



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINA K1 EM CHÁS

*Tatiane Vidal D. Gomes*¹, *Anastácia Sá P. da Silva*², *Alessandra Licursi M. C. Cunha*³, *Elisabeth Costa Monteiro*⁴, *Ricardo Q. Aucélio*⁵.

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, tatianevdg@gmail.com

² Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil, anastaciasps@yahoo.com.br

³ Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil, ale.licursi@gmail.com

⁴ Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil, beth@puc-rio.br

⁵ Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil, aucelior@puc-rio.br

Resumo: Um método analítico baseado na eletroforese capilar com detecção por fotometria de absorção molecular foi desenvolvido e validado para separação e determinação de vitamina K1 em chá verde. O limite de detecção encontra-se na ordem de 10^{-4} g L⁻¹ nas condições experimentais: 25 °C, 25 kV, 18,22 g L⁻¹ de CTAB na solução tampão borato e 10% de acetonitrila na solução da amostra.

Palavras-chave: vitamina K, eletroforese capilar, validação de método analítico.

1. INTRODUÇÃO

O chá verde é um dos chás mais consumidos nos países orientais, e seu consumo vem aumentando no ocidente devido às suas propriedades funcionais. Os benefícios do chá verde têm sido mostrados em diversos estudos, destacando-se a redução dos níveis de colesterol, os efeitos preventivos contra a arteriosclerose, a atividade antioxidante e a prevenção de doenças crônico-degenerativas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares [1,2].

As folhas do chá verde - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze-*Theaceae* contém vários grupos de substâncias, tais como: proteínas, aminoácidos, minerais, vitaminas e compostos antioxidantes como os polifenóis e catequinas [2,3]. Os compostos antioxidantes são os mais estudados [2], no entanto, o interesse por outros compostos tem crescido, entre eles, a vitamina K1 (filoquinona), que está presente em quantidades significativas no chá, variando em função de fatores como: estocagem, condições geográficas e processamento [4,5].

O termo vitamina K é usado para descrever todas as substâncias que têm como núcleo o grupamento 2-metil-1,4-naftoquinona, bem como seus derivados que exibem atividade anti-hemorrágica [6]. A vitamina K está presente na natureza em duas formas principais: a filoquinona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona), também chamada de vitamina K1, que é sintetizada pelos vegetais verdes; e as menaquinonas, também chamadas de vitamina K2, que são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias do trato intestinal de um grande número de espécies. As

menaquinonas englobam a série de vitaminas designadas MK-n, onde o n representa o número de resíduos isoprenóides na cadeia lateral, podendo variar de MK-4 a MK-13. Ambas as formas naturais possuem um anel 2-metil-1,4-naftoquinona e cadeias laterais alquiladas [6-8].

As menadionas (2-metil-1,4 naftoquinona), chamadas de vitamina K3, são substâncias sintéticas, duas vezes mais potentes se comparadas às formas naturais de vitaminas K1 e K2. Utiliza-se comumente a vitamina K3 para fortificar rações animais [7,8].

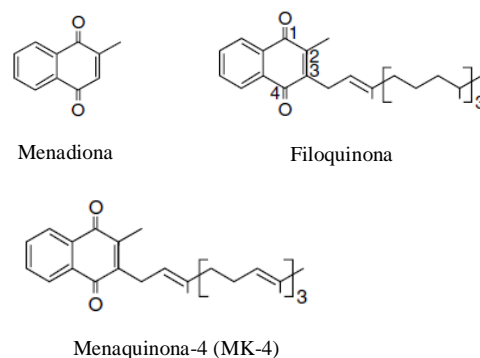


Figura 1: Fórmulas estruturais das vitaminas K.

As vitaminas K (Figura 1) têm como função principal promover a síntese dos fatores de coagulação sanguínea [2,3]. Neste processo a vitamina é oxidada a um epóxido e em seguida retorna a sua forma hidroquinona por meio da ação da enzima epóxido redutase. Esta enzima é inibida por agentes anticoagulantes cumarínicos como a varfarina e o dicumarol [1,5]. Como o uso de anticoagulantes é comum em pessoas com doenças cardiovasculares, e como o consumo de chá verde vem sendo associado a uma dieta saudável, a determinação de vitamina K presente em folhas de chá verde e em suas infusões, se torna de fundamental importância, já que a administração exógena de vitamina K pode inibir o efeito anticoagulante da varfarina [4]. Além disso, doses elevadas de vitaminas A e E, frequentemente utilizadas como antioxidantes podem antagonizar o efeito da vitamina K, ampliando a necessidade de sua ingestão. Outro

aspecto relevante é o fato das pesquisas apontarem a vitamina K como um importante fator no processo de mineralização óssea [7,9], sendo essencial tanto no desenvolvimento precoce do esqueleto, quanto na manutenção do osso maduro sadio. Estudos recentes têm destacado que, embora a definição das necessidades diárias de vitamina K seja adequada para manter a coagulação sanguínea em níveis normais, a mesma pode ser insuficiente para a manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo [7].

A técnica comumente utilizada na determinação de vitamina K é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), com detecção fotométrica (absorção ou fluorescência) [5,10,11]. No entanto esta técnica apresenta algumas desvantagens como: alto consumo de solventes, alto custo de consumíveis e geração de quantidade relativamente grande de resíduos.

Outra técnica também utilizada na determinação de vitaminas é a cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*). No entanto, esta técnica não é apropriada para a determinação de vitaminas lipossolúveis, já que estas possuem baixa volatilidade [12]. Reto *et al.* desenvolveram um método de determinação de vitamina K1 em amostras de chá, utilizando GC com detector de ionização em chama [2]. O limite de detecção obtido foi da ordem de $4,50 \times 10^{-5}$ g L⁻¹ e o de quantificação da ordem de $4,50 \times 10^{-4}$ g L⁻¹. No entanto todas as infusões dos chás analisadas apresentaram concentrações menores que o limite de detecção [2].

Como proposta deste trabalho e uma alternativa ao uso das técnicas de HPLC e GC na separação do analito da matriz do chá, a eletroforese capilar (CE – *Capillary Electrophoresis*) oferece vantagens em relação aos pontos negativos aqui apontados para o uso do HPLC e GC, além de apresentar características como: alta resolução, rapidez nas determinações e elevada eficiência na separação. A CE é uma técnica analítica de separação baseada no movimento diferencial de espécies carregadas sob o efeito de um campo elétrico, e que pode ser associada com diversos modos de detecção das espécies de interesse [13].

No presente trabalho, um método para a determinação de vitamina K1 em chá verde por CE foi desenvolvido e validado, incluindo o cálculo das incertezas, que é um importante requisito para suporte às atividades metrológicas em medições químicas e de garantia da qualidade dos produtos nas indústrias químicas, farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos e outras [14]. Um processo de validação deve se iniciar no planejamento da estratégia analítica e prosseguir ao longo de seu desenvolvimento [15].

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação de vitamina K1 em amostras de chá verde, validando-o segundo preceitos metrológicos, com base nos direcionamentos descritos na resolução ANVISA n° 899 (2003) e no documento INMETRO DOQ-CGRC-008 (2010) [16, 17].

3. MÉTODO

O método foi desenvolvido em um equipamento comercial de eletroforese capilar Hewlett – Packard –

Agilent. O instrumento apresenta um detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos (operação na faixa de 190-600 nm); controlador de temperatura do tipo Peltier; um sistema automático de injeção de amostra e programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent.

As análises foram realizadas em um capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total (52 cm até o detector) e 75 µm de diâmetro interno.

As amostras de chá foram adquiridas em um supermercado no Rio de Janeiro. O procedimento de preparo foi seguido de acordo com o descrito por Reto *et al.* (2007) [2]. Uma massa de 1,5 g de chá (um sachê) foi colocada em um bêquer e em seguida 0,25 L de água fervente foi adicionada e o chá foi deixado em infusão por cerca de 10 minutos.

Para a determinação da vitamina K1 nas amostras de chá foi preparada uma solução contendo 10% de acetonitrila, 18,22 g L⁻¹ de CTAB e 50% de chá.

Os eletroferogramas da vitamina K1 foram obtidos com detecção fotométrica de absorção em 248 nm. As medições foram realizadas a uma temperatura constante de 25°C e com aplicação de diferença de potencial negativa de 25 kV. O modo de injeção utilizado foi hidrodinâmico, com pressão de 5000 Pa (50 mbar) por 15 s.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização

De modo a otimizar as condições para a determinação de vitamina K1 em amostras de chá, foram realizados estudos univariados de temperatura, diferença de potencial aplicada, concentração de surfactante na solução tampão e na solução da amostra de interesse, e percentual de solvente orgânico na amostra. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de surfactante na solução tampão até 18,22 g L⁻¹, contribuiu para uma melhor resolução do pico; e concentrações maiores provocam o entupimento do capilar inviabilizando as análises. Na solução da amostra variou-se o percentual de modificador orgânico, acetonitrila (ACN), de modo a verificar a influência no tempo e resolução das análises. Os resultados mostraram que concentrações de ACN maiores que 40% provocaram deformação no pico. Na Figura 2 é apresentado o eletroferograma da vitamina K1 obtido após estudo univariado e descrição das condições experimentais de análise.

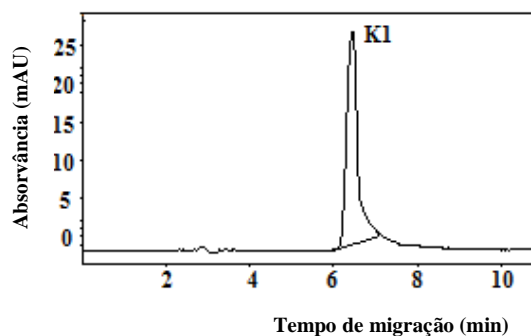


Figura2: Análise da vitamina K1 em solução padrão ($1,80 \times 10^{-1}$ g L⁻¹). Eletrólito de trabalho: 3,09 g L⁻¹ de borato, 18,22 g L⁻¹ de CTAB, pH

8,50, 20% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos), V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 248 nm. Eletroferogramas de solução padrão de vitamina K1.

Na Tabela 1 estão resumidas as condições experimentais para a determinação de vitamina K1 em amostras de chá verde.

Tabela 1: Resumo das condições experimentais selecionadas para a determinação de vitamina K1

Parâmetros	Condições Experimentais
Temperatura	25°C
Voltagem	25kV
Tampão Borato	3,09 g L ⁻¹ 18,22 g L ⁻¹ CTAB 20% ACN

4.2. Parâmetros Analíticos de Mérito (PAM)

Os parâmetros analíticos de mérito para a determinação da vitamina K1 foram obtidos a partir das condições experimentais selecionadas nos estudos univariados.

A faixa de resposta linear foi obtida a partir da construção de duas curvas analíticas, utilizando a relação entre a concentração da solução padrão de vitamina K1 e a área do pico. Cada ponto da curva foi o resultado médio de três medições. Os parâmetros das curvas foram determinados pela regressão linear simples obtida pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade da resposta foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R²) e o gráfico de resíduos, que demonstrou uma dispersão não tendenciosa (aleatória) dos erros de cada ponto corroborando o comportamento homoscedástico da curva analítica.

Para a determinação da vitamina K1 a faixa de trabalho utilizada foi de 4,42x10⁻⁴ a 4,51x10⁻¹ g L⁻¹. Na Figura 3 é apresentada uma curva analítica para a vitamina K1.

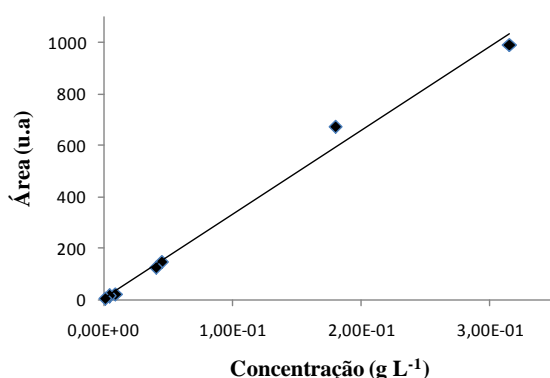


Figura3: Faixa de resposta linear para a vitamina K1.

A precisão foi avaliada em termos da repetitividade das medições usando soluções de vitamina K1 em três diferentes concentrações. O resultado obtido por meio de cinco medições consecutivas produziu um coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) de 4,5%.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método desenvolvido foi baseado no cálculo da média de 7 medições ± o desvio padrão (s_b) da menor concentração de vitamina K1 que se consegue “enxergar” (integração manual no eletroferograma). Os resultados obtidos para o LD e LQ foram de 8,75 x 10⁻⁴ g L⁻¹ e 1,44 x 10⁻³ g L⁻¹ respectivamente.

As infusões de chá analisadas apresentaram concentrações menores que o LD. Tal resultado se deve ao fato da vitamina K1 ser uma vitamina lipossolúvel, logo sua extração com água quente não é um procedimento eficiente.

Algumas estratégias podem ser realizadas para melhorar a detectabilidade do método, como por exemplo, a pré-concentração (com extração em fase sólida – SPE) e no caso específico da CE, a utilização da célula Z e/ou o capilar de caminho estendido.

A avaliação, nesse primeiro momento, do desempenho do método desenvolvido foi realizada por meio de testes de recuperação em amostras de chá que foram fortificadas com vitamina K1. Amostras de chá verde foram enriquecidas com uma quantidade conhecida (1,80 x 10⁻¹ g L⁻¹) de vitamina K1. A média de recuperação foi de 103% (n = 3) utilizando o método proposto.

Os parâmetros analíticos de mérito obtidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros Analíticos de Mérito encontrados para a vitamina K1 em condições otimizadas para a sua determinação.

Parâmetros analíticos de mérito	
Equação da curva	y = 3,27x10 ³ x + 4,25
r ²	0,99
Precisão ^a	2,15x10 ⁻⁴ g L ⁻¹ (4,51%)
Limite de detecção	8,75x10 ⁻⁴ g L ⁻¹
Limite de quantificação	1,44x10 ⁻³ g L ⁻¹

^a Precisão calculada pela repetitividade utilizando a vitamina K1 na concentração de 4,06 x 10⁻³ g L⁻¹.

Paralelamente, com a finalidade de melhorar a detectabilidade e aumentar o sinal analítico da vitamina K1 utilizou-se uma cela de caminho óptico alongado (formato em Z) cujo principal objetivo é aumentar o caminho óptico da detecção em até dez vezes. Com o uso deste sistema o LD e o LQ passaram para 1,46 x 10⁻⁴ g L⁻¹ e 1,62 x 10⁻⁴ g L⁻¹, respectivamente.

Uma comparação com o método de referência por HPLC [20] foi realizada e os resultados obtidos após a comparação das médias (aplicação do teste t de student para o nível de 95% de confiança) foram satisfatórios, mostrando que não há diferença significativa.

4.3. Incerteza da medição

A estimativa das incertezas foi realizada com base nas diretrizes do Guia para a Expressão da Incerteza de Medição e Eurachem [18,19].

As fontes de incerteza: “Repetitividade” (u_r), “Precisão intermediária” (u_{pi}), “Curva analítica” (u_{curva}) e “Preparo de solução padrão de analito” (u_s) foram às fontes mais relevantes nesse processo de medição.

Para estimar o valor de u_r foram escolhidos três pontos (início, meio e fim da curva) e os mesmos foram analisados em triplicata. O valor encontrado foi de $2,15 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ para o ponto de menor concentração ($4,06 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$), $5,95 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ para o meio da curva ($4,06 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$) e $4,47 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ para o fim da curva ($1,80 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$). Para o cálculo de u_{pi} foram realizadas medições em dois dias consecutivos (intervalo de 24 h), de modo a avaliar a estabilidade a curto intervalo de tempo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para cálculo do desvio padrão entre os respectivos dias e o valor encontrado foi de $9,63 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ para o ponto de menor concentração ($4,06 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$), $3,95 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ para o meio da curva ($4,06 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$) e $1,92 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ para o fim da curva ($1,80 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$). Para a estimação de u_s , levaram-se em consideração as etapas e as incertezas dos aparatos usados na preparação das soluções de vitamina K1 para três diferentes concentrações. O valor obtido foi de $1,40 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$, para o ponto de menor concentração ($4,06 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$), $4,42 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ para o meio da curva ($4,06 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$) e $2,10 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ para o fim da curva ($1,80 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$).

O estudo da incerteza da curva analítica foi realizado a partir da construção de duas curvas em duas faixas de trabalho distintas (curva 1 e curva 2), visto que a faixa linear total apresentou uma incerteza associada alta para os pontos de menor concentração. Para o cálculo da u_{curva} foi realizada análise em triplicata dos padrões de vitamina K1 das duas curvas. Após o desdobramento das curvas, a curva 1 (faixa de $9,01 \times 10^{-4}$ a $9,01 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$) apresentou um valor de incerteza de $4,95 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ e a curva 2 ($4,06 \times 10^{-2}$ a $3,15 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$) apresentou um valor de incerteza de $1,15 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$. A incerteza combinada (u_c), obtida pela raiz quadrada da soma quadrática de todas as contribuições de incerteza relativas à medição de vitamina K, bem como a incerteza expandida e demais incertezas associadas à medição são apresentadas na Tabela 3. Na Figura 4 (a, b e c) são apresentados os gráficos de contribuição referentes a cada fonte de incerteza associada.

Tabela 3: Valores de incerteza calculados para o método (g L^{-1}).

	Concentração K1 (g L^{-1})		
Fontes de incerteza	$4,06 \times 10^{-3}$	$4,06 \times 10^{-2}$	$1,80 \times 10^{-1}$
Repetibilidade (u_r)	$2,15 \times 10^{-4}$	$5,95 \times 10^{-4}$	$4,47 \times 10^{-3}$
Precisão intermediária (u_{pi})	$9,63 \times 10^{-5}$	$3,95 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-2}$
Curva analítica (u_{curva})	$4,95 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-2}$
Preparo da solução (u_s)	$1,40 \times 10^{-3}$	$4,42 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$
Incerteza Combinada (u_c)	$1,50 \times 10^{-3}$ (33%)	$1,22 \times 10^{-2}$ (35%)	$2,29 \times 10^{-2}$ (14%)
Incerteza Expandida ($U_{k=2; 95\%}$)	$2,94 \times 10^{-3}$	$2,39 \times 10^{-2}$	$4,58 \times 10^{-2}$

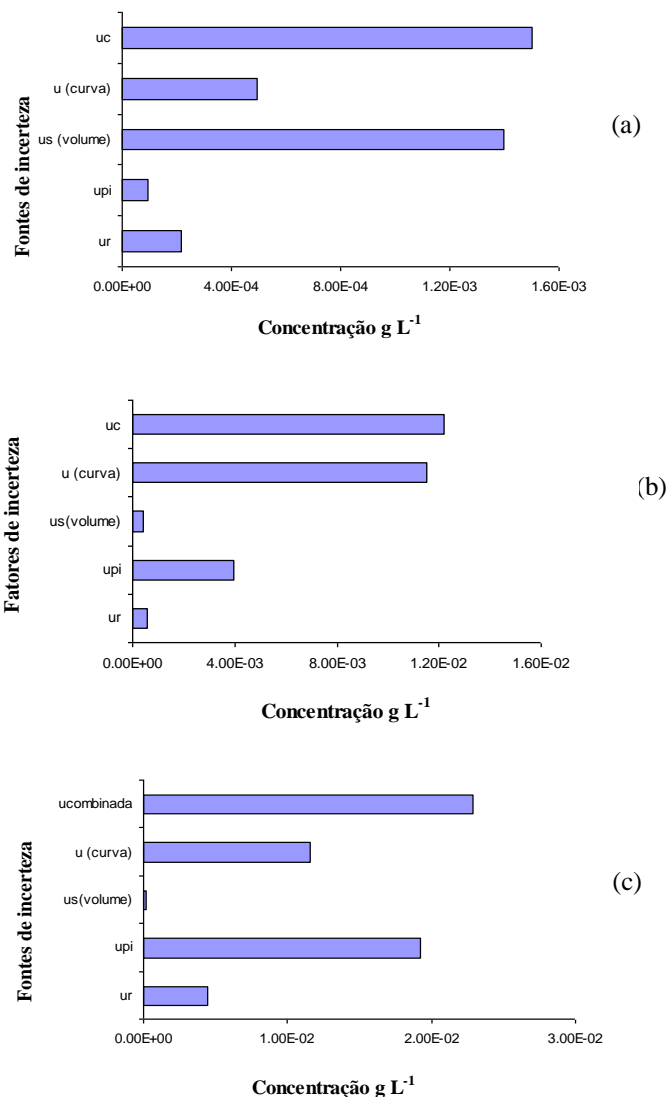


Figura 4: Contribuição relativa das fontes de incerteza na incerteza combinada (u_c) da medição de vitamina K1 para as seguintes concentrações: $4,06 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ (a), $4,06 \times 10^{-2}$ (b), $1,80 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ (c).

5. DISCUSSÃO

A metodologia desenvolvida possibilitou a quantificação da vitamina K1 em amostras de chá fortificadas. Por meio do uso de um sistema com uma cela de caminho ótico alongado foi possível melhorar os limites de detecção e quantificação do método desenvolvido em até nove vezes.

Por meio do cálculo da incerteza associada ao método, observa-se que a fonte mais relevante de incerteza para o ponto de menor concentração ($4,06 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$) está relacionada ao preparo da solução padrão por ajuste de volume, devido aos altos valores de incerteza dos aparatos volumétricos (balões volumétricos e micropipetas) em concentrações baixas. Para o meio da curva analítica ($4,06 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$) a fonte de incerteza mais relevante foi o u_{curva} em virtude do cálculo da incerteza ter sido realizado, após desdobramento, com o primeiro ponto da curva 2. Já para o ponto de maior concentração ($1,80 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$) a incerteza associada que teve maior impacto foi a u_{pi} . Este resultado não era esperado, experimentos com um maior número de

replicatas estão em andamento de modo a confirmar a precisão intermediária e, portanto a estabilidade das soluções.

6. CONCLUSÃO

Desenvolveu-se um método para a determinação de vitamina K1 por eletroforese capilar, sensível e com custo relativamente menor se comparado aos métodos utilizados atualmente, já que este possui baixo consumo de solventes, baixo custo de consumíveis e geração de pequenas quantidades de resíduos.

Os estudos de incerteza mostraram a importância da etapa de preparo das soluções de análise, indicando que as mesmas devem ser preparadas preferencialmente, quando em baixas concentrações, por meio de ajuste de massa para minimizar a influência dos aparatos volumétricos.

Por meio da utilização da cela de caminho ótico alongado foi possível melhorar o limite de detecção e quantificação do método desenvolvido em até nove vezes.

A aplicabilidade do método foi avaliada por meio de testes de recuperação em amostras de chá fortificadas e os resultados obtidos mostraram a confiabilidade do método desenvolvido.

O método desenvolvido mostrou potencial para ser utilizado na avaliação do teor de vitamina K1 em alimentos.

AGRADECIMENTOS

PUC-RIO, CNPQ.

REFERÊNCIAS

- [1] D. L. McKay, J. B. Blumberg. The Role of Tea in Human Health: An Update. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2002.
- [2] M. Reto, M. E. Figueira, H. M. Filipe, C. M. M. Almeida. Analysis of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME–GC–FID. *Food Chemistry*, v. 100, p. 405–41, 2007.
- [3] A. V. Pereira, T. C. Almeida, F. L. Beltrame, M. E. Costa, L. H. Garrido. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Scientiarum. Health Sciences Maringá*, v. 31, n. 2, p. 119-124, 2009.
- [4] T. O. Cheng. Green tea may inhibit warfarin. *International Journal of Cardiology*, v. 115, p. 236, 2007.
- [5] K. Klack, J. F. Carvalho. Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina. *Rev. Bras. Reumatol.*, v. 46, n.6, p. 398-406, 2006.
- [6] J. Zempleni, R. B. Rucker, D. B. McCormick, J. W. Suttie. *Handbook of Vitamins*, 4^o edição. CRC Press.
- [7] S. M. C. Dores, S. A. R. Paiva. Vitamina k: metabolismo e nutrição. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 14, n. 3, p. 207-218, set./dez., 2001.
- [8] K. Mahan, S. Escott-Stump. *Krause Alimentos, Nutrição & Dietoterapia* 11^o edição. Editora: Roca. São Paulo. 2005 L.
- [9] SHEARER, M.J. *Vitamin K. Lancet*, London, v.345, n.8944, p.229-234, 1995.
- [10] S. Otles, O. Cagindi. Determination of vitamin K1 content in olive oil, chard and human plasma by RP-HPLC method with UV–Vis detection. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1220–1222, 2007.
- [11] T. J. Koivu-Tikkanen, V. Ollilainen, V. I. Piironen. Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Animal Products with Fluorescence Detection after Postcolumn Reduction with Metallic Zinc. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 6325-6331, 2000.
- [12] L. Z. Giacomini. Quantificação de vitamina A em concentrados polivitamínicos por cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação. UFSM-RS, 2006.
- [13] KHALEDI, M. G, *High-Performance Capillary Electrophoresis – Theory, Techniques, and Applications*, Chemical Analysis, v. 146, 1998.
- [14] E. S. Saron, P. H. M. Kiyataka. Validação de métodos analíticos para avaliação de embalagens. *Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens – ITAL*. v. 17, n. 3, 2005.
- [15] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*. v. 27, n. 5, São Paulo, Sept./Oct. 2004.
- [16] Brasil. Agência nacional de vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União* 2 de junho de 2003.
- [17] INMETRO DOQ-CGRC-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 03 – FEV/2010. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em 10 de fevereiro de 2011.
- [18] INMETRO: Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, 3^oed., 2003.
- [19] CITAC/EURACHEM. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*; 2^oed., 2000.
- [20] D. D. Orsi, G. Giannini, L. Gagliardi, I. Carpani, D. Tonelli. Identification and quantitation of vitamins K1 and K3 in cosmetic products for facial skin protection. *J. Cosmet. Sci.*, v. 59, p. 459-467, 2008.