

DESENVOLVIMENTO DE PACOTE EM AMBIENTE R PARA AVALIAR FIGURAS DE MÉRITO UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Igor Samuel Mendes (UFVJM) E-mail: igor.samuel@ufvjm.edu.br
Rogério Alves Santana (UFVJM) E-mail: rogerio.santana@ufvjm.edu.br
Flaviano Oliveira Silvério (UFMG) E-mail: flavianosilverio@yahoo.com.br
Sandro Braga Soares (UFMG) E-mail: soaressb@yahoo.com.br
Lázaro Chaves Sicupira (UFVJM) E-mail: lazaro.sicupira@ufvjm.edu.br

Resumo: Os procedimentos de validação visam demonstrar que um método analítico possui as características necessárias para obter resultados com a qualidade exigida e podem incluir, quando aplicável, as seguintes figuras de mérito: linearidade, efeitos de matriz, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e teste de média. Portanto, o objetivo deste estudo foi criar um pacote no ambiente R para avaliar essas figuras de mérito. Neste trabalho foi utilizado o software R versão 4.1.3 (Team, 2013) e a sua interface de desenvolvimento integrado RStudio. Ao obter os dados de sua pesquisa, o usuário os insere no pacote desenvolvido neste estudo e executa suas funções, adquirindo como retorno os resultados sobre a avaliação dos valores extremos, a normalidade dos resíduos de regressão da curva analítica, bem como a homoscedasticidade e a autocorrelação desses resíduos, a significância dessa regressão e seu desvio da linearidade. Além disso, são retornados os resultados do efeito de matriz, da seletividade, do limite de detecção e de quantificação e da precisão e exatidão do método. Por fim, tem-se o resultado do teste de média, tendo acesso aos testes de Tukey, Student-Newman-Keuls, Duncan, t de Student e Scott-Knott. Sendo esses resultados retornados de forma precisa e de fácil visualização, tudo isso em questão de segundos. O desenvolvimento do pacote permitirá uma redução considerável do tempo de execução dos cálculos e interpretação dos resultados, aumentando a confiabilidade das operações envolvidas, tudo isso disponibilizado de forma gratuita ao instalar o pacote no RStudio.

Palavras-chave: Linguagem R, Quimiometria, Método de extração, GC, HPLC.

DEVELOPMENT OF A PACKAGE IN THE R ENVIRONMENT TO EVALUATE FIGURES OF MERIT USED IN ANALYTICAL METHOD VALIDATION

Abstract: Validation procedures aim to demonstrate that an analytical method has the necessary characteristics to obtain results with the required quality and may include, when applicable, the following figures of merit: linearity, matrix effects, selectivity, detection limit, quantification limit, precision, accuracy, and mean test. Therefore, the objective of this study was to create a package in the R environment to evaluate these figures of merit. In this work, the R software version 4.1.3 (Team, 2013) and its integrated development interface RStudio were used. Upon obtaining the research data, the user inserts them into the package developed in this study and executes its functions, obtaining as a return the results on the evaluation of outliers, the normality of the regression residuals of the analytical curve, as well as the homoscedasticity and autocorrelation of these residuals, the significance of this regression and its deviation from linearity. In addition, the results of the matrix effect, selectivity, detection and quantification limits, and the precision and accuracy of the method are returned. Finally, we have the result of the mean test, with access to the Tukey, Student-Newman-Keuls, Duncan, Student's t and Scott-Knott tests. These results are returned in an accurate and easy-to-view manner, all in a matter of seconds. The development of the package will allow a considerable reduction in the execution time of calculations and interpretation of results, increasing the reliability of the operations involved, all of which is made available free of charge when installing the package in RStudio.

Keywords: R language, Chemometrics, Extraction method, GC, HPLC.

1. Introdução

Um procedimento de validação visa demonstrar que um método analítico tem as características necessárias para obter resultados com a qualidade exigida. Logo, é uma medida essencial para garantir a produção de dados analíticos confiáveis e, por isso, todos os laboratórios devem implementá-lo. Esse procedimento deve ser realizado com métodos existentes que foram modificados para atender alguma necessidade específica ou métodos totalmente inéditos, ou seja, desenvolvidos pelo próprio laboratório (THOMPSON et al., 2002; INMETRO, 2016; SANTE, 2019).

As etapas de validação de métodos analíticos devem incluir, quando aplicável, as seguintes figuras de mérito: linearidade, efeito de matriz, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão (INMETRO, 2016). Além disso, pode ser necessário a utilização de testes de média para comparar diferentes métodos analíticos (EVERITT & SKRONDAL, 2016).

Linearidade de um método analítico é a capacidade de obter, dentro de uma determinada faixa, resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A avaliação da linearidade consiste em realizar o seguinte delineamento experimental: determinar o intervalo de concentração da curva analítica; preparar a curva analítica com pelo menos seis níveis de concentração equidistantes, com três repetições independentes para cada nível e aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) aos dados experimentais obtidos (THOMPSON et al., 2002; DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; ICH, 2010; INMETRO, 2016; SANTE, 2019).

As matrizes contêm, além dos analitos de interesse, diversos outros constituintes que, em geral, alteram a resposta das técnicas analíticas. Essa interferência é denominada efeito de matriz. É importante salientar que as alterações geradas pelos componentes da matriz não dependem apenas das características dos compostos, mas também do método utilizado para preparar e analisar a amostra. Portanto, fatores além das características dos compostos podem ser considerados na interpretação dos resultados do efeito de matriz (DE PINHO et al., 2009; CHAMKASEM & HARMON, 2016).

A seletividade refere-se à capacidade do método identificar o analito alvo na presença de outros compostos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método é considerado seletivo quando o resultado obtido para o analito de interesse pode ser diferenciado dos resultados de outros compostos (THOMPSON et al., 2002; AOAC, 2002; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016; SANTE, 2019).

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade de analito alvo que pode ser detectada em uma amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor preciso. Já o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade de analito de interesse que pode ser quantificada com precisão em uma amostra (AOAC, 2002; THOMPSON et al., 2002; ICH, 2010; INMETRO, 2016).

A exatidão de um método analítico expressa a proximidade dos resultados encontrados com o valor de referência e deve ser especificada em termos das taxas médias de recuperação do analito alvo. Já a precisão expressa a proximidade entre os resultados encontrados e deve ser especificada em termos do desvio padrão relativo das taxas de recuperação do composto de interesse (THOMPSON et al., 2002; ICH, 2010; EURACHEM, 2014; SANTE, 2019).

Os procedimentos utilizados para avaliação desses parâmetros não são padronizados em relação aos delineamentos experimentais e ferramentas estatísticas (DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Assim, neste trabalho está inserido apenas um exemplo de

delineamentos e ferramentas utilizadas para validar métodos analíticos.

A validação do método analítico é um procedimento extenso e requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos. Desta forma, pretende-se com este estudo fornecer um algoritmo de fácil acesso e manuseio, pelo Rstudio, sendo uma IDE (ambiente de desenvolvimento integrado) voltada a área da estatística. Assim, ao exercer as funções mencionadas, o pesquisador irá se deparar com dados precisos e de fácil interpretação para a verificação quanto à confiabilidade estatística do seu método analítico.

2. Metodologia

O pacote Chemometrics foi desenvolvido em linguagem R, adaptando algumas funções já existentes de outros pacotes voltados a cálculos estatísticos da parte de regressão linear e testes de média, mas também apresenta a criação de funções novas no que diz respeito a seletividade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. À exceção do teste de média, as demais funções foram criadas para atender o procedimento de análise proposto no protocolo SANTE (2019).

Para avaliar a linearidade os parâmetros de regressão linear foram estimados por meio do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os outliers foram identificados e descartados pelo teste Jackknife. O uso do MMQO foi avaliado através da análise da normalidade (teste de Shapiro-Wilk), independência (teste de Durbin-Watson) e homoscedasticidade (teste de Brown-Forsythe) dos resíduos da regressão, além da análise de variância (ANOVA) para a significância da regressão e desvio da linearidade (DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2007).

O efeito de matriz (EM) foi avaliado pela Equação (1):

$$EM = \left(\frac{\alpha_{matriz} - \alpha_{solvente}}{\alpha_{solvente}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde, matriz é a inclinação da curva analítica no extrato da matriz fortificada, e solvente é a inclinação da curva analítica em solvente.

Os valores obtidos pela equação 1 foram interpretados como: valores entre -20% e +20% indicam baixos efeitos matriciais; no intervalo de -20% a -50% ou entre +20% e +50%, tem-se a classificação de médios efeitos matriciais; e valores abaixo de -50% ou acima de +50% implicaram em altos efeitos matriciais (ECONOMOU et al., 2009; TOMASINI et al., 2012).

A seletividade foi conferida por meio da comparação dos cromatogramas do extrato da matriz livre do composto de interesse com os cromatogramas do extrato da matriz fortificado com o analito alvo (SANTE/12682/12682, 2019).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados por meio da relação sinal/ruído, comparando as áreas dos sinais medidos em uma amostra fortificada com o analito alvo (amostra fortificada) com os ruídos obtidos em uma amostra livre desse analito (amostra branca). Para estimar o LD, foi considerada uma relação sinal/ruído de 3:1, enquanto para o LQ, uma relação sinal/ruído de 10:1 foi adotada como aceitável. É fundamental que o tempo de retenção do ruído na amostra branca seja o mesmo do sinal medido para o composto alvo na amostra fortificada. Além disso, foi necessário realizar, no mínimo, 6 repetições independentes tanto para as amostras fortificadas como para as

brancas (THOMPSON et al. (2002), ICH (2010), EURACHEM (2014), US EPA (2016) e INMETRO (2016)).

A exatidão foi avaliada por experimentos de fortificação/recuperação utilizando três concentrações, cada uma em triplicata. No qual valores de recuperação entre 70% e 120% foram considerados aceitáveis para cada nível (SANTE/12682/12682, 2019).

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) obtido a partir de experimentos de fortificação/recuperação. Os testes foram realizados em concentração fixa determinada pelo analista, com sete repetições independentes, o método foi considerado preciso quando o valor do DPR foi menor que 20% (SANTE/12682/12682, 2019).

Por fim, os testes de média Tukey, Student-Newman-Keuls (SNK), Duncan, t de Student e Scott-Knott foram utilizados para averiguar se existe diferença entre as condições (tratamentos) avaliadas no estudo.

3. Resultados e discussões

Conforme apresentado na metodologia, o pacote conta com um total de seis funcionalidades, as quais possuem as descrições das variáveis envolvidas, bem como exemplos apresentados para melhor compreensão do usuário. Suas funções foram testadas utilizando os resultados obtidos por Soares et al. (2024), sendo apresentadas a seguir.

3. 1. Linearidade

A primeira função a ser apresentada requer a entrada de dois dados, as concentrações das amostras em triplicata (x), e suas respectivas áreas cromatográficas (y). Inserindo tais valores, basta chamar a função “REG (x,y)” para a execução. Por padrão a função mencionada retorna a regressão linear dos dados, bem como os testes da normalidade (teste de Shapiro-Wilk), independência (teste de Durbin-Watson) e homoscedasticidade (teste de Brown-Forsythe) dos resíduos da regressão, além da análise de variância (ANOVA) para a significância da regressão e desvio da linearidade. Para exemplificar a entrada de dados, bem como o retorno da função, seguem as Figuras 1, 2 e 3.

```
6 #Testing the regression function with the data (Sandro, matriz solo)
7 #Data input
8 x <- c(15.000,15.000,15.000,40.000,40.000,40.000,65.000,65.000,65.000,
9 90.000,90.000,90.000,115.000,115.000,115.000,140.000,140.000,140.000)
10
11 y <- c(1023269,1201665,1026014,2567823,2437779,2414029,4451835,4194347,3968714,
12 5697143,5916067,5871575,7590833,8074296,7492589,9529622,9397228,9597198)
13 #Executing the function
14 REG(x,y)
15 #-----
```

Figura 1 - Entrada de dados

```

-----
Regression model
-----
              Estimate Std. Error   t value   Pr(>|t|)
(Intercept) -132289.81 101478.319 -1.303626 2.108073e-01
trat         67980.82  1146.873  59.274909 3.509257e-20
-----

Regression biases
-----
              DF      SSQ      MSQ      F
Linear        1 1.516394e+14 1.516394e+14 4631.711434
Deviations    4 2.976696e+11 7.441740e+10  2.273023
Residual     12 3.928727e+11 3.273939e+10
-----
              p-value
Linear        6.724960e-17
Deviations   1.216264e-01
Residual
-----

-----Considerations-----
As p-value (Linear) < alpha, the linear model describes the data, with 95% confidence

As p-value (Deviations) > alpha, there are no deviations from linearity, with 95% confidence

-----

Shapiro-Wilk test for normality of residuals
p-value: 0.6004894
According to the Shapiro-Wilk test at 95% confidence, the residuals can be considered normal.
-----

Brown-Forsythe Test for Homogeneity of Variances
p-value: 0.7090716
According to the Brown-Forsythe test, at 95% confidence, the variances can be considered homogeneous.
-----

Durbin-Watson Test for Independence of Residuals
p-value: 0.208
According to the Durbin-Watson test at 95% confidence, the residuals are independent.
-----

Jackknife Test
According to the Jackknife residue, the outliers are: 14
-----

```

Figura 2 - Retorno da função “REG”

Com a análise da Figura 2, pode-se afirmar, com 95% de confiança, que o modelo linear descreve bem os dados. A regressão é significativa e não há desvios de linearidade, tendo em vista que o p-valor obtido na análise foi menor que o nível de significância (α). Além disso, é retornado que pelo teste de Shapiro-Wilk os dados ofertados seguem uma distribuição normal. Já o teste de homogeneidade das variâncias de Brown-Forsythe indicou que as variâncias podem ser consideradas homogêneas e o teste de Durbin-Watson mostrou que os resíduos são independentes. Por fim, o teste de resíduos padronizados Jackknife mostrou que o dado 14 é um valor extremo, que pode ser excluído.

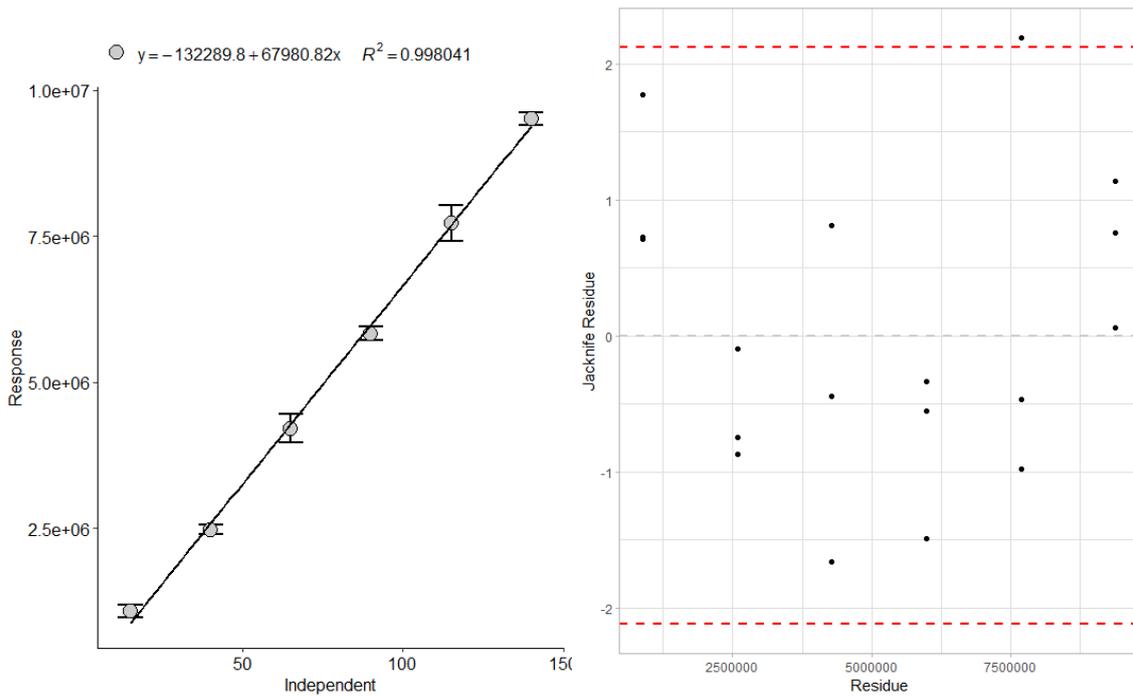


Figura 3 - Retorno gráfico da função “REG”

A Figura 3 mostra informações visuais quanto ao ponto avaliado como valor extremo, ficando acima da linha tracejada em vermelho, bem como a equação da reta dos dados e o coeficiente de determinação R², cujo valor foi 0,998041, indicando que 99,8041% da variabilidade dos dados é explicada pelo modelo de regressão linear.

3. 2. Efeito de matriz

A função para determinação do efeito de matriz requer as concentrações das amostras em triplicata (x) e suas respectivas áreas cromatográficas em extrato da matriz (y) e em solvente (acetonitrila) (z). Ao fazer a chamada da função, conforme mostrado na Figura 4, obtém-se a resposta demonstrada na Figura 5. O efeito de matriz calculado foi de 14,187%, indicando um aumento na resposta cromatográfica do dinotefurano causada por componentes do extrato da matriz solo.

```

18 #Testing the matrix effect function with data (Sandro, Matriz Solo & Solvente)
19 x <- c(15.000,15.000,15.000,40.000,40.000,40.000,65.000,65.000,65.000,
20        90.000,90.000,90.000,115.000,115.000,115.000,140.000,140.000,140.000)
21
22 y <- c(1023269,1201665,1026014,2567823,2437779,2414029,4451835,4194347,3968714,
23        5697143,5916067,5871575,7590833,8074296,7492589,9529622,9397228,9597198)
24 #Blanc sample(z)
25 z<- c(880092,1018087,1118474,2719116,2530633,2633549,4153462,3992650,
26        3765752,5475843,5755992,5681924,7011688,7053424,6812521,8409192,8591581,8474623)
27
28 ME(x,y,z)
29 #-----
> ME(x,y,z)
Result: 14.18686 % Therefore, there is an increase in the chromatographic response
-----
    
```

Figura 4 - Chamada da função para determinação do efeito de matriz e seu retorno.

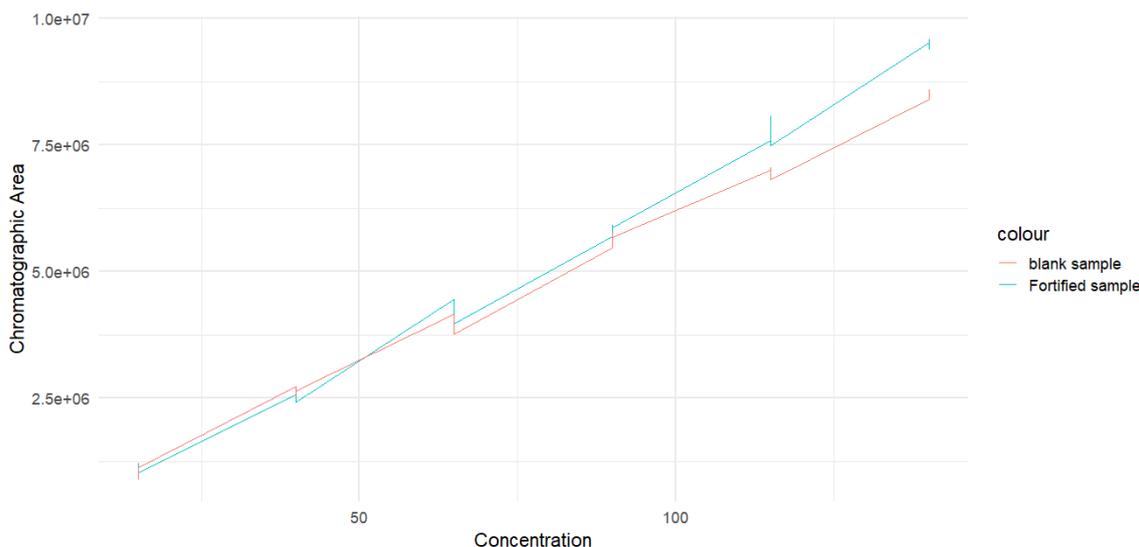


Figura 5 - Retorno gráfico da função “ME”

3. 3. Exatidão e precisão

A Figura 6 apresenta a entrada dos dados para a função exatidão e precisão, bem como os resultados retornados. Observa-se que a precisão foi confirmada pelo valor do desvio padrão relativo ter sido de 8,589 %, ou seja, abaixo do valor de aceitabilidade de 20%. Além disso, a exatidão foi confirmada pelo valor de recuperação encontrado, sendo de 98,282%, ou seja, dentro da faixa aceitável de 70 a 120%, seguindo as diretrizes do protocolo SANTE (2019).

```

31 #Testing the Accuracy and Precision function with data (Sandro, Exat_Prec)
32 a <- 90 #Value of the analyzed concentration
33
34 b<-c(91.21709337,92.03149993,91.2425463,110.5526787,86.77411569,
35      95.94177783,80.83375894,98.51127988,90.67572737,90.46972451)
36 #Response vector of the area of 10 repetitions
37 AP(a,b)
38 #-----
Result: 98.2815 +- 8.589153 In the 90 concentration

```

```

Interpreting the result:
The method is considered to be accurate
if the average recovery rates of the analyte are within
from the range of 70 to 120%. On the other hand, the method will
be considered accurate if the standard deviations
relatives are less than 20%.

```

Figura 6 - Chamada da função de exatidão e precisão, bem como seu retorno.

3. 4. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

A Figura 7 demonstra a entrada dos dados para a função dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), bem como seu retorno. O valor do LQ está dentro da faixa de concentração permitida para o dinotefurano em diversas culturas agrícolas no Brasil (10 a 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (ANVISA, 2024).

```

40 #Testing the LD_LQ function with data (Sandro, LD_LQ)
41 a <- 865887 #Average of a triplicate of the fortified sample
42 b<- 468066 #Blank sample
43 LDLQ(a,b)
44 #-----
> LDLQ(a,b)
Detection limit: 5.549775
Limit of quantification: 18.49925
    
```

Figura 7- Chamada da função para LD e LQ, bem como resultados retornados

3. 5. Seletividade

A Figura 8 mostra a entrada de dados da função seletividade, enquanto a Figura 9 mostra os gráficos da função seletividade. Analisando a Figura 9, nota-se que o método foi considerado seletivo para o dinotefuran, pois nenhum pico de interferência foi detectado no mesmo tempo de retenção do analito alvo (4,62 minutos).

```

47 #Testing the selectivity function with data (Sandro, 90 ppb 1 validação & Branco
48 #Chromatogram parameters
49 tdp <- 1950 #Total data points
50 t<- 13 #Time,in minutes, of the Chromatographic run
51 xm <- 13/t #x axis multiplier
52 ym <- 7.45e-6 #y axis multiplier
53 #Calling the values from the spreadsheet
54 library(readxl)
55 dados_excel <- read_excel("C:OneDrive/Dados_Artigo/Seletividade/BP 90ppb 1 valida
56 y <- dados_excel[[2]]
57 dados_excel2 <- read_excel("C:OneDrive/Dados_Artigo/Seletividade/Branco 1 valida
58 z <- dados_excel2[[2]]
59 SEL(tdp,t,ym,y,z)
60 #-----
    
```

Figura 8- Entrada de dados para a função seletividade “SEL”

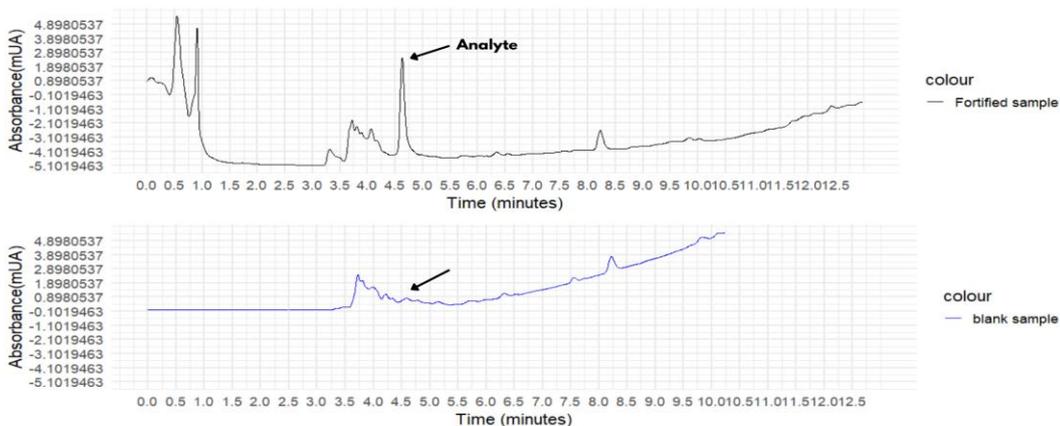


Figura 9- Gráficos retornado da função seletividade “SEL”

3. 6. Testes de média

Na última análise tem-se a função de comparações múltiplas, a qual a Figura 10 apresenta a entrada dos dados, ao passo que a Figura 11 demonstra os resultados retornados.

```

63 #Testing the mean testing function with data (Ensaaios e recuperação)
64 Medias = c(71.01,69.21,76.99,79.21,72.96,80.57,84.47,74.52,78.07,
65           76.19,74.02,64.96,59.46,45.10,62.25,97.25,65.99,81.88,
66           86.44,89.59,91.82,78.86,82.63,81.83,72.22,83.88,67.03,
67           80.18,86.44,89.59,100.39,96.74,94.44,83.98,76.71,89.67,
68           79.81,81.24,78.38)
69 (dados = data.frame(trat = factor(rep(c('A','B','C','D','E','F','G','H',
70                                     'I','J','K','L','M'), each = 3)),Medias))
71 attach(dados)
72 COMP(dados)

```

Figura 10- Entrada de dados para a função de comparações múltiplas “COMP”

	treatment	mean	sd	sem	tukey	snk
1	K	97.1900	3.0004	3.8726	a	a
2	G	89.2833	2.7031	3.8726	ab	ab
3	J	85.4033	4.7899	3.8726	ab	ab
4	L	83.4533	6.4960	3.8726	ab	ab
5	F	81.7067	15.6307	3.8726	ab	ab
6	H	81.1067	1.9864	3.8726	ab	ab
7	M	79.8100	1.4300	3.8726	ab	ab
8	C	79.0200	5.0426	3.8726	ab	b
9	B	77.5800	4.0584	3.8726	ab	b
10	I	74.3767	8.6295	3.8726	bc	b
11	A	72.4033	4.0729	3.8726	bc	b
12	D	71.7233	5.9569	3.8726	bc	b
13	E	55.6033	9.2025	3.8726	c	c
	duncan	t	scott_knott			
1	a	a	a			
2	ab	ab	a			
3	ac	bc	b			
4	bcd	bd	b			
5	bcd	be	b			
6	bcd	be	b			
7	bcd	be	b			
8	bcd	be	b			
9	bcd	cde	b			
10	cd	cde	c			
11	cd	de	c			
12	d	e	c			
13	e	f	d			

Figura 11- Retorno da função “Comp”

Os dados ofertados após a execução da função “Comp” são as médias dos tratamentos (testes) empregados no estudo, requerendo triplicata para cada tratamento. As médias das triplicatas dos tratamentos são listadas em ordem decrescente e atribui-se letras para os tratamentos, se as médias de dois ou mais tratamentos não são estatisticamente diferentes

entre si, essas devem receber a mesma letra, conforme apresentado em “Treatment” da Figura 11.

Assim, ao avaliar os resultados, é possível fazer a escolha do tratamento que apresentou a maior média. Por exemplo, o teste Scott-Knott, com 95% de confiança, indicou que os tratamentos 1 e 2 não diferem entre si, mas sendo diferentes dos tratamentos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e 9, que são um grupo de tratamentos que não se diferem estatisticamente. Além disso, os tratamentos 10, 11 e 12 são similares entre si e diferente dos demais. Por fim, o tratamento 13 difere de todos. Nesse exemplo os tratamentos 1 e 2 apresentaram as maiores médias.

4. Conclusão

O pacote oferece diversas funcionalidades que permitem a avaliação de linearidade, efeito de matriz, seletividade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, além de testes de comparação de médias. As funções foram elaboradas para serem acessíveis e de fácil uso, garantindo resultados confiáveis. Sendo assim, espera-se que o Chemometrics contribua significativamente para a automatização e eficiência dos processos de validação, atendendo às exigências normativas e proporcionando uma ferramenta poderosa e gratuita para pesquisadores e profissionais da área. Finalmente, além da própria descrição das funções e exemplos contidos no pacote, foi feito um vídeo para demonstração de seu funcionamento, podendo ser acessado pelo link: <https://youtu.be/fNMUEuazzYU>.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01334-22) pelo apoio financeiro. Os autores também agradecem Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro de bolsa de pesquisa e Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pela infraestrutura fornecida.

Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, 2002. Disponível em: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf, acessado em janeiro de 2024.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA); *Dinotefuran*, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4307json-file-1/view>, acessado em agosto de 2024.
- BAZILIO, F.S.; BOMFIM, M.V.J.; ALMEIDA, R.J. & ABRANTES, S.M.P. *Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear*. Revista Analytica, n. 59, p. 60-65, 2012.
- CHAMKASEM, N.; HARMON, T. *Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 408, n. 18, p. 4995–5004, 2016.
- DE PINHO, G. P. *et al. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa*. Química Nova, v. 32, n. 4, p. 987–995, 2009.
- DE SOUZA, S.V.C & JUNQUEIRA, R.G.A. *Procedure to assess linearity by ordinary least squares method*. Analytica Chimica Acta, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.
- ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S. & TSIPI, D. *Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography. A, v. 1216, n.31, p. 5856–5867, 2009.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods*, 2014. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf, acessado em: abril de

2024.

EVERITT, B.S.; SKRONDAL, A. *The Cambridge Dictionary of Statistics*. Cambridge University Press v. 5., 2016.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION). *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. 2010. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>, acessado em: setembro de 2023.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL). *Orientações sobre validação de métodos de ensaios*, 2003. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio, acessado em abril de 2024.

SANTE GUIDANCE. *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed (Nº 11312)*, 2019. Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11813_2017-fin.pdf, acessado em: dezembro de 2023.

SOARES, S.B; SICUPIRA, L.C.; DE PINHO, G.P.; and SILVÉRIO, F.O. *Extraction Method for Determining Dinotefuran Insecticide in Soil Samples*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 35, n.6, p. 1-9, 2024.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TOMASINI, D., M. R. F. SAMPAIO, S. S. CALDAS, J. G. BUFFON, F. A. DUARTE, AND E. G. PRIMEL. *Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified Quechers method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Talanta, v. 99, p.380–386, 2012.

US EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). *Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, Revision 2. Office of Water EPA 821-R-16-006*, 2016. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf, acessado em: abril de 2024.