

CRIAÇÃO DE UMA PLANILHA ELETRÔNICA PARA AVALIAR ALGUMAS FIGURAS DE MÉRITO UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Eduarda Eloá Lucas Ferreira (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri) E-mail:
eduardaeloalucas@gmail.com

Sandro Braga Soares (Universidade Federal de Minas Gerais) E-mail: soarssb@yahoo.com.br
Flaviano Oliveira Silvério (Universidade Federal de Minas Gerais) E-mail:
flavianosilverio@yahoo.com.br

Patrícia Xavier Baliza (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri) E-mail:
patricia.baliza@ufvjm.edu.br

Lázaro Chaves Sicupira (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri) E-mail:
lazarosicupira@ufvjm.edu.br

Resumo: A validação de métodos analíticos é complicada devido à necessidade de muitos cálculos. Este trabalho visa criar uma planilha no Excel para simplificar esses cálculos. A linearidade foi conduzida utilizando o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários. O efeito de matriz foi analisado através de curvas analíticas em solvente e matriz e os limites de detecção e quantificação pela relação sinal/ruído. Métodos com recuperação entre 70% e 120% e desvios padrão relativos < 20% foram considerados exato e preciso, respectivamente. O teste de média foi realizado para determinar se há diferença significativa entre as médias de diferentes experimentos e a seletividade para identificar se existem compostos que interferem na análise. A planilha foi testada utilizando dados da literatura. A análise confirmou que o modelo linear é adequado. O efeito de matriz foi baixo. A seletividade, exatidão e precisão do método foram confirmadas. A planilha demonstrou eficácia na simplificação de tarefas complexas

Palavras-chave: Validação analítica, cálculos, planilha eletrônica.

CREATION OF A SPREADSHEET TO EVALUATE SOME PERFORMANCE CHARACTERISTICS USED IN THE VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS

Abstract: The validation of analytical methods is complicated due to the need for many calculations. This work aims to create an Excel spreadsheet to simplify these calculations. The linearity was conducted using the Ordinary Least Squares Method. The matrix effect was analyzed through analytical curves in solvent and matrix and the limits of detection and quantification of the signal/noise relationship. Methods with recovery between 70% and 120% and relative standard deviations < 20% are considered accurate and precise, respectively. The mean test was carried out to determine the significant difference between the means of different experiments and the selectivity to identify if there are compounds that interfere in the analysis. The spreadsheet was tested using literature data. The analysis confirmed that the linear model is adequate. The matrix effect was low. The selection, accuracy and precision of the method are confirmed. The spreadsheet demonstrates effectiveness in simplifying complex tasks.

Keywords: Analytical validation, calculations, spreadsheet.

1. Introdução

A validação de um método analítico é uma etapa essencial para assegurar a confiabilidade dos dados obtidos, garantindo que o método exiba as características de desempenho necessárias para alcançar os padrões de qualidade exigidos. Esse processo é obrigatório para assegurar que métodos utilizados em laboratórios, sejam eles novos ou adaptados, forneçam resultados precisos e robustos (Thompson et al., 2002; INMETRO, 2016). A validação é, assim, imprescindível tanto para métodos

previamente existentes que passaram por modificações para atender a necessidades específicas quanto para métodos desenvolvidos de forma inédita pelo próprio laboratório (INMETRO, 2016; Eurachem, 2014).

As figuras de mérito frequentemente avaliadas na validação incluem linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão (INMETRO, 2016). A linearidade, por exemplo, indica a capacidade do método em fornecer respostas que sejam proporcionais à concentração do analito em uma faixa específica, tornando-se um requisito fundamental para a análise quantitativa (ICH, 2010; INMETRO, 2016). Para a verificação da linearidade, é comum utilizar uma curva analítica que cubra uma faixa representativa de concentrações, analisada com replicações para assegurar a reprodutibilidade dos dados (De Souza, 2007).

Um fator crítico na análise é o efeito de matriz, que corresponde às interferências ocasionadas por componentes distintos da amostra, além do analito de interesse. Tais interferências podem impactar a resposta do método, variando conforme a preparação e análise da amostra (De Pinho et al., 2009; NATA, 2018). A consideração desse efeito é relevante, pois fatores além dos compostos analisados podem alterar os resultados finais, necessitando ajustes nos procedimentos para minimizar essas interferências (Chamkasem & Harmon, 2016).

O limite de detecção (LD) define a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada de forma precisa, enquanto o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade que pode ser quantificada com exatidão. Essas métricas são vitais para definir a sensibilidade do método e determinar sua adequação ao contexto analítico em questão (AOAC, 2002; Thompson et al., 2002; ICH, 2010; INMETRO, 2016).

Para medir a confiabilidade dos dados, a exatidão e a precisão são duas métricas cruciais. A exatidão reflete a proximidade entre o valor obtido e o valor de referência, enquanto a precisão indica a consistência dos resultados em medições repetidas, sendo ambas expressas em termos de taxas de recuperação (Ribani et al., 2004; Eurachem, 2014). O uso de métricas de recuperação permite avaliar a eficácia do método em diversos contextos e condições analíticas (EC, 2017).

O Teste de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) é um método estatístico empregado para comparações múltiplas entre médias de grupos após a utilização da ANOVA, permitindo identificar quais médias diferem significativamente entre si. Ele ajusta o nível de significância para controlar o erro global, sendo particularmente útil em estudos com várias condições ou tratamentos. Este teste é amplamente recomendado, garantindo comparações estatisticamente válidas e fortalecendo a credibilidade dos resultados (McDonald, 2009).

A seletividade em métodos instrumentais de separação é crucial para garantir análises precisas de substâncias em amostras complexas, mesmo na presença de interferentes. Ela assegura a identificação e quantificação exata dos compostos de interesse e é vital para a linearidade, exatidão e precisão dos resultados. A seletividade deve ser constantemente reavaliada, especialmente quando as amostras podem degradar-se (Pharmacopeia, 1999; Ribani et al., 2004; Jenke, 1998).

Os procedimentos utilizados para avaliação desses parâmetros não são padronizados em relação aos delineamentos experimentais e ferramentas estatísticas (De Souza, 2007). Assim, neste artigo 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 (Ribeiro et al., 2008). Desta forma, pretende-se com este estudo, criar uma planilha eletrônica para avaliar as algumas figuras de mérito utilizadas na validação de métodos analíticos e, assim, agilizar e facilitar os cálculos estatísticos.

2. Metodologia

A planilha eletrônica foi elaborada no Excel da *Microsoft Office* 2016 (.xlsx) que é compatível com a Planilha *OpenDocument* (.ods) de formato aberto (livre). Para garantir a confiabilidade da nossa planilha, realizamos testes utilizando dados obtidos por Soares et al. (2024).

A linearidade do método analítico foi avaliada através da aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) aos dados experimentais obtidos no 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. Foram estimados os parâmetros e resíduos da regressão, com suas respectivas variâncias, assim como o coeficiente de determinação (R^2). Os parâmetros estimados foram os coeficientes de inclinação e interseção.

Para dar prosseguimento ao estudo, foi necessário realizar o teste de Jackknife que permitiu identificar e excluir valores extremos que poderiam afetar significativamente a estimativa dos parâmetros da regressão (De Souza, 2007; INMETRO, 2016).

Em seguida, a utilização do MMQO foi validada através da avaliação das premissas dos resíduos da regressão e do modelo linear simples de acordo com o procedimento realizado por Souza & Junqueira (2005).

O efeito de matriz foi verificado através de duas curvas analíticas, uma em solvente e outra em extrato da matriz. Essas curvas foram comparadas através da razão entre os coeficientes angulares obtidos para a curva analítica em extrato da matriz e em solvente de acordo com a Eq. (23) (tópico 2.2. Efeito de Matriz). Valores entre -20% e +20% indicam baixo efeito de matriz; no intervalo de -20% a -50% ou entre +20% e +50%, tem-se médios efeito de matriz e valores abaixo de -50% ou acima de +50% implicaram em altos efeito de matriz (Economou et al. 2009; Tomasini et al. 2012; Chamkasem & Harmon, 2016).

O LD e LQ foram determinados pela relação sinal/ruído, comparando as áreas dos sinais medidos para uma amostra fortificada com o analito alvo (amostra fortificada) com os ruídos de uma amostra livre desse analito (amostra branca). Relações sinal/ruído de 3:1 e 10:1 foram consideradas aceitáveis para a estimativa do LD e LQ, respectivamente. É importante ressaltar que o tempo de retenção do ruído na amostra branca foi o mesmo do sinal medido para o composto alvo na amostra fortificada. Além disso, foram realizadas pelo menos 6 repetições independentes tanto para as amostras fortificadas como para as brancas (Thompson et al., 2002; ICH, 2010; Eurachem, 2014; US EPA, 2016; INMETRO, 2016).

Para avaliar a exatidão e precisão do método, foram realizados experimentos de recuperação do analito alvo a partir de amostras fortificadas, utilizando pelo menos três níveis de concentração dentro da faixa de linearidade, com três repetições para cada nível para a exatidão e apenas um nível de concentração, com sete repetições para a

precisão. Métodos com taxas médias de recuperação dentro do intervalo de 70 a 120% e desvios padrão relativos menores que 20% foram considerados exatos e precisos, respectivamente (Ribani et al., 2004; ICH, 2010; EC, 2017).

A seletividade é crucial para assegurar que o sinal obtido corresponda exclusivamente ao analito em questão, minimizando a interferência de outros elementos, como impurezas, produtos de degradação, ou outros compostos com propriedades semelhantes (Pharmacopeia, 1999). A seletividade neste trabalho foi determinada por meio da comparação dos cromatogramas do extrato da matriz livre da substância de interesse com do extrato da matriz fortificado com o analito alvo (EC, 2017; Ribani et al., 2004). O método foi considerado seletivo quando não foram identificados interferentes no mesmo tempo de retenção do composto alvo.

Por fim, foi realizado o teste de média de Tukey para determinar se há diferença significativa entre as médias de dois ou mais experimentos (Nogueira, 2017; Littell et al., 2006).

3. Resultados e discussões

A planilha foi elaborada para avaliar algumas figuras de mérito utilizadas na validação de métodos analíticos. A seguir são apresentados os resultados e discussões de como utilizar a planilha, os testes foram realizados utilizando os resultados obtidos por Soares et al. (2024).

3.1. Linearidade

Após a planilha ser carregada, esta é iniciada na página apresentada na Figura 1, intitulada “Entrada de Dados”. Nesta página são inseridos os dados obtidos através do delineamento experimental para a curva analítica.

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA													
Entrada de Dados													
Análise: <input type="text"/>													
Data de Confeção da Curva: <input type="text"/> Curva N: <input type="text"/>													
Responsável: <input type="text"/> N° de Níveis (n): <input type="text"/>													
Equipamento: <input type="text"/> Replicatas por Nível (k): <input type="text"/>													
Unidade de Concentração: <input type="text"/> Tipo de Medição: <input type="text"/>													
Curva Analítica													
NÍVEL	i	Xi	Yi	TESTE DE MÉDIA				EFEITO DE MATRIZ					
				Numeraçã	Dados			SOLVENTE		EXTRATO			
								Xi	Yi	Xi	Yi		
1	1	15,000	1023269	1	71,01	69,21	76,99	15	880092	15	1023269		
2	2	15,000	1201665	2	79,21	72,96	80,57	15	1018087	15	1201665		
3	3	15,000	1026014	3	84,47	74,52	78,07	15	1118474	15	1026014		
4	4	40,000	2567823	4	76,19	74,02	64,96	40	2719116	40	2567823		
5	5	40,000	2414029	5	59,46	45,1	62,25	40	2530633	40	2414029		
6	6	85,000	4451835	6	97,25	65,99	81,88	40	2633549	40	2414029		
7	7	85,000	4194347	7	86,44	89,59	91,82	65	4153462	65	4451835		
8	8	65,000	3968714	8	78,56	82,63	81,83	65	3992650	65	4194347		
9	9	90,000	5697143	9	72,22	83,88	67,03	65	3765752	65	3968714		
10	10	90,000	5916067	10	80,18	86,44	89,59	90	5475843	90	5697143		
11	11	90,000	5871575	11	100,39	96,74	94,44	90	5755992	90	5916067		
12	12	115,000	7590833	12	83,98	76,71	89,67	90	5681924	90	5871575		
13	13	115,000	8074296	13	79,81	81,24	78,38	115	7011688	115	7590833		
14	14	115,000	7492589					115	7053424	115	8074296		
15	15	140,000	9529622					115	6812521	115	7492589		
16	16	140,000	9397228					140	8409192	140	9529622		
17	17	140,000	9597198					140	8591581	140	9397228		
18	18	140,000	9597198					140	8474623	140	9597198		

Figura 1 – Print screen da planilha denominada entrada de dados.

Após inseridos os dados, vão ser retornados os resultados de cada um dos testes presentes na planilha. A seguir são mostradas as planilhas e as funcionalidades de cada uma delas.

Na planilha denominada resumo, Figura 2, serão encontrados os resumos dos resultados da linearidade, efeito de matriz, precisão e exatidão e LD e LQ. Com essas informações resumidas, o usuário não precisará abrir a planilha de cada teste individualmente, o que agilizará a sua análise dos resultados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J								
1	Normalidade dos resíduos																	
2	Req		0,961247389		ANOVA da regressão e Teste de desvio de linearidade													
3	Rcrit (α: 0,05)		0,94612087		FV	G.L.	SQ	MQ	F	p								
4					regressão	1	1,5164E+14	1,51639E+14	3513,51488	3,5093E-20								
5	Autocorrelação dos resíduos				resíduos	16	6,9054E+11	43158894174	0	0								
6	d (calculado)		1,638360368		desvio de linearidade	4	2,9767E+11	74417400188	2,27302327	0,12162643								
7	dL (α: 0,05)		1,236702157		erro puro	12	3,9287E+11	32739392170	0	0								
8	dU (α: 0,05)		1,156673457		total	17	1,5233E+14	0	0	0								
9	Estatísticas de regressão linear																	
10	Homogeneidade da variância				Coeficiente Angular (b):		6,80E+04	Coeficiente Linear (a):		-1,32E+05								
11	variância combinada		16188107392		r		0,9977	R ²		9,95E-01								
12	tL calculado		0,069274109		N		18	Graus de Liberdade		16								
13	t tabelado (α: 0,05)		2,119905299		Efeito Matriz													
14	p		0,945629835		EM=	[a(extrato)/a(solvente)]*100-100												
15	Resumo da avaliação				EM=	14												
16	Homogeneidade de variância				Precisão e Exatidão													
17	Há Homocedasticidade				p > 0,05				Nível 1			Nível 2		Nível 3				
18	Regressão e Teste de Desvio de Linearidade										Preciso		OK		OK		OK	
19	A regressão é significativa				p < 0,001				Exato		OK		OK		OK			
20	Não há desvio de Linearidade				p > 0,05													
21	Autocorrelação dos Resíduos (a = 0,05)																	
22	Não há autocorrelação				d > dU													
23	Teste de Normalidade (a = 0,05)																	
24	Segue a Normal				Req > Rcrit													
25																		
26																		

Figura 2 – Print screen da planilha denominada resumo.

A planilha da Figura 3, intitulada "Regressão", apresenta os resultados do teste de Jackknife, os parâmetros e os resíduos da regressão, acompanhados de suas respectivas variâncias. Para cada valor de Xi, no qual uma resposta Yi é fornecida, o resíduo da regressão (ei) é calculado como a diferença entre a resposta medida (Yi) e o valor estimado (Y_{est}). Esses resíduos (ei) são utilizados para realizar o teste de Jackknife, no qual identificamos os outliers que podem ter impacto significativo na estimativa dos parâmetros da regressão e, por isso, podem ser excluídos. Ao analisar os dados na Figura 3, constatou-se que o dado 15 é um valor extremo, recomendando sua exclusão.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Xi	Yi	ye= a+bx1	ei	(Yi-yeest)^2	Xi^2	(yeest/med)^2	(Yi-yemd)^2	(Xi - Ximed)^2	hi	Sei	ri	Jei	outliers
2	15,0	1023269	887422,4762	135846,5238	18454278031	225	1,75315E+13	1,64124E+13	3906,25	0,17460317	188741,13	0,719750505	0,70846	
3	15,0	1201665	887422,4762	314242,5238	9874836370	225	1,75315E+13	1,49988E+13	3906,25	0,17460317	188741,13	1,664939292	1,77295	
4	15,0	1026014	887422,4762	138591,5238	19207610472	225	1,75315E+13	1,63901E+13	3906,25	0,17460317	188741,13	0,734294235	0,72327	
5	40,0	2587823	2586942,952	-19119,95238	365572579	1600	6,18789E+12	6,28337E+12	1406,25	0,0984127	197260,01	-0,096927667	-0,09388	
6	40,0	2437779	2586942,952	-149163,9524	22249884690	1600	6,18789E+12	6,95224E+12	1406,25	0,0984127	197260,01	-0,756179388	-0,74561	
7	40,0	2414029	2586942,952	-172913,9524	29899234928	1600	6,18789E+12	7,07805E+12	1406,25	0,0984127	197260,01	-0,876578855	-0,86989	
8	65,0	4451835	4286463,429	165371,5714	27347756637	4225	6,20984E+11	3,87698E+11	156,25	0,06031746	201384,36	0,821173868	0,8124	
9	65,0	4194947	4286463,429	-92116,42857	8485436413	4225	6,20984E+11	7,7465E+11	156,25	0,06031746	201384,36	-0,457416007	-0,44582	
10	65,0	3968714	4286463,429	-317749,4286	1,00965E+11	4225	6,20984E+11	1,22274E+12	156,25	0,06031746	201384,36	-1,577825771	-1,66253	
11	90,0	5697143	5985983,905	-288840,9048	83429068264	8100	8,30823E+11	3,87698E+11	156,25	0,06031746	201384,36	-1,434276768	-1,48766	
12	90,0	5916067	5985983,905	-69916,90476	4888373571	8100	8,30823E+11	7,08254E+11	156,25	0,06031746	201384,36	-0,347181409	-0,33743	
13	90,0	5871575	5985983,905	-114408,9048	13089397489	8100	8,30823E+11	6,33346E+11	156,25	0,06031746	201384,36	-0,568112173	-0,55571	
14	115,0	7590833	7685504,381	-94671,38095	8962670371	13225	6,8174E+12	6,33199E+12	1406,25	0,0984127	197260,01	-0,479931952	-0,46807	
15	115,0	8074296	7685504,381	388791,619	1,51159E+11	13225	6,8174E+12	9,99884E+12	1406,25	0,0984127	197260,01	1,970960166	2,19309	outlier
16	115,0	7492589	7685504,381	-192915,381	37216344208	13225	6,8174E+12	5,84721E+12	1406,25	0,0984127	197260,01	-0,977975123	-0,97656	
17	140,0	9529622	9385024,857	144597,1429	20908333722	19600	1,85807E+13	1,98482E+13	3906,25	0,17460317	188741,13	0,766113579	0,75578	
18	140,0	9397228	9385024,857	12203,14286	148916695,6	19600	1,85807E+13	1,86861E+13	3906,25	0,17460317	188741,13	0,064655451	0,06261	
19	140,0	9597198	9385024,857	212173,1429	45017442550	19600	1,85807E+13	2,04549E+13	3906,25	0,17460317	188741,13	1,124148947	1,13416	
20														
21	Sxx	32812,5		p	2		a	b	n					
22	Sxy	9395652640		R ²	0,99546884		-132289,8095	67980,81905	18					
23	Sei	195865,9273		t _(α=2;p=0,05)	2,131449546		Variação da							
24	Sei ²	38363461486		Xmed	77,500		Inclinação Sb							
25	Sres	207747,1881		GL	15		Interseção Sa							
26	α	0,05					535,1109226	3139325319						

Figura 3 – Print screen da planilha denominada regressão.

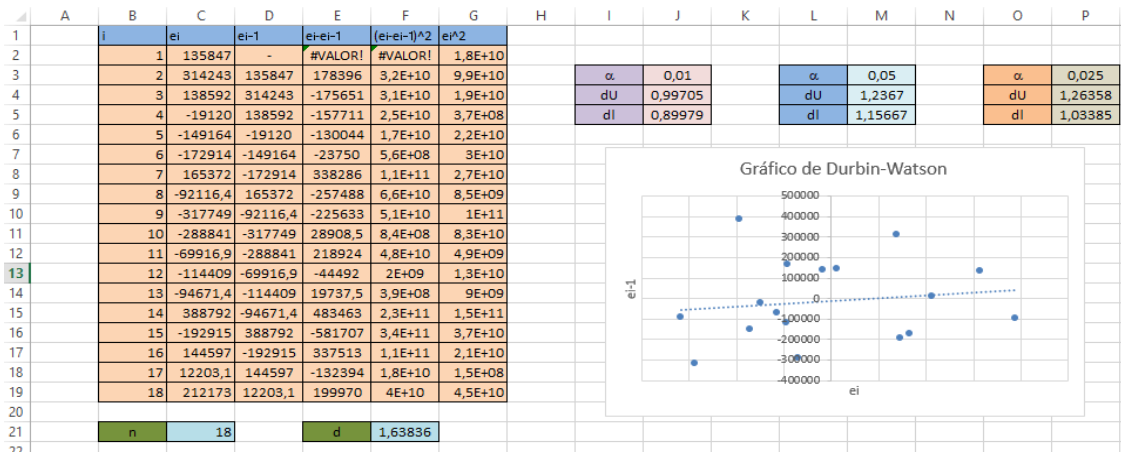


Figura 6 – Print screen da planilha denominada independência.

A Figura 7 mostra a análise de variância (ANOVA) que é utilizada para avaliar as premissas do modelo de regressão linear simples: significância da regressão e desvio da linearidade. O valor da significância p observado para a regressão deve ser menor que 0,001, enquanto o valor da significância p observado para o desvio da linearidade deverá ser maior que 0,05. Com isso conseguimos confirmar que o modelo linear é adequado e sua regressão é significativa.

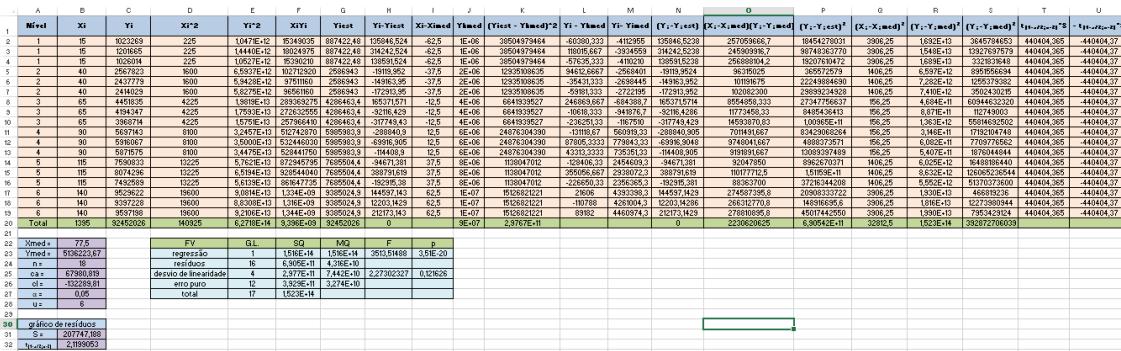


Figura 7 – Print screen da planilha denominada ANOVA.

3.2. Efeito de Matriz

O efeito de matriz é verificado por comparação dos coeficientes angulares obtidos para a curva do analito no solvente e no extrato matriz. A comparação entre essas curvas é feita a partir do cálculo realizado na planilha mostrada na Figura 8. O efeito de matriz calculado foi de 14,18%, esse valor está entre -20% e +20% indicando um baixo efeito de matriz.

	A	B	C	D	E	F	G
1		SOLVENTE			EXTRATO		
2		X_i	Y_i		X_i	Y_i	
3		15	880092		15	1023269	
4		15	1018087		15	1201665	
5		15	1118474		15	1026014	
6		40	2719116		40	2567823	
7		40	2530633		40	2437779	
8		40	2633549		40	2414029	
9		65	4153462		65	4451835	
10		65	3992650		65	4194347	
11		65	3765752		65	3968714	
12		90	5475843		90	5697143	
13		90	5755992		90	5916067	
14		90	5681924		90	5871575	
15		115	7011688		115	7590833	
16		115	7053424		115	8074296	
17		115	6812521		115	7492589	
18		140	8409192		140	9529622	
19		140	8591581		140	9397228	
20		140	8474623		140	9597198	
21		a(solvente)= 59534,71			a(extrato)= 67980,819		
22		Efeito Matriz					
23							
24		EM=	[a(extrato)/a(solvente)]*100-100				
25		EM=	14,186864				

Figura 8 – Print screen da planilha denominada efeito de matriz.

3.3. Limite de detecção e limite de quantificação

A Figura 9 apresenta o cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) utilizando uma planilha eletrônica. O LD e o LQ foram determinados com base nas relações sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente. Após inserir os dados das amostras, verificou-se que os valores de LD e LQ estão em conformidade com o resultado encontrado por Soares et al. (2024). Foi obtido um limite de detecção de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e um limite de quantificação de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2			Concentração da Matriz fortificada						
3									
4			Branco	Branco + Padrão (XX1 ppb)	Branco + Padrão (XX2 ppb)				
5			79873	446466	1004552				
6			72628	435895	1119184				
7			79251	452094	997552				
8			77864	449110	934370				
9			78545	442645	918183				
10			78244	419864	909815				
11		Média =	77734,167	441012,333	980609,333				
12									
13		RESULTADOS	Fortificada (XX1 ppb) / Branca		LD				
14			Fortificada (XX1 ppb) / Branca		LQ				
15									
16		INSTRUÇÕES	10 > divisão > 3 (LD)						
17			divisão > 10 (LQ)						

Nos quadrados verdes ao lado, você deve inserir os seus dados, após isso seus resultados serão mostrados na célula "resultado".

OBS: coloque seus dados das concentrações
 XX1 --> 1ª concentração
 XX2 --> 2ª concentração

Figura 9 – Print screen da planilha denominada efeito de matriz.

3.4. Precisão e Exatidão

A Figura 10 apresenta a determinação da precisão e exatidão do método, realizada por meio da planilha eletrônica. Para que o método seja considerado preciso, o desvio padrão relativo da taxa de recuperação deve ser inferior a 20%. Já para que seja considerado exato, a taxa de recuperação precisa estar entre 70% e 120%. Conforme os resultados exibidos na Figura 10, observa-se que, nos Níveis 1, 2 e 3, a precisão e exatidão foram confirmadas. No Nível 1, foi obtido um desvio padrão relativo de 1,35% e uma taxa de recuperação de 88,5%; no Nível 2, o desvio padrão relativo foi de 8,44%

e a recuperação foi de 92,8%; e, no Nível 3, obteve-se um desvio padrão relativo de 1,25% e uma recuperação de 83,35%. Todos os valores estão dentro da faixa aceitável.

PRECISÃO E EXATIDÃO												
Nível 1			Nível 2			Nível 3			Nos quadrados verdes ao lado, você deve inserir os seus dados, após isso seus resultados serão mostrados abaixo nos quadrados azuis.			
R1	334370		R1	4.178.859		R1	5.436.307					
R2	918183		R2	4.215.967		R2	5.426.664					
R3	309815		R3	4.179.825		R3	5.550.392					
Branco + padrão			Branco + padrão			Branco + padrão						
BP1	1.004.552		R5	3.975.126		BP1	6.840.703					
BP2	1.119.184		R6	4.395.097		BP2	6.290.273					
BP3	997.552		R7	3.702.998		BP3	6.553.860					
Média =	1040429,3		R8	4.512.806		Média =	6563612					
Média (recup.)			R9	4.153.859		Média (recup.)						
Média =	920789,33		R10	4.144.422		Média =	5471121					
Desvio padrão			Branco + padrão			Desvio padrão						
DP =	12483,258		BP1	4.389.732		DP =	68819,804					
Desvio p. relativo			Branco + padrão			Desvio p. relativo						
DPR =	1,3557127		BP2	4.327.108		DPR =	1,2578739					
% Recuperação			Média =			% Recuperação						
% R =	88,500901		Média =	4581004,333		% R =	83,355338					
Preciso / Exato			Média (recup.)			Preciso / Exato						
Preciso =	OK		Média =	4252318,2		Preciso =	OK					
Exato =	OK		Desvio padrão			Exato =						
			DP =	358961,502		Exato =	OK					
			Desvio p. relativo									
			DPR =	8,441548471								
			% Recuperação									
			% R =	92,82502025								
			Preciso / Exato									
			Preciso =	OK								
			Exato =	OK								

Figura 10 – Print screen da planilha denominada precisão e exatidão.

3.5. Seletividade

A Figura 11 mostra a determinação da seletividade pela planilha eletrônica. A seletividade é avaliada qualitativamente por meio da inspeção dos cromatogramas obtidos para o extrato da matriz livre da substância de interesse e para o extrato da matriz fortificado com o composto alvo. De acordo com a Figura 11 não tem interferentes no mesmo tempo de retenção do composto alvo e, portanto, o método pode ser considerado seletivo.

	A	B	C	D	E	F
1	Numeração referente a 30"	X	Branco	Y (branco)	Extração	Y (extração)
2	1	0	1156	0,00861287	119509	0,890411365
3	2	0,006666667	1392	0,010371207	122747	0,914536343
4	3	0,013333333	1479	0,011019408	126169	0,940032228
5	4	0,02	1459	0,010870396	129703	0,966362578
6	5	0,026666667	1417	0,010557472	133434	0,994160692
7	6	0,033333333	1345	0,01002103	137275	1,02277837
8	7	0,04	1204	0,008970498	140964	1,050263559
9	8	0,046666667	1032	0,007688999	144231	1,074604604
10	9	0,053333333	940	0,007003545	146977	1,095063897
11	10	0,06	889	0,006623566	149130	1,111104995
12	11	0,066666667	846	0,006303191	150583	1,121930688
13	12	0,073333333	858	0,006392598	151235	1,126788466
14	13	0,08	912	0,006794929	151012	1,125126987
15	14	0,086666667	925	0,006891787	149931	1,11707291
16	15	0,093333333	851	0,006340444	148026	1,102879555
17	16	0,1	759	0,00565499	145345	1,08290455
18	17	0,106666667	714	0,005319714	141939	1,057527875
19	18	0,113333333	678	0,005051493	137942	1,027747906
20	19	0,12	639	0,004760921	133537	0,994928101
21	20	0,126666667	593	0,004418194	128891	0,960312707
22	21	0,133333333	569	0,00423938	124197	0,925339684
23	22	0,14	546	0,004068017	119631	0,891320336

Figura 11– Print screen da planilha denominada seletividade.

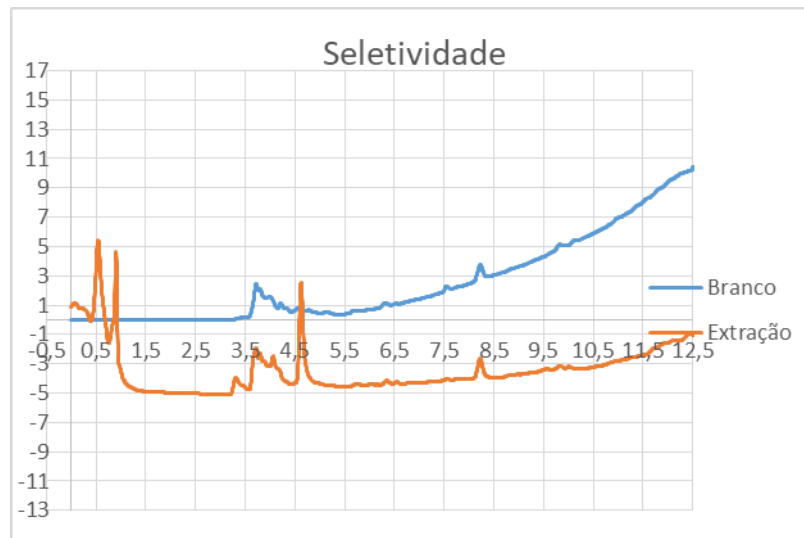


Figura 12– Print screen do gráfico retornado da planilha denominada seletividade.

3.6. Teste de média

A Figura 13 mostra os resultados da ANOVA para comparação de médias, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, que verifica quais grupos possuem médias significativamente diferentes. O resultado da ANOVA indica se há uma diferença significativa geral entre os grupos; neste caso, o valor-p é menor que 0,05, sugerindo que existem diferenças significativas. O teste de Tukey lista todas as comparações de pares de grupos, mostrando a diferença entre as médias e se essa diferença é significativa. Se o resultado for "diferentes", isso indica que a diferença entre as médias dos grupos é estatisticamente significativa. Já "iguais"/" (vazio) " indica que não há diferença significativa. A análise desses resultados ajuda a identificar quais grupos têm diferenças significativas, permitindo conclusões sobre as condições ou tratamentos estudados. Ao analisar os dados apresentados, concluímos as seguintes diferenças entre as colunas:

- A coluna 1 é diferente das colunas 5, 7 e 11.
- A coluna 2 é diferente das colunas 5 e 11.
- A coluna 3 é diferente das colunas 5 e 11.
- A coluna 4 é diferente das colunas 5, 7 e 11.
- A coluna 5 é diferente das colunas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.
- A coluna 8 é diferente da coluna 11.
- A coluna 9 é diferente da coluna 11.
- A coluna 11 é diferente da coluna 13.

As colunas não mencionadas são iguais entre si.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	
1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13						
2		71,01	79,21	84,47	76,19	59,46	97,25	86,44	78,56	72,22	80,18	100,39	83,98	79,81						
3		63,21	72,36	74,52	74,02	45,10	85,89	83,53	82,93	83,28	86,44	36,74	76,71	81,24						
4		76,33	80,57	78,07	64,36	62,25	81,68	81,82	81,93	67,03	83,53	34,44	83,67	78,38						
5																				
6	Anova: fator único																			
7	RESUMO																			
8	Grupo					Tukey					Tukey					Tukey				
9	Contagem					Resumo					Resumo					Resumo				
10	Soma					Módulo da média					Módulo da média					Módulo da média				
11	Médias					Resultado					Resultado					Resultado				
12	Mínimos					Resultado					Resultado					Resultado				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23	ANOVA																			
24	Fonte da variação																			
25	SS																			
26	df																			
27	MS																			
28	F																			
29	valor-P																			
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40																				
41																				
42																				
43																				
44																				
45																				
46																				
47																				
48																				
49																				
50																				
51																				
52																				
53																				
54																				

Figura 13– Print screen da planilha denominada teste de média.

4. Conclusão

A planilha eletrônica desenvolvida neste estudo representa uma solução prática para a validação de métodos analíticos, abordando de forma abrangente e automatizada, aspectos fundamentais como linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, seletividade e teste de médias. Estruturada para oferecer clareza e facilidade de uso, a ferramenta permite que profissionais e pesquisadores insiram seus dados experimentais e obtenham uma análise detalhada e confiável em cada etapa do processo de validação. Cada funcionalidade da planilha foi cuidadosamente projetada, desde o cálculo dos resíduos da regressão e teste de premissas até a comparação de médias e verificação de interferências, proporcionando uma avaliação robusta e abrangente dos parâmetros de desempenho analítico.

Essa abordagem automatizada não apenas aumenta a eficiência e reduz o tempo de análise, mas também garante maior consistência e precisão nos resultados, atendendo às exigências normativas e padrões de qualidade esperados para métodos analíticos. Assim, espera-se que essa ferramenta gratuita se torne um recurso essencial para laboratórios e profissionais da área, promovendo a padronização e assegurando que métodos novos e adaptados atendam aos critérios de confiabilidade e robustez. Em suma, a planilha eletrônica apresentada surge como uma contribuição valiosa para a modernização dos processos analíticos, facilitando a validação de métodos com rigor e praticidade.

Por fim, foi produzido um vídeo demonstrativo que explica o funcionamento da planilha, complementando a descrição de suas funções e os exemplos apresentados. O vídeo está disponível no seguinte link: <https://youtu.be/9hrMOKk09ec>.

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 a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pela infraestrutura fornecida.

6. Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals**. Washington, D.C., 2002.

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. 60-67, jun. 2012.

BELSEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity**. New York: Wiley, 292 p., 1980.

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, jul. 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, abr. 2009.

DE SOUSA, L. R. **Verificação da linearidade e efeito matriz do herbicida ametrina em milho (*Zea mays L.*) e posterior aplicação em amostras reais utilizando o método QuEChERS-CG-EM**. 2024.

DE SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. Tese (Doutorado) — Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.06.031.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. 2nd ed. 2014.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. SANTE/11813, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1)**. Geneva, 2010.

JENKE, D. R. **Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters**. Instrumentation Science & Technology, v. 26, n. 1, p. 1-18, 1998.

LITTELL, R. C. et al. **SAS for mixed models**. 2nd ed. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2006.

MCDONALD, J. H. **Handbook of biological statistics**. Baltimore, MD: Sparky House Publishing, 2009.

MELO, M. L. S.; SOUZA, J. R. de. **Estudo do efeito de matriz na determinação de metais em óleos básicos rerrefinados por fluorescência de raios X por energia dispersiva**. Química Nova, v. 38, n. 5, p. 614-621, 2015.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES (NATA). **General accreditation guidance: Validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Sydney, 2018.

NOGUEIRA, C. H. **Testes para comparações múltiplas de médias em experimentos com tendência e dependência espacial**. 2017. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agropecuária) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2017.

PHARMACOPEIA, U. S. **Validation of compendial methods**. Section 1225. In: United States Pharmacopeal Convention. Rockville, MD, 1999.

RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004.

RIBEIRO, F. A. L. et al. **Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Química Nova, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SOARES, A. A. **O índice de capacidade multivariado como instrumento para avaliação do processo em uma operação de usinagem**. 2006. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção.

SOARES, Sandro B. et al. **Extraction Method for Determining Dinotefuran Insecticide in Soil Samples**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 35, n. 6, p. e-20230190, 2024.

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

TOMASINI, D. et al. **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. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.05.068.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Definition and procedure for the determination of the method detection limit, revision 2**. Washington D.C., USA, 2016.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. **Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada**. Química Nova, v. 32, p. 1278-1287, 2009.