésimo nível de concentração.

Para avaliação da regressão, testa-se a hipótese nula de que a regressão linear não é significativa (variação dos valores de y_i não é explicada pela regressão) e a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa (variação dos valores de y_i é explicada pela regressão). Rejeita-se a hipótese nula se o valor de F for maior que o valor crítico $F_{(1-\alpha;1;n-2)}$. Em relação à significância do desvio da linearidade, confronta-se a hipótese nula de adequação ao modelo linear simples (não há desvio da linearidade) com a hipótese alternativa de inadequação ao modelo linear (há desvio da linearidade). A hipótese nula é rejeitada quando o valor de F for maior que o valor crítico $F_{(1-\alpha;u-2;n-2)}$. Outra análise a ser realizada se refere à significância da distribuição $F(p)$. Para a regressão linear dos resíduos, p deve ser inferior a 0,001, já para o desvio da linearidade, p deve ser superior a 0,05 (Bomfim, 2008).

O teste de Grubbs aplicado a cada nível de concentração analisado não revelou a presença de valores aberrantes. O gráfico dos resíduos em torno da média (zero) é apresentado na Figura 21 e 22.

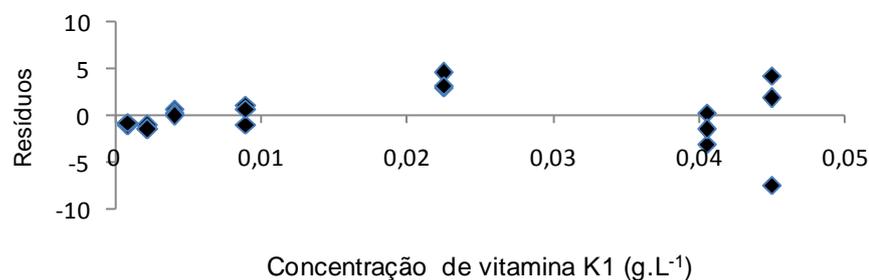


Figura 21: Gráfico de resíduos da curva analítica para a vitamina K1.

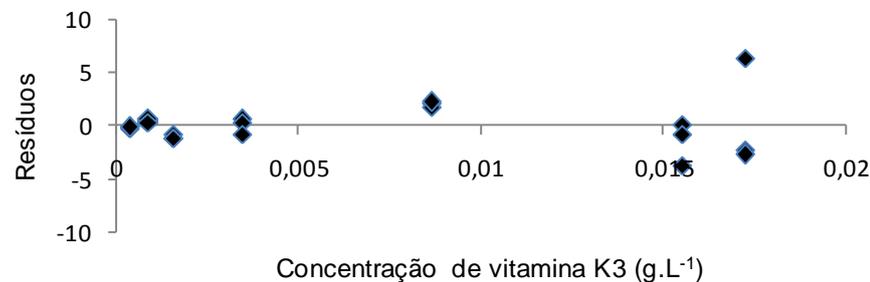


Figura 22: Gráfico de resíduos da curva analítica para a vitamina K3.

O teste de normalidade dos resíduos demonstrou que os dados, tanto para a vitamina K1 quanto para a vitamina K3, seguem uma distribuição normal, já que o coeficiente de correlação Ryan-Joiner calculado foi superior ao valor crítico estabelecido (Tabela 12). Logo, se aceita a hipótese nula de que os dados seguem a distribuição normal.

A análise da homogeneidade das variâncias dos resíduos realizada pelo teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe, demonstrou que as variâncias dos resíduos da regressão são constantes (Tabela 12). As estatísticas de análise são os valores de t_L e a significância p . Tanto para a vitamina K1 quanto para a vitamina K3 o valor de t_L calculado foi inferior ao tabelado e a significância p calculada superior a 0,05, logo conclui-se que há homogeneidade das variâncias dos resíduos.

A análise da autocorrelação dos resíduos da regressão foi realizada por meio do teste de Durbin-Watson, o valor de d obtido foi superior aos valores críticos tanto para a vitamina K1 quanto para a vitamina K3 (Tabela 12), demonstrando a independência dos resíduos da regressão.

O ajuste ao modelo linear e a significância da regressão foi verificado por meio da ANOVA. A análise demonstrou regressões significativas ($p < 0,001$) e o ajuste ao modelo linear ($p > 0,05$) tanto para a vitamina K1 quanto para a vitamina K3.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos a partir da avaliação das premissas relativas à linearidade.

Tabela 12: Análise das premissas relativas à linearidade.

Parâmetros	K1	K3
Normalidade dos Resíduos		
R_{eq}	0,95	0,95
R_{crit} ($\alpha=0,05$)	0,95	0,95
Autocorrelação dos Resíduos		
d (calculado)	2,22	1,44
d_L (Limite inferior) $\alpha=0,05$	1,22	1,22
d_U (Limite superior) $\alpha=0,05$	1,42	1,42
Homogeneidade da Variância dos Resíduos		
$t_{Lcalculado}$	1,63	1,56
$t_{tabelado}$ ($\alpha=0,05$)	2,09	2,09
p	0,12	0,14
Análise da Variância (ANOVA)		
Regressão (p)	$8,75 \times 10^{-26}$	$8,55 \times 10^{-25}$
Desvio da linearidade (p)	0,19	0,42

Para ambas as vitaminas, as curvas analíticas apresentaram comportamento linear, o qual é demonstrado pelos resultados do coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 (Anvisa, 2003a). O bom ajuste ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória no gráfico dos resíduos em torno da média (zero) apresentada na Figura 21 e na Figura 22.

6.2.1.3. Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD), obtido por meio da análise de sete soluções contendo a menor concentração dos analitos que se consegue visualmente observar no eletroferograma, foi calculado por meio da Equação 35 (Inmetro, 2011). O método de obtenção do s , a partir das soluções contendo as menores concentrações dos analitos foi adotado devido à dificuldade de medição de um sinal de branco (o sinal do branco é praticamente zero).

$$LOD = x_b + 3s \quad (35)$$

onde x_b é a média dos valores medidos para os brancos e s é o desvio padrão das sete medições da menor concentração do analito.

O limite de quantificação (LOQ) foi realizado de modo semelhante à determinação do LOD, utilizando-se, no entanto a Equação 36.

$$LOQ = x_b + 10s \quad (36)$$

O cálculo de LOD e de LOQ também pode ser realizado com a cela de caminho óptico alongado (caminho óptico de 1200 μm). O uso da cela teve como objetivo aumentar em 16 vezes o caminho óptico quando comparado com a medição tradicional perpendicular ao capilar de 75 μm . Com isso, é possível melhorar os limites de detecção e de quantificação em uma ordem de grandeza. Para efeito de comparação na Tabela 13 estão apresentados os valores de LOD e LOQ com a cela tradicional e a cela de caminho óptico alongado, bem como valores de LOD e LOQ obtidos por outros métodos, por exemplo, os baseados em cromatografia gasosa (Reto *et al.*, 2007) e em HPLC (Man Po *et al.*, 1996; Petritz *et al.*, 2005; Kienen *et al.*, 2007; Orsi *et al.*, 2008).

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.

	Método	Analito	LOD (g.L^{-1})	LOQ (g.L^{-1})
Presente trabalho (cela tradicional)	MEKC	K1	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$
		K3	$4,3 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^{-4}$
Presente trabalho (cela de caminho óptico alongado)	MEKC	K1	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$
		K3	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$
Reto <i>et al.</i> , 2007	GC	K1	$1,6 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4}$
Kienen <i>et al.</i> , 2007	HPLC	K1	$8,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-3}$
		K1	$2,5 \times 10^{-4}$	-
Man Po <i>et al.</i> , 1996	HPLC	K3	$2,0 \times 10^{-5}$	-
		K1	$5,0 \times 10^{-3}$	-
Petritz <i>et al.</i> , 2005	HPLC	K1	$5,0 \times 10^{-3}$	-
		K1	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$
Orsi <i>et al.</i> , 2008 (método de referência)	HPLC	K3	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$

A partir da análise dos resultados observa-se que o uso da cela possibilitou uma melhora tanto do LOD quanto do LOQ para ambas as vitaminas em cerca

de uma ordem de grandeza. Os resultados foram considerados satisfatórios, já que a detectabilidade do método proposto após utilização da cela de caminho óptico alongado se encontra na mesma ordem de grandeza de outros métodos descritos na literatura como indicado na Tabela 13.

6.2.1.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação realizados aplicando-se o método desenvolvido em amostras de chá (infusões fortificadas com vitamina K1) e em amostras de suplemento vitamínico contendo a vitamina K1 e fortificadas com a vitamina K3. O procedimento para cada uma das amostras foi feito conforme procedimento descrito no Capítulo 5.

O cálculo para obtenção da recuperação analítica foi realizado conforme Equação 37 (Inmetro, 2011). Os resultados médios de recuperação considerados adequados são estabelecidos em função da concentração do analito (Tabela 14) (Brito *et al.* 2003). Na Tabela 14 se destaca, em negrito, a faixa relativa à concentração dos analitos nas amostras analisadas nesse trabalho.

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{valor}_{\text{observado}}}{\text{valor}_{\text{esperado}}} \times 100 \quad (37)$$

Tabela 14: Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito	Intervalo de recuperação aceito, %
≥ 10 %	98 - 102
≥ 1 %	97 - 103
≥ 0,1 %	95- 105
≥ 0,01%	90 - 107
≥ 0,001 – 0,00001	80 - 110
≥ 0,000001	60 - 115
≥ 0,0000001	40 - 120

Na Tabela 15 são apresentados os resultados de recuperação obtidos para as medições de vitaminas K1 e K3 nas amostras de suplemento vitamínico e chá, utilizando o método proposto no presente trabalho.

Tabela 15: Coeficientes de recuperação obtidos na análise de amostras de suplemento vitamínico e chá utilizando o método proposto.

Analitos	Amostras	
	Suplemento Vitamínico (n=3)	Chá (n=3)
Vitamina K1	101 ± 2%	103 ± 2%
Vitamina K3	99 ± 3%	-

Os coeficientes de recuperação obtidos estão enquadrados nos limites (entre 95 e 105%) descritos na literatura (Brito *et al.* 2003), já que a concentração do analito na solução final das amostras analisadas foi de $4,1 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ para a vitamina K1 e $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ para a vitamina K3, ambas maiores que 0,1%.

Para avaliar a exatidão, também foi realizada comparação dos resultados obtidos com o método proposto por MEKC e os obtidos com o método de referência, baseado em HPLC (Orsi *et al.*, 2008). Realizou-se a construção de curvas analíticas para ambos os métodos utilizando-se soluções padrão em diferentes concentrações, dentro da faixa de trabalho do método proposto. Em seguida foram feitas as medições em replicatas autênticas, comparando os resultados obtidos por meio do teste de hipótese (teste *t* de *student*). Os resultados (Tabela 16 e 17) mostraram que não houve diferença significativa para o nível de 95% de confiança entre os métodos.

Tabela 16: Resultados encontrados entre o método proposto (MEKC) e o método HPLC de referência para a análise de solução padrão de vitamina K1.

Nº de replicatas (n)	K1: $4,0 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$		K1: $2,3 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$	
	MEKC (g.L^{-1})	HPLC (g.L^{-1})	MEKC (g.L^{-1})	HPLC (g.L^{-1})
1	$3,8 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
2	$3,9 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
3	$3,7 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
4	$3,7 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
5	$4,0 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
\bar{x}	$3,8 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
s	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-5}$
n	5	5	5	5
$t_{\text{calc.}}$	1,4		0,7	
$t_{\text{tab.}}$	2,8		2,6	

Tabela 17: Resultados encontrados entre o método proposto (MEKC) e o método HPLC de referência para a análise de solução padrão de vitamina K3.

Nº de replicatas (n)	K3: $1,5 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$		K3: $8,6 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$	
	MEKC (g.L^{-1})	HPLC (g.L^{-1})	MEKC (g.L^{-1})	HPLC (g.L^{-1})
1	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-3}$
2	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-3}$
3	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-3}$
4	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-3}$
5	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,4 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-3}$
\bar{x}	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-3}$
s	$3,2 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^{-6}$
n	5	5	5	5
$t_{\text{calc.}}$		0,4		1,0
$t_{\text{tab.}}$		2,8		2,8

6.2.1.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos da repetitividade e da precisão intermediária.

A repetitividade foi calculada pelo desvio padrão relativo (%CV) indicado na Equação 38. Foram avaliados três níveis de concentração ao longo da faixa de trabalho (ponto acima do LQ, ponto médio da curva, ponto superior da curva), sendo que para cada nível foram realizadas cinco replicatas (Inmetro, 2011; Anvisa, 2003a).

$$CV(\%) = RSD = \frac{s_r}{M_{\text{medição}}} \times 100 \quad (38)$$

onde s_r é a estimativa do desvio padrão, $M_{\text{medição}}$ é a média das determinações.

A avaliação da repetitividade foi realizada a partir do valor de Horrat, o qual pode ser obtido a partir do RSD_R , que corresponde ao desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade. A função de Horwitz é uma equação de precisão generalizada independente do analito e da matriz, sendo dependente apenas da concentração para a maioria dos métodos de análise de rotina, sendo dada pela Equação 39 (Inmetro, 2011; UE, 2002).

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (39)$$

onde C é a fração em massa do componente analisado. Em condições de repetitividade o valor de HorRat (Equação 40) pode ser obtido a partir do CV(%) dividido pelo RSD_r estimado, o qual está entre 1/2 a 2/3 de RSD_R .

$$HorRat = \frac{CV(\%)}{2/3 RSD_R} \quad (40)$$

Para a vitamina K1 os valores de repetitividade ficaram entre 1 a 2%, já para a vitamina K3 obtiveram-se valores entre 2 a 7%. Segundo o documento regulatório da Anvisa, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, não se admitem valores superiores a 5% para o CV(%), no entanto os valores de Horrat (Tabela 18) obtidos em todos os níveis de concentração avaliados foram menores do que 1, o que indica que a metodologia pode ser considerada repetitiva, já que, segundo Horwitz e Albert (2006), valores de Horrat menores ou iguais a 2 indicam que o método apresenta repetitividade adequada (Horwitz & Albert, 2006).

Tabela 18: Avaliação da repetitividade para cada nível de concentração

	Concentração g.L ⁻¹	Valor calculado (Horrat)
K1	2,3 x 10 ⁻³	0,2
	2,3 x 10 ⁻²	0,1
	4,5 x 10 ⁻²	0,2
K3	8,6 x 10 ⁻⁴	0,6
	8,6 x 10 ⁻³	0,3
	1,7 x 10 ⁻²	0,3

A precisão intermediária foi calculada a partir de experimentos realizados em dois dias diferentes. Analisou-se a mesma solução padrão em três níveis de concentração ao longo da faixa de trabalho (ponto acima do LQ, ponto médio da curva, ponto superior da curva), sendo que para cada nível foram realizados cinco replicatas, em um intervalo de 24 h. O coeficiente de variação pode ser obtido a partir do desvio padrão da precisão intermediária (Equação 41) e da média das medições dos dois dias (Inmetro, 2011; Bomfim, 2008).

$$Spi_{(jk)} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y})^2}{t(n-1)}} \quad (41)$$

Onde:

t = total de amostras ensaiadas;

n = total de ensaios efetuados por amostra;

j = nº da amostra, j = 1, t;

k = nº do ensaio da amostra j, k = 1, n;

y_{jk} = valor do resultado k para a amostra j;

y_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j.

No entanto, como foram efetuados ensaios em dois dias diferentes (n=2), utilizou-se a Equação 42.

$$Spi_{(jk)} = \sqrt{\frac{1 \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}{2t}} \quad (42)$$

Onde:

y_{j1} = resultado médio obtido para a amostra j no primeiro dia;

y_{j2} = resultado médio obtido para a amostra j no segundo dia.

Utilizou-se o teste F baseado no princípio da ANOVA, de modo a verificar se existe diferença significativa entre as variâncias das análises obtidas em dois diferentes dias. O valor de F é obtido a partir da Equação 43 (Skoog *et al.*, 2005):

$$F = \frac{MQF}{MQE} \quad (43)$$

sendo, MQF a soma das médias quadráticas entre dias e MQE a soma das médias quadráticas de cada dia. A partir dos valores de F encontrados (Tabelas 19 e 20) pode-se afirmar que não há diferença significativa entre as variâncias das análises realizadas em dois dias diferentes, já que $F_{cal} < F_{critico}$ para todos os níveis. Comparou-se também a média dos resultados obtidos a partir do estudo da precisão intermediária através do teste t, e os mesmos indicaram não haver diferença significativa entre as médias das análises realizadas em dois dias diferentes.

A Tabela 19 e a Tabela 20 apresentam os dados obtidos no estudo de precisão para as vitaminas K1 e K3, respectivamente.

Tabela 19: Precisão (repetitividade e precisão intermediária) para a vitamina K1.

Níveis	Repetitividade (%)	Precisão intermediária (%)	F calc.	F crítico	T calc.	T crítico
1	1,6	2,7	1,5		-1,2	
2	0,6	1,3	1,7	5,3	1,3	2,3
3	1,3	4,6	4,3		-2,1	

Níveis: 1 = $2,25 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹; 2 = $2,25 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹; 3 = $4,51 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹.

Tabela 20: Precisão (repetitividade e precisão intermediária) para a vitamina K3.

Níveis	Repetitividade (%)	Precisão intermediária (%)	F calc.	F crítico	T calc.	T crítico
1	6,7	2,5	0,3		0,5	
2	2,7	1,5	2,2	5,3	0,0	2,3
3	1,8	7,1	2,5		-1,6	

Níveis: 1 = $8,61 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹; 2 = $8,61 \times 10^{-3}$ g.L⁻¹; 3 = $1,72 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹.

A precisão intermediária obtida pode ser considerada adequada, já que de acordo com Wood (1999) são aceitos RSD de até 8%, na faixa de concentração de 10^{-2} a 10^{-4} g.L⁻¹.

6.3. Incerteza de Medição

A incerteza associada ao método desenvolvido foi estimada conforme descrito no item 4.3, com base no Guia para a expressão da incerteza de medição (JCGM 100:2008). As componentes relevantes foram agrupadas em quatro grupos principais: (i) Preparo de soluções críticas, (ii) Repetitividade, (iii) Precisão intermediária, (iv) Curva analítica. Uma vez estimada a incerteza de cada componente, calculou-se a incerteza combinada e expandida. A Figura 23 mostra o diagrama de causa e efeito considerado na indicação das fontes das incertezas mais relevantes para o processo de medição para quantificação de vitamina K por MEKC.

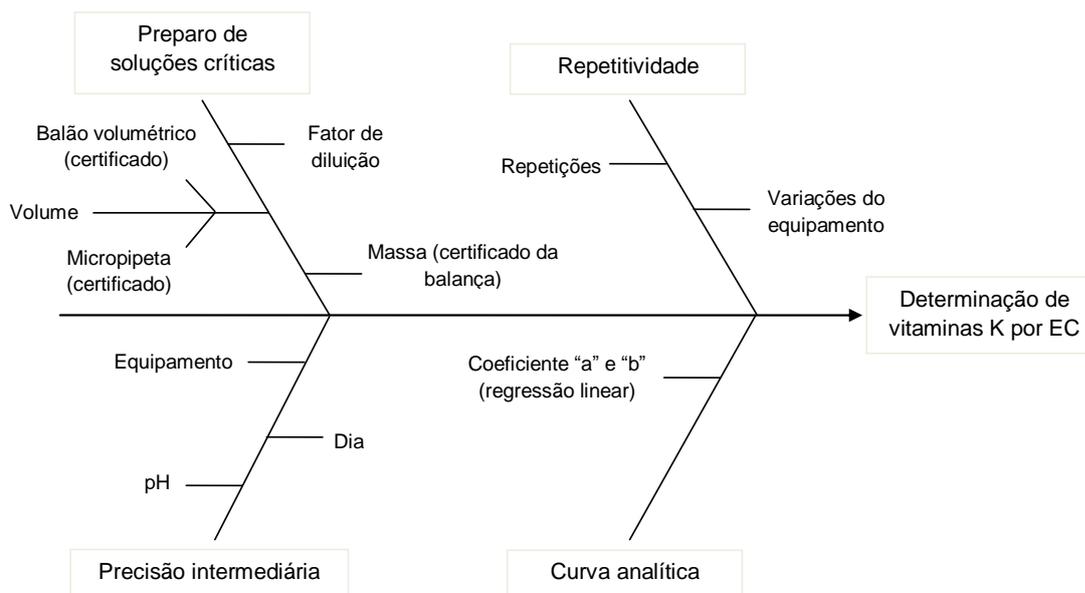


Figura 23: Diagrama de causa e efeito considerando as fontes de incerteza mais relevantes para o método de determinação de vitamina K desenvolvido.

Para o cálculo da incerteza associada ao preparo de soluções críticas (u_s), os parâmetros considerados foram: massa do analito, balão volumétrico, micropipeta e fator de diluição. O cálculo foi realizado conforme Equação 44.

$$u_s = \sqrt{\left[\left(\frac{U_{mpl}}{k} \right)^2 + \left(\frac{U_{bv}}{k} \right)^2 \right] \times (U_{fd}) + \left(\frac{U_{bal}}{k} \right)^2} \quad (44)$$

sendo, U_{mpl} a incerteza da micropipeta de 10-1000 μL , U_{bv} a incerteza do balão volumétrico, U_{fd} a incerteza do fator de diluição, U_{bal} a incerteza da balança e k o fator de abrangência de cada componente. A incerteza combinada de cada componente é dada pela razão entre o valor da incerteza expandida “U” expressa no certificado de calibração e o fator de abrangência “k”. Os certificados referentes às calibrações da balança, micropipetas e balão volumétrico se encontram nos anexos I, IV, V e VI.

A incerteza associada à repetitividade (u_r) foi estimada a partir do desvio padrão “ s_r ” resultante da análise em quintuplicata de três níveis de concentração (ponto acima do LQ, ponto médio da curva, ponto superior da curva) de soluções padrões das vitaminas K1 e K3. A incerteza associada à precisão intermediária (u_{pi}) foi obtida do mesmo modo que a incerteza da repetitividade, porém o

cálculo foi realizado a partir da estimativa do desvio padrão da precisão intermediária “ s_{pi} ”. Ambas as incertezas foram obtidas a partir das Equações 38 e 39.

Já para a realização do cálculo da incerteza associada à curva analítica utilizou-se a Equação 45:

$$u_{curva} = \sqrt{\left[(c_{ia}^2 \times s^2 a) + (c_{ib}^2 \times s^2 b) + (2 \times c_{ia} \times c_{ib} \times u_a \times u_b \times r) \right]} \quad (45)$$

onde c_{ia} e c_{ib} são coeficientes de sensibilidade, s_a e s_b são os desvios padrões dos coeficientes angular e linear respectivamente e r é o coeficiente de correlação.

Os coeficientes de sensibilidade são usados para uniformizar as unidades das grandezas de entrada em relação à unidade do mensurando e podem ser obtidos a partir das Equações 46 e 47. Onde “ b ” é a intercepção da reta e “ a ” é a inclinação da reta.

$$c_{ia} = \frac{y_{maior(u.a.)} - b}{a^2} \quad (46)$$

$$c_{ib} = -1/a \quad (47)$$

Os desvios padrões e o coeficiente de correlação podem ser obtidos a partir das Equações 48, 49 e 50.

$$s_a^2 = \frac{s^2 \times \sum C^2}{D} \quad (48)$$

$$s_b^2 = \frac{n \times s^2}{D} \quad (49)$$

$$r = -\frac{\sum C}{\sqrt{(n \times \sum C^2)}} \quad (50)$$

sendo C a concentração do analito utilizado para a construção da curva e n o número de pontos. Os valores de s^2 e D correspondem à variância e ao desvio da curva respectivamente, sendo dados pelas Equações 51 e 52.

$$D = (n \times \sum C^2) - (\sum C)^2 \quad (51)$$

$$s^2 = \frac{\sum \Delta^2}{n-2} \quad (52)$$

onde Δ é a diferença entre o valor teórico de C ($C_{\text{teórico}}$) no melhor ajuste da curva e o valor experimental de C ($C_{\text{experimental}}$). As incertezas u_a e u_b são obtidas a partir das Equações 53 e 54.

$$u_a = s_a \quad (53)$$

$$u_b = s_b \quad (54)$$

A incerteza combinada (u_c), obtida pela raiz quadrada da soma quadrática de todas as contribuições de incerteza relativas à medição das vitaminas K1 e K3, bem como a incerteza expandida e demais incertezas associadas à medição são apresentadas na Tabela 21 e na Tabela 22. Na Figura 24 e na Figura 25 são apresentados os gráficos de contribuição referentes a cada fonte de incerteza associada.

Tabela 21: Valores das incertezas das fontes mais relevantes para a vitamina K1.

Fontes de incerteza	Concentração K1 (g.L ⁻¹)		
	2,3 x 10 ⁻³	2,3 x 10 ⁻²	4,5 x 10 ⁻²
Repetitividade (u_r)	4,6 x 10 ⁻⁵	2,9 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻³
Precisão intermediária (u_{pi})	1,4 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻³
Curva analítica (u_{curva})	4,2 x 10 ⁻⁴	4,2 x 10 ⁻⁴	4,2 x 10 ⁻⁴
Preparo da solução (u_s)	3,3 x 10 ⁻⁴	2,4 x 10 ⁻⁴	2,4 x 10 ⁻⁴
Incerteza Combinada (u_c)	5,4 x 10 ⁻⁴ (30%)	5,7 x 10 ⁻⁴ (2%)	2,2 x 10 ⁻³ (5%)
Incerteza Expandida ($U_{k=2; 95\%}$)	1,1 x 10 ⁻³	1,2 x 10 ⁻³	4,7 x 10 ⁻³

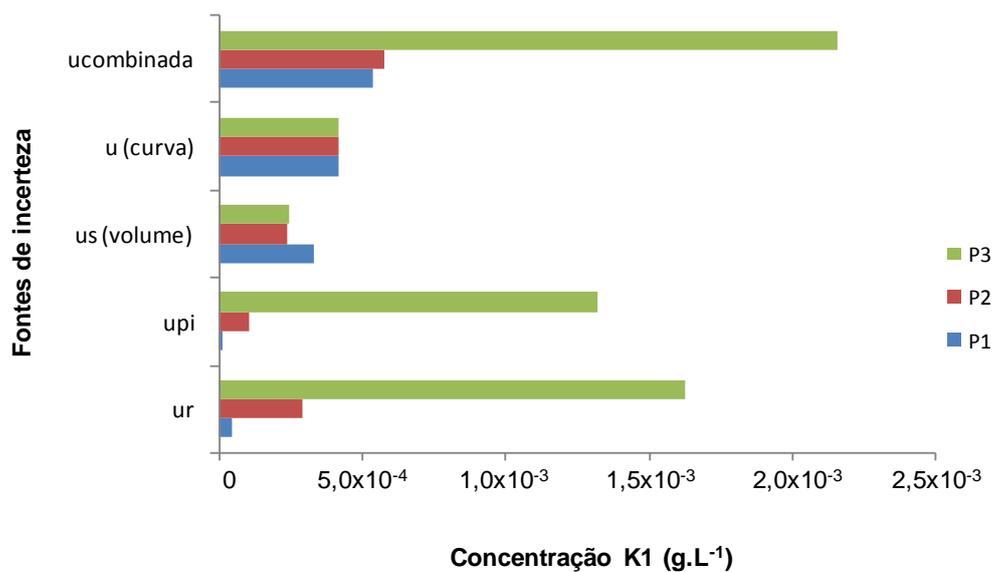


Figura 24: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u_c) da medição de vitamina K1 para as seguintes concentrações: (P1) $2,3 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$, (P2) $2,3 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$, (P3) $4,5 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 22: Valores das incertezas das fontes mais relevantes para a vitamina K3.

Fontes de incerteza	Concentração K3 (g.L^{-1})		
	$8,6 \times 10^{-4}$	$8,6 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-2}$
Repetitividade (u_r)	$6,0 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$
Precisão intermediária (u_{pi})	$2,3 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-5}$	$5,9 \times 10^{-4}$
Curva analítica (u_{curva})	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$
Preparo da solução (u_s)	$1,3 \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-5}$
Incerteza Combinada (u_c)	$2,3 \times 10^{-4}$ (26%)	$3,1 \times 10^{-4}$ (3%)	$1,2 \times 10^{-3}$ (8%)
Incerteza Expandida ($U_{k=2; 95\%}$)	$4,5 \times 10^{-4}$	$6,4 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-3}$

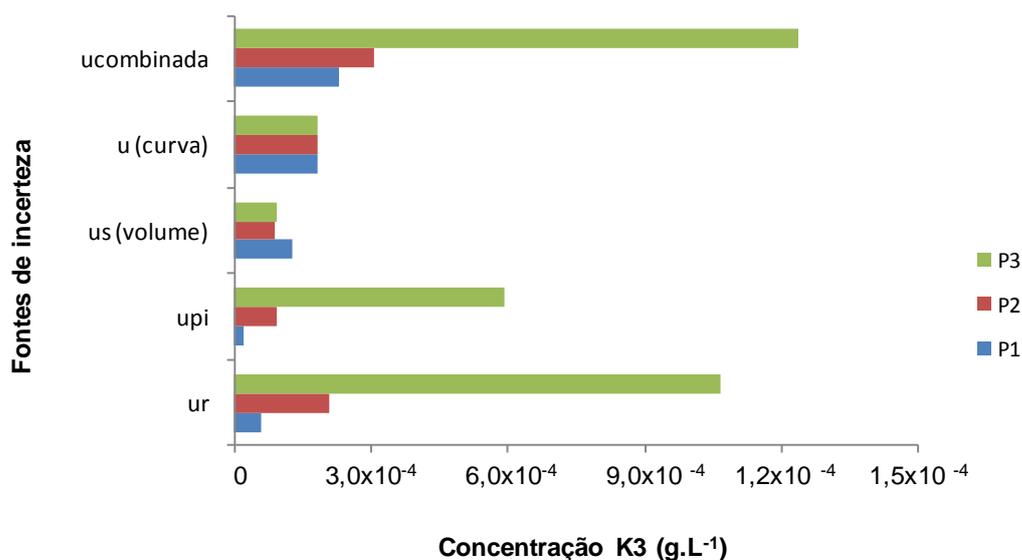


Figura 25: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u_c) da medição de vitamina K3 para as seguintes concentrações: (P1) $8,6 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$, (P2) $8,6 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$, (P3) $1,7 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$.

A partir dos resultados apresentados observa-se que tanto para a vitamina K1 quanto para a vitamina K3 no ponto P1 as fontes que mais contribuem para a incerteza estão associadas à construção da curva analítica e ao preparo das soluções, o que já era esperado, já que o ponto analisado se encontra próximo ao limite de quantificação, apresentando, portanto o maior erro. Uma alternativa para minimizar a incerteza neste ponto seria fazer o desdobramento da curva analítica em duas e realizar o preparo das soluções por meio de ajuste de massa, o que levaria em conta apenas a incerteza da balança analítica, minimizando assim o valor de μ_s .

Já para os pontos P2 e P3, observa-se que tanto para a vitamina K1 como para a vitamina K3 conforme se aumenta a concentração a incerteza associada à repetitividade e a precisão intermediária aumentam, no entanto este aumento é proporcional ao aumento da concentração analisada das vitaminas, possuindo uma contribuição mínima na incerteza final, já que nestes pontos o valor desta já é baixo.