

Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral

Alice A. da Matta Chasin¹, Elizabeth de S. Nascimento², Luciane M. Ribeiro-Neto^{3*}, Maria Elisa P. B. de Siqueira⁴, Maristela H. Andraus³, Myriam C. Salvadori^{3*}, Nilda A. G. de Fernícola⁵, Rosângela Gorni⁶, Sonia Salcedo⁶

Resumo

A validação de um método é um dos elementos básicos em sistemas de qualidade e que integra os programas de Boas Práticas de Laboratório. Visa assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar, podendo-se empregar diferentes procedimentos, em função do objetivo da análise. O presente artigo reúne conceitos básicos dos parâmetros de validação empregados em análises toxicológicas, bem como avalia a aplicação prática numa rotina laboratorial. São conceituados e exemplificados linearidade, intervalo dinâmico, curva de calibração, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação, abrangência, especificidade e robustez.

Unitermos: análises toxicológicas, validação, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, robustez, especificidade.

Abstract

METHOD VALIDATION IN TOXICOLOGICAL ANALYSIS: A GENERAL APPROACH

Method validation is a key element in quality assurance systems, which is part of Good Laboratory Practices. Validation procedures assure that the method achieves its goal of identification and/or quantification of an analyte and is conducted according to the aim of the analysis. This paper presents the basic concepts of validation parameters commonly used in toxicological analysis, as well as evaluates the practical application in a laboratory routine. The studied parameters were linearity, dynamic range, calibration curve, sensitivity, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy, recovery, scope, specificity and ruggedness.

Keywords: toxicological analyses, validation, linearity, precision, accuracy, specificity, ruggedness.

O procedimento de validação dos métodos pode ser tedioso, porém a consequência de não fazê-lo é, com certeza, um desperdício de tempo, dinheiro e recursos. (J. Mark Green, 1996¹)

Introdução

A qualidade e a credibilidade de um trabalho ana-

lítico se fundamentam nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida. Se o analista não se preocupa em estabelecer parâmetros como linearidade, sensibilidade, limite de detecção ou precisão, dificilmente conseguirá obter dados que tenham um significado real.

A validação de um método analítico pode ser realizada de diversas maneiras e depende do objetivo da análise^{2, 3, 4}. As análises de resíduos, por exemplo, onde

1 Faculdades Oswaldo Cruz e Instituto Médico Legal de São Paulo; 2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 3 Departamento de Controle e Pesquisas Antidopagem do Jockey Club de São Paulo, Rua Bento Frias 248, São Paulo - SP, CEP 05423-050; 4 Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Minas Gerais; 5 CETESB; 6 Nestlé Industrial e Comercial Ltda.
* Endereço atual: Toxicon Assessoria Toxicológica.
** Autor a quem deve ser enviada a correspondência.

as concentrações de interesse se situam em níveis de grandeza extremamente pequenos (ppb ou ppt) requerem um cuidado maior do que quando, em determinado contexto, se analisa, por exemplo, a porcentagem de componentes de uma formulação.

A validação de um método é um dos elementos básicos de sistemas de qualidade laboratorial, como propõem as Boas Práticas de Laboratório - BPL e a ISO GUIA-25, entre outros. Esses sistemas de qualidade enfatizam a importância da capacitação do analista, da adequação dos equipamentos e condições laboratoriais, de protocolos de trabalho definidos e bem elaborados, de procedimentos operacionais padronizados, de cuidados na documentação desses procedimentos e dos dados obtidos, de auditorias internas e externas e de validação da metodologia utilizada.

Qualidade é um conjunto de atributos que determina a aceitação de um produto. Para o *Food and Drug Administration* - FDA a qualidade é a segurança e a eficácia de um produto; já para uma indústria, a qualidade de seus produtos estabelece sua reputação e para um laboratório analítico a qualidade representa a confiabilidade do dado gerado⁵.

Entre as técnicas utilizadas para se estabelecer a qualidade de um trabalho analítico estão o uso de gráficos de controle, o uso de equipamentos e analistas diferentes, a observação da repetibilidade e da reprodutibilidade, a participação em testes de proficiência e a inserção de amostras de referência. É importante assegurar que o dado gerado por um laboratório, obtido através da utilização de um processo analítico específico, se encontre inserido entre certos limites de confiabilidade. Exemplo: 246 mg/dL de colesterol compreende, de fato, um intervalo de confiança relativo ao desvio padrão (erro padrão) ao redor da média, ou seja, $246,0 \pm 0,2$ mg/dL.

A validação, ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Entre esses fatores podem ser citados a variabilidade da amostra, eventual contaminação, reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, variações e descuidos na manutenção dos equipamentos, além de calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise.

A melhor forma de se evitar problemas com um método analítico é realizar uma validação adequada durante o desenvolvimento desse método. Quando um método é usado no laboratório que o padronizou, poucos são os ajustes que devem ser feitos para que possa ser aplicado, porém ao se tentar transferi-lo para outros laboratórios surgem inúmeras dificuldades.

Existem diversas formas de se conduzir a validação de um método analítico, como pode ser observado através da literatura^{5, 6, 7, 8, 9, 10}. Diferentes autores sugerem métodos diversos para validar seus trabalhos. A validação tem por objetivo assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar, ou seja, que

sua performance permita produzir resultados que se enquadem às necessidades do problema em questão.

O presente artigo foi elaborado por um grupo de profissionais das diferentes áreas da Toxicologia, visando abranger aspectos e particularidades inerentes de cada uma delas. Assim, buscou-se apresentar formas gerais de se estabelecer parâmetros de validação de métodos analíticos que possam auferir credibilidade aos dados gerados e que deverão ser estabelecidos dependendo da finalidade da análise. Foram conceituados e exemplificados a linearidade, curva de calibração, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação, abrangência, especificidade, estabilidade e robustez.

Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível se relacionar o valor de uma variável dependente - medida - através do conhecimento da variável independente - concentração.

As técnicas de se adequar a reta aos dados e verificar o quanto a reta descreve os dados chamam-se regressão e correlação, respectivamente.

A linearidade é determinada pela análise de uma série de calibradores, ou seja, soluções de diferentes concentrações, abrangendo a faixa de concentração de interesse no trabalho⁹, ou seja, varia em função da finalidade da análise e do tipo de instrumental utilizado. Por exemplo, em análise de drogas de abuso em material biológico preconiza-se que a faixa de concentração dos calibradores deva abranger desde o limite de quantificação (LQ) estimado, até três ordens de magnitude desse valor, ou seja, 1 a 1000ng/mL, se o LQ for de 1ng/mL. Por outro lado, em análises de resíduos a faixa de concentração pode abranger apenas 1 ordem de magnitude. O número de calibradores é definido em função da faixa de concentração de interesse, devendo ser de, no mínimo, seis. A análise de regressão normalmente utilizada é a dos mínimos quadrados, na qual a variável independente refere-se à concentração teórica da substância em questão presente na matriz¹¹.

Conceitua-se intervalo dinâmico (*dynamic range*) como sendo a faixa linear utilizável e cujo cálculo pode ser feito pelo coeficiente de correlação (r) ou pelo coeficiente de determinação (r^2) da curva dos calibradores, utilizando-se o LQ como o calibrador mais baixo e a remoção sucessiva dos mais altos, até que se obtenha um coeficiente de determinação satisfatório, de cerca de 0,98¹¹.

A regressão deve ser representada graficamente e através de transformações matemáticas bem definidas (equação da reta), enquanto que a correlação pode ser expressa através do coeficiente de correlação (r de Pearson) ou do coeficiente de determinação (r^2)^{12, 13, 14}.

Curva de calibração

Curva de calibração é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações de um dado analito.

Várias formas de curvas de calibração podem ser utilizadas, dependendo da natureza da análise:

- curva de calibração do instrumento*: relaciona a resposta do aparelho com a massa do analito, sem levar em conta a interferência da matriz;
- curva de calibração com adição do analito à matriz*, que visa eliminar interferência da matriz e de outras etapas do método. O analito pode ser adicionado na etapa inicial do método, sendo esta conduta utilizada quando não for possível suprimir os efeitos relacionados à matriz, ou na fase final, imediatamente antes da realização da medida pelo equipamento. No primeiro caso há correção das perdas durante o processo analítico, enquanto que no segundo caso ocorre a correção das leituras do instrumento.

Em métodos cromatográficos pode-se, ainda, utilizar a adição de uma quantidade fixa de um padrão secundário (padrão interno), cuja medida (área, altura, etc..) permite a comparação relativa com o analito sem, no entanto, interferir com a resposta do mesmo. Um padrão interno será tanto melhor quanto maior sua semelhança estrutural ao analito. Recomenda-se que a proporção de 1:1 entre as medidas do padrão interno em relação à do analito seja o ponto central da curva.

Qualquer que seja o método de calibração, a curva deverá apresentar o seguinte tratamento estatístico: equação de regressão e coeficiente de correlação (r) ou de determinação (r^2). Sugere-se, também, que se represente o limite do intervalo de confiança (LIC), o qual fornece uma demonstração mais explícita da dimensão e da incerteza das medidas^{15, 16}.

Sensibilidade

Pode-se definir sensibilidade como sendo a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas^{13, 17}. A sensibilidade é utilizada como um parâmetro comparativo entre dois métodos.

Há, pelo menos, duas formas de se estabelecer a sensibilidade:

- De acordo com Miller¹³ e Angerer¹⁸, a sensibilidade é definida como a inclinação (*slope*) da curva de calibração que possibilite a medida em qualquer ponto. O gráfico da função de calibração é obtido colocando-se o valor observado da medida x (ordenada) como função da concentração do analito c (abscissa).

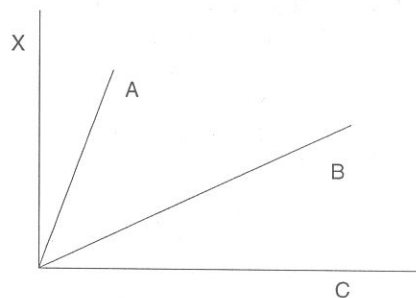


Figura 1. Comparação gráfica de dois métodos quanto à sensibilidade

Ilustrando graficamente, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal (x) em relação a pequenas variações de concentração (c), conforme ilustra o exemplo da Figura 1, no qual o método A é mais sensível que o B.

Quanto maior for o coeficiente angular, maior será a sensibilidade do método. Por exemplo, na determinação de cocaína por cromatografia a gás com detectores de ionização de chama (GC-FID) e seletivo de massa (GC-MS) obteve-se as seguintes equações da reta, respectivamente: $y = 3,54 \cdot 10^{-4}x + 1,1719 \cdot 10^{-3}$ e $y = 4,3 \cdot 10^{-3}x + 0,007$. A análise dos coeficientes angulares mostra que o método GC-MS é mais sensível (maior intervalo do sinal y em relação às mesmas diferenças de concentração).

- Nos casos onde não for possível a construção da curva pode-se utilizar a equação proposta por Taylor¹⁷: $S = \Delta C = 2 \sqrt{2} d$, onde: $S = \Delta C$ = diferença entre as concentrações analisadas; d = desvio padrão no nível de concentração de interesse.

Quanto menor o valor de d maior será a sensibilidade do método. Como exemplo pode-se citar a dosagem de carboxihemoglobina:

- para concentração média de 0,53% COHb (LQ 0,5%) com intervalo entre 0,40 - 0,59 ($n = 10$) e $d = 0,06$:
 $S = 2 \sqrt{2} \cdot 0,06 = 0,17 \% \text{ COHb}$;
- para concentração média de 4,98% de COHb com intervalo de 4,78 - 5,09 ($n = 10$) e $d = 0,09$:
 $S = 2 \sqrt{2} \cdot 0,09 = 0,25 \% \text{ COHb}$

Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção é a menor concentração ou quantidade de uma substância química que pode ser identificada por um procedimento analítico com um nível de confiança especificado ou ainda, que pode ser estatisticamente diferenciada do ruído. De acordo com Taylor¹⁷, é o ponto onde o valor da medida é maior do que a incerteza a

ela associada. Existem alguns tipos de limite de detecção, cada um com um objetivo estabelecido: limite de detecção do instrumento (LDI), limite de detecção do método (LDM) e limite de quantificação (LQ).

O *limite de detecção do instrumento* (LDI) é definido como a concentração ou quantidade de uma dada substância que produz um sinal ou resposta maior do que $3s$ (onde s = desvio padrão de uma série de medidas do branco). Em geral, o LDI é utilizado como guia para o estabelecimento do limite de detecção do método.

Limite de detecção do método (LDM) é a menor concentração do analito na amostra que, quando submetida a todo o processo analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método.

Limite de quantificação do método é a menor concentração do analito que pode ser medida com uma precisão especificada¹⁹. Costuma ser definido como $10s$. Segundo Taylor¹⁷, neste ponto o erro associado a medida é de 30% com 99% de probabilidade.

O termo sensibilidade é geralmente confundido com limite de detecção. Na verdade, se equivalem quando uma das concentrações enfocadas é o "zero" (branco de referência). Nesta concepção, o *limite de detecção* constitui um caso particular de *sensibilidade*.

Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. Seu valor depende de erros indeterminados, aleatórios e impossíveis de serem eliminados. Esta variabilidade pode ser avaliada em diversas condições:

- condições de repetibilidade: são condições em que resultados independentes são obtidos usando o mesmo método para a mesma amostra no mesmo laboratório, pelo mesmo operador usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo;
- condições de reprodutibilidade: são condições onde resultados são obtidos usando o mesmo método e mesma amostra em diferentes laboratórios, por diferentes operadores, usando diferentes equipamentos. Pode ser também avaliada parcialmente através da variação de um ou mais dos fatores acima citados. Neste caso deve ser explicitado a variável avaliada. Esta avaliação de precisão intermediária pode ser utilizada para identificar quais dos fatores acima contribuem significativamente para a variabilidade do resultado final.

A medida da precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ou reprodutibilidade. Através do conhecimento da variabilidade do método podem ser definidos dois conceitos:

- repetibilidade (r): é a diferença máxima entre dois resultados individuais obtidos em condições de re-

petibilidade. Este valor não deve exceder um determinado limite calculado como: $r = t \times \sqrt{2} \times s_r$

- reprodutibilidade (R): é a diferença máxima entre dois resultados individuais obtidos em condições de reprodutibilidade. Este valor não deve exceder um determinado limite calculado como: $R = t \times \sqrt{2} \times s_r$

O valor de t pode ser usado como aproximadamente 2, o que significa 95% de probabilidade na tabela t de Student. De acordo com a tabela t de Student, o número adequado de repetições deve ser superior a 20 e, dependendo do objetivo da análise, pode-se utilizar o valor mínimo de 6. Preconiza-se que sejam utilizadas amostras naturais (autênticas), uma vez que pode existir diferença de interação entre o analito e a matriz.

O termo repetibilidade pode ser usado para definir a precisão intralaboratorial, enquanto que o termo reprodutibilidade se aplica à precisão interlaboratorial.

Exatidão

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise. É avaliada através da inexactidão ou *bias* (vies ou tendenciosidade), ou seja, o afastamento entre os valores esperado e obtido. É associada a erros sistemáticos e pode ser representada pela equação:

$$\text{inexactidão (\%)} = \frac{\text{concentr. obtida} - \text{concentr. esperada} \times 100}{\text{concentração esperada}}$$

Por exemplo, um método que tenha uma inexactidão de $\pm 2\%$ significa que os resultados estão, respectivamente, 2% acima ou abaixo do valor esperado, ou seja, tem uma tendenciosidade de 2% associada ao valor medido.

Existem, basicamente, dois tipos de amostras para o estudo da exatidão:

- amostra certificada ou amostra de estudo colaborativo: são amostras de concentração conhecida, as quais foram submetidas à análise por laboratórios credenciados e que após estudo estatístico, é estabelecida a concentração esperada. Existem instituições que fornecem amostras certificadas e/ou amostras de estudos colaborativos, como por exemplo o National Institute of Drug Abuse (NIDA) e o Community Bureau of Reference (BCR);
- amostra adicionada de padrão: são amostras adicionadas do analito, as quais são submetidas ao método de análise. Sempre que possível opta-se por uma amostra autêntica de concentração conhecida, uma vez que podem existir diferenças de interação entre o analito e a matriz.

Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra. É calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{recuperação \%} = \frac{\text{média do valor obtido} \times 100}{\text{média do valor adicionado}}$$

Pode-se fazer uma diferenciação entre a chamada recuperação absoluta e a relativa. Recuperação absoluta expressa a variação entre a quantidade obtida após extração e aquela decorrente da adição após o processo de extração; a recuperação relativa mostra a mesma variação no caso de amostras que são submetidas a outros tratamentos que não a extração, como seja a derivação do analito. Por exemplo, no cálculo da recuperação relativa do método de análise do cetoprofeno com extração líquido-líquido, derivação e detecção por GC-MS, observam-se valores nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente, os valores para a curva de adicionados de cetoprofeno; os valores para a curva de padrões de cetoprofeno e os cálculos da recuperação relativa.

Tabela 1 - Valores obtidos para a curva de adicionados de cetoprofeno

	Conc (ng/mL)	área do íon base
ponto 1	300	1.185.909
ponto 2	400	1.627.844
ponto 3	600	2.602.212

Tabela 2 - Valores obtidos para a curva padrão de cetoprofeno

	Conc (ng/μL)	área do íon base
ponto 1	2	658.389
ponto 2	4	1.350.246
ponto 3	6	1.821.599
ponto 4	15	5.576.178

Tabela 3 - Cálculo da recuperação relativa de cetoprofeno

Conc (ng/mL)	Conc adicionada (ng/μL)	Conc obtida (ng/μL)	recuperação (%)
300	15	3.70	24.7
400	20	4.86	24.3
600	30	7.40	24.7

Especificidade

O termo especificidade é muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade uma vez que ambos demonstram a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Para alguns autores o termo especificidade se refere

a um método específico para um único analito, enquanto que seletividade diz respeito a um método que permite a análise de várias substâncias químicas que podem ou não ser distinguíveis. Como são poucos os métodos que respondem a um único analito, o termo seletividade parece mais apropriado.

Para se determinar a especificidade de um método analítico deve-se analisar várias amostras da mesma matriz e determinar a proporção da interferência dos componentes inerentes à matriz. Caso seja significativa, os parâmetros analíticos devem ser alterados.

Robustez

É a habilidade do resultado de um método permanecer inalterado por pequenas mudanças de parâmetros operacionais e ambientais, como diferentes analistas, temperatura do ambiente, pH e concentração da fase móvel, materiais de diferentes procedências, temperatura e volume de injeção etc^{9, 20, 21}.

A robustez de um método pode ser determinada através da análise individual ou simultânea dos parâmetros mais sujeitos à variação. No primeiro caso, se a performance da coluna utilizada em cromatografia se alterar ao longo do tempo, pode-se ajustar a força da fase móvel para compensar estas alterações, desde de que esses dados estejam incluídos na validação. No segundo caso, pode-se avaliar a robustez através de testes interlaboratoriais.

Um exemplo de critério de robustez seria a determinação dos efeitos de mudanças de pH ou de temperatura da coluna em uma análise cromatográfica. Se estas alterações estiverem dentro de limites que produzam cromatogramas considerados aceitáveis, estas alterações devem ser incorporadas ao procedimento do método, que é então, considerado robusto.

Abrangência

Um método é considerado abrangente quando se mostra capaz de determinar um ou mais analitos em diferentes matrizes ou vários analitos numa mesma matriz. Por exemplo, um mesmo método para detecção de vários metais como chumbo, cádmio e mercúrio em amostras de solo ou a análise de resíduos de praguicidas em diferentes alimentos.

Conclusão

A validação de um método químico é muito importante, pois permite que um trabalho analítico seja realizado dentro de parâmetros definidos, levando à uma melhor aceitação dos dados gerados.

É necessário ressaltar que a validação completa de um método pode exigir um tempo bastante grande por parte do analista, o que pode ser, às vezes, um processo

extenuante. Todavia, a aceitação dos dados gerados pela comunidade científica é proporcional à qualidade do processo de obtenção dos mesmos.

Referências Bibliográficas

1. GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 305A-9A, 1996.
2. SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.J.; SKELLY, J.P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; McDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SEPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical Research*, v. 9, n. 4, p.588-92, 1992.
3. UNITED NATIONS. International Drug Control Programme - *Recommended Guidelines for Quality Assurance and Good Laboratory Practices*: manual for use by national laboratories - New York, 1995. (ST/NAR/25)
4. WHO. Quality control in the occupational toxicology laboratory. Copenhagen, WHO. Regional Office for Europe, 1981. OMS. (European Cooperation on Environmental Health Aspects of the Control of Chemicals-Interim document, 4).
5. APOSTOLI, P. Considerazioni generali sulla quality assurance nel laboratorio tossicologico - I. Valori di riferimento e i valori limite nella prevenzione ambientale e occupazionale. p. 217-28, 1995.
6. HANKS, A. R. Methods development and implementation of quality assurance systems. 1st. International Symposium of Latin American and Caribbean Section - AOAC International, São Paulo, Brazil, 1995.
7. HANKS, A.R. So you are going to validate an analytical method. In: Methods development and implementation of quality assurance systems. 1st International Symposium of Latin American and Caribbean Section - AOAC International, São Paulo, Brazil, 1995.
8. HORWITZ, W., KAMPS, L.R. and BOYER, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 63, n. 6, p. 1344-54, 1980.
9. HUBER, L. Good laboratory practice: a primer for high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV-visible spectroscopy. {s.l.}, Hewlett-Packard, 1993. 138p. (Publication n. 12-5091-6259E)
10. JENKE, D.R.- Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 19, n. 5, p. 737-57, 1996.
11. CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S.Paulo*, v. 30, n.2, p.49-53, 1994.
12. MAC TAGGART, D.L.; FARWELL, S.O. Analytical use of linear regression. Part. I: regression procedures for calibration and quantitation. *JAOAC International*, v. 75, n.4, p. 594-608, 1992.
13. MILLER, J.C.; MILLER, J.M. Statistics for analytical chemistry. 2. ed., Chichester, Ellis Horwood, 1988, 117 p.
14. MULLER, K.E.; BARTOON, C.N.; BENIGNUS, V.A. Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neuro Toxicology*, v. 5, n. 2, p.113-26, 1984.
15. EKSBORG, S.; EHRSSON, H. Calibration curves: calculation and evaluation of accuracy. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.16, p. 629-30, 1994.
16. HENDERSON, A.R. Chemistry with confidence: should clinical chemistry require confidence intervals for analytical and other data? *Clin. Chem.*, v. 39, p.929-35, 1993.
17. TAYLOR, J.K. Quality assurance of chemical measurements. 2. ed., Lewis Publishers, Chelsea, 1987, 79 p.
18. ANGERER, J.; SCHALLER, K.H. Analysis of hazardous substances in biological materials. v. 1, VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985. p. 6-9.
19. GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S.; EATON, A. D. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18.ed., American Public Health Association, Washington DC, 1992. 1030A-1040B.
20. CITAC - CO-OPERATION ON TRACEABILITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY. International guide to quality in analytical chemistry: an aid to accreditation. Middlesex, CITAC, 1995. 51p. (Guide 1).
21. DUX, J. P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. 2. ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1990. 203 p.