

**Aspectos gerais da validação
de métodos químicos,
biológicos e computacionais
na gestão de qualidade de
resultados de pesquisa**

Documentos 75

Aspectos gerais da validação de métodos químicos, biológicos e computacionais na gestão de qualidade de resultados de pesquisa

Vera Lúcia S. S. de Castro

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3311-2650 Fax: (19) 3311-2640
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicação da Unidade

Presidente: *Ariovaldo Luchiari Júnior*

Secretária-Executivo: *Luiz Antônio S. Melo*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Membros: *Ladislau Araújo Skorupa, Heloisa Ferreira Filizola, Adriana M. M. Pires, Emília Hamada e Cláudio M. Jonsson*

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Editoração Eletrônica: *Edislene Aparecida Bueno Ruza*

1ª edição eletrônica
(2009)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Castro, Vera Lúcia S. S. de.

Aspectos gerais da validação de métodos químicos, biológicos e computacionais na gestão de qualidade de resultados de pesquisa. / Vera Lúcia S. S. de Castro. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

28 p. : il. — (Embrapa Meio Ambiente. Documentos; 75)

1. Laboratórios. 2. Sistemas da qualidade. 3. Boas práticas de laboratório. I. Castro, Vera Lúcia S. S. de. II. Título. III. Série.

CDD 001.42

© Embrapa 2009

Autores

Vera Lúcia S. S. de Castro

Veterinária, PhD ,Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340 - Km 127,5 - 13.820-000, Jaguariúna, SP.

E-mail: castro@cnpma.embrapa.br

Apresentação

O crescimento da demanda de sistemas da qualidade aumentou a necessidade de assegurar que os laboratórios que fazem parte de grandes organizações, ou oferecem outros serviços a elas, possam operar sob um sistema de qualidade específico. A validação de procedimentos analíticos é um aspecto vital para subsidiar a confecção de laudos emitidos pelos laboratórios, quer para testes de substâncias químicas quer para produtos biológicos, perante os órgãos oficiais. A principal razão para essa tendência é o credenciamento de laboratórios de acordo com a norma ISO 17025 e as Boas Práticas de Laboratório (BPL) que exigem dos laboratórios a estimativa da incerteza associada aos seus resultados.

Enquanto que a abordagem desenvolvida para a validação dos ensaios químicos é bem determinada em relação à estimativa da incerteza e validação do método, a mesma metodologia não é diretamente aplicável aos ensaios biológicos. A validação dos ensaios e softwares contribui significativamente para a garantia da qualidade dos resultados gerados e para a acreditação de laboratórios.

Dessa forma, nesse Documento objetiva-se preconizar procedimentos harmônicos padronizados e registros fidedignos a fim de dar confiabilidade aos resultados obtidos e laudos fornecidos por laboratórios. Além disso, com a execução e o aprimoramento dos protocolos desenvolvidos, haverá maiores subsídios técnicos para gerenciar possíveis problemas encontrados. A sua aplicabilidade poderá ser examinada e aprimorada em etapas consecutivas pela equipe do laboratório, após o exame dos dados obtidos.

Claudio Aparecido Spadotto
Chefe-Geral
Embrapa Meio Ambiente

Sumário

Introdução	07
1. Validação de métodos de ensaios	09
2. Abordagens para a validação de métodos	10
2.1 Métodos químicos	12
2.2 Métodos biológicos	13
2.3 Métodos computacionais	15
3. Etapas para o desenvolvimento e validação de ensaios	17
3.1 Etapas gerais	17
3.2 Definição de um plano de validação de métodos químicos	21
3.3 Definição de um plano de validação de métodos biológicos	23
3.4 Definição de um plano de validação de métodos computacionais (softwares)	25
4. Considerações Finais	26
Referências	27

Aspectos gerais da validação de métodos químicos, biológicos e computacionais na gestão de qualidade de resultados de pesquisa

Vera Lúcia S. S. de Castro

Introdução

Está sendo cada vez mais reconhecida e exigida a necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

Um laboratório, ao realizar ensaios com qualidade, deve se basear em regulamentações emitidas por organismos de normatização. Conseqüentemente, deve demonstrar que tem condições de executar de maneira adequada estes ensaios de acordo com os métodos normatizados, dentro das condições específicas de suas instalações. Validar um resultado significa garantir que o procedimento, que inclui as condições de operação do equipamento e a seqüência analítica, seja aceito como correto. Além disso, é importante

ênfatar que qualquer alteração em métodos normatizados, publicados ou transferidos implica na necessidade de revalidar o método, para que o laboratório demonstre que os novos métodos utilizados por eles conduzem a resultados confiáveis, que garantam qualidade, idoneidade e credibilidade de seus produtos ou serviços.

O controle do erro é imprescindível em laboratório. Para tanto, é importante assegurar que a variabilidade se mantenha controlada para cada metodologia através de medidas de controle intra e interlaboratorial. O principal objetivo é assegurar a consistência dos resultados obtidos. É importante ressaltar que não é possível estimar a incerteza de um procedimento analítico sem o controle da qualidade das medidas realizadas pelo laboratório. Um processo pode ser considerado confiável se os dados registrados encontram-se dentro dos limites de controle e a variabilidade dos resultados individuais se encontra estável. A fim de realizar a avaliação da conformidade dos ensaios deve-se ter pleno conhecimento do processo; obter a fidelidade dos dados coletados representados pelos controles; estabelecer critérios para verificar se as alterações observadas são causadas por variações inerentes ao sistema e se serão estáveis através do tempo ou se ocorrem ocasionalmente.

Uma interpretação adequada dos resultados considera tanto os erros aleatórios quanto os erros sistemáticos do procedimento analítico. Os vieses que levam à incerteza podem ser introduzidos, por exemplo, na coleta do material, na escolha do método, no transporte e armazenamento da amostra, diluições seriadas, temperatura de incubação, etc.; os quais nem sempre podem ser controlados pelo analista. As várias etapas do processo analítico devem ficar sob controle do analista a fim de evitar fontes de erro. Alguns aspectos a serem considerados, mesmo que tratem de cuidados gerais em laboratório, são: a) treinamento adequado da equipe de analistas nas técnicas utilizadas no laboratório; b) manutenção e calibração de equipamentos; c) cuidados com o material utilizado incluindo preparo, esterilização e uso correto; d) realização adequada do procedimento analítico como quantificação de colônias, identificação de microrganismos, etc. e e) acompanhamento da qualidade das análises por um controle de qualidade e testes intra e interlaboratoriais.

1. Validação de métodos de ensaios

A norma NBR ISO/IEC 17025:2005 (International Standard Organization) descreve os requisitos para os laboratórios de calibração e de ensaio atenderem, se desejarem demonstrar que são tecnicamente competentes. As atuais exigências dessa norma fazem com que esses laboratórios implementem procedimentos para validação de métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório ou alterações em métodos normalizados, quando aplicável. A validação de métodos de ensaios é de fundamental importância para comprovar que o método não normalizado desenvolvido é capaz de obter resultados tecnicamente válidos e intercomparáveis.

Validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que foram atendidos os requisitos para uma aplicação ou para uso específicos pretendidos. Segundo Inmetro (2003), com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar: métodos não normalizados; métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; ampliações e modificações de métodos normalizados. Ainda de acordo com Inmetro (2001), método normalizado é aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão; e método não normalizado é aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados.

As normas de qualidade estabelecem mecanismos para promover a confiabilidade dos ensaios realizados evidenciando que os laboratórios operam de acordo com os requisitos estabelecidos pela norma, o que atesta competência técnica na realização de ensaios. No Brasil, verifica-se uma grande lacuna na realização de ensaios adotando sistemas da qualidade. A adequação de análises químicas e biológicas empregadas em conformidade com as normas de qualidade vem permitindo ampliar e fortalecer a infraestrutura dos serviços tecnológicos realizados por laboratórios prestadores de serviço.

A norma internacional ISO/IEC 17025 é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração. Em seu item 5.4.5, a “validação de métodos” é apresentada como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, acompanhada da documentação do

trabalho de validação. A norma NBR ISO/IEC 17025:2005 não especifica a maneira pela qual este procedimento deve ser implementado, mas determina que controles sejam estabelecidos.

Assim sendo, cada laboratório deve adotar o procedimento mais adequado ao seu caso específico, observando as exigências da norma, no que se refere especificamente ao item 5.4 – Métodos de ensaio e calibração e validação de métodos. Porém, é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Assim, por exemplo, um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A validação de métodos deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e execução. A estratégia de validação é específica e é influenciada pelo procedimento analítico utilizado, pela natureza e concentração do composto de interesse e pela matriz. Correlacionando-se o desenvolvimento, otimização e validação de métodos de uma maneira lógica e organizada, os laboratórios podem gerar resultados bastante eficientes e produtivos (RIBANI et al., 2004).

A acreditação dos laboratórios exige a validação dos métodos com a estimativa da incerteza associada aos seus resultados. A validação de um método mostra que esse método específico é capaz de servir ao propósito para o qual é usado. A incerteza pode ser definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medida, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao mensurado. A fim de obter a incerteza da medição de um ensaio é necessário o levantamento das fontes de incertezas no processo de ensaio a fim de estimar a possível variação no resultado expresso. Para cada método de ensaio podem-se ter diferentes fontes de incerteza da medição, dependendo do próprio método, equipamentos e instalações utilizadas.

2. Abordagens para a validação de métodos

Os métodos desenvolvidos internamente devem ser descritos em procedimentos documentados, que contenham pelo menos:

a) identificação adequada do procedimento;

- b) escopo;
- c) descrição do tipo de item a ser ensaiado ou calibrado;
- d) parâmetros ou grandezas e faixas a serem determinadas;
- e) referência a aparatos e equipamentos, incluindo os requisitos de desempenho técnico;
- f) referência a uso de padrões de referência e materiais de referência;
- g) determinação das condições ambientais requeridas e período de estabilização necessário;
- h) descrição de todas as etapas do ensaio/calibração.
- i) critério e/ou requisitos para aprovação/rejeição, quando aplicável;
- j) menção aos dados a serem registrados e ao método de análise e apresentação dos resultados;
- k) referência ao procedimento para determinação da incerteza de medição.

A NBR ISO/IEC 17025:2005 determina em seu item 5.4.5.2 que o laboratório deve registrar tanto os resultados obtidos dessa validação quanto o procedimento utilizado para tanto, além de uma declaração de que o método é ou não adequado para o uso pretendido. De acordo com a NBR ISO/IEC 17025:2005, convém que a técnica utilizada para a determinação do desempenho do método seja uma das seguintes ou combinação das mesmas: calibração com o uso de padrões de referência ou materiais de referência; comparações com resultados obtidos por outros métodos; comparações interlaboratoriais; avaliação sistemática dos fatores que influenciam o resultado; avaliação da incerteza dos resultados com base no conhecimento científico dos princípios teóricos do método e na experiência prática. A NBR ISO/IEC 17025:2005 orienta que a atividade de validação é sempre um equilíbrio entre custos, riscos e possibilidades técnicas. Existem casos em que a faixa e a incerteza dos valores só podem ser fornecidas de forma simplificada devido à falta de informações.

A incerteza expandida é uma quantidade que define um intervalo sobre o

resultado de uma medição que pode ser esperado para compreender uma fração de uma distribuição dos valores, que podem ser razoavelmente atribuídos a um mensurando. Ela fornece um intervalo de confiança dentro do qual existe a maior probabilidade de se encontrarem valores que poderão ser atribuídos ao valor verdadeiro. A fim de estimar a incerteza geral, é necessário tratar separadamente cada fonte de incerteza para obter a contribuição total. A partir desses componentes, obtém-se, então, a incerteza combinada que é expressa como a raiz quadrada positiva da soma dos quadrados das incertezas individuais na mesma unidade.

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos. O primeiro tipo, chamado de validação no laboratório, consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada durante o desenvolvimento de uma metodologia, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo.

Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação. Protocolos internacionalmente aceitos têm sido estabelecidos para a validação completa interlaboratorial, mais precisamente o Protocolo Harmonizado Internacional e o procedimento ISO. Estes protocolos requerem um número mínimo de laboratórios e materiais testes para serem incluídos no estudo interlaboratorial para validação completa do método analítico (Regitano et al., 2004).

2.1. Métodos químicos

As características de desempenho do método de ensaio químico devem estar claramente declaradas no procedimento documentado e incluir: especificidade e seletividade; faixa de trabalho e faixa linear de trabalho; linearidade; sensibilidade; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão e tendência (*bias*); precisão; robustez; incerteza de medição (Inmetro, 2003). Condições que determinam a validade de um método variam em

função das condições operacionais do laboratório, bem como das práticas utilizadas pelos profissionais envolvidos. Mudanças substanciais nas condições em que as análises são feitas (materiais ou humanas) deveriam determinar a necessidade de uma revalidação do método.

Dessa forma, na validação da metodologia de análise de resíduos de produtos fitossanitários deve ser verificada a adequação dos procedimentos propostos ou estabelecidos, para a combinação específica ingrediente ativo - matriz, dentro de determinados parâmetros operacionais do laboratório executante. Na validação todos os aspectos do método que podem influenciar os resultados devem ser rigorosamente controlados e os parâmetros do método são estabelecidos. Por parâmetros do método entende-se por Exatidão, Precisão, Limite de Detecção (LOD), Limite de Quantificação (LOQ), Especificidade, Linearidade, Faixa e Robustez. Por limite de detecção (LOD) entende-se o nível de resíduos na amostra acima do qual se pode afirmar, com 95% de certeza, se existem resíduos presentes na amostra. Por outro lado, limite de quantificação (LOQ) é o nível de resíduos na amostra acima do qual se pode afirmar, com 95% de certeza, qual o nível de resíduos que estão presentes na amostra. Neste contexto, ND (Nada Detectado) significa qualquer nível de resíduos abaixo do limite de detecção. O limite inferior de validação é o limite de quantificação (LOQ), e o limite superior de validação é o maior nível no qual se validou o método. O resultado desses controles fornece os parâmetros do método, os quais irão indicar a eficiência de todo o procedimento analítico. Na prática, a eficiência do procedimento analítico é obtida pela determinação da porcentagem de recuperação do analito em múltiplas amostras de matrizes representativas de testemunha, fortificadas em diversos níveis.

2.2. Métodos biológicos

As abordagens desenvolvidas para análises químicas, em relação à estimativa de incerteza e validação de método, não são diretamente aplicáveis aos ensaios biológicos. É reconhecidamente difícil estimar a incerteza de ensaios que utilizam organismos, como espécies animais e vegetais, dificultando, conseqüentemente, o atendimento deste requisito da norma. Em conseqüência, os laboratórios que desenvolvem ensaios biológicos, assim como a comunidade analítica em geral, estão se preocupando cada vez mais com a estimativa da incerteza de medida dos resultados produzidos; devido ao credenciamento de laboratórios na ISO 17025 e Boas Práticas de Laboratório (BPL).

O comportamento dos organismos é dependente das características do próprio organismo e das condições ambientais do laboratório. Em testes realizados com organismos vivos, como ratos, peixes, minhocas, microcrustáceos, etc.; o comportamento dos organismos teste depende de condições ambientais no laboratório. Nesse caso, há a necessidade do desenvolvimento de metodologia para a validação desses ensaios, levando em consideração as características de cada um.

Pode se tornar difícil estabelecer com precisão a contribuição de cada passo individual do processo analítico desde que o analito é um microrganismo vivo, cujo estado fisiológico pode ser largamente variável. É importante reconhecer que nem todos os componentes farão uma contribuição significativa para a incerteza combinada, e que na prática é provável que só o faça um pequeno número (ELLISON et al., 2000). Na estimativa da incerteza total, deve ser considerada a incerteza de cada um dos componentes que contribuem para a mesma.

As técnicas de DNA recombinante utilizadas em análises microbiológicas, por sua vez, promoveram o acúmulo exponencial de seqüências gênicas e genomas depositados em bancos de dados públicos mundiais. Esse acúmulo tem aumentado a demanda por metodologias que permitam sua identificação funcional ou confirmação de homologia, além da elucidação dos padrões de expressão. Entretanto, os métodos moleculares apresentam dificuldades para a sua validação devido a fatores tais como: variação no desempenho dos termocicladores, variação na qualidade dos reagentes e equipamentos e eficiência das diferentes polimerases e a presença de inibidores da PCR na matriz da amostra (FREITAS et al., 2006). Abordagens mais eficientes de análise da expressão gênica em nível genômico constituem-se num desafio presente na identificação e no estudo simultâneo de um grande número de genes envolvidos em diversos processos biológicos, desde o desenvolvimento dos organismos até suas interações com fatores ambientais (DONSON et al., 2002).

A análise convencional de genes individuais por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase ou RT-PCR, apesar de precisa e robusta, não apresenta a eficiência e a rapidez necessárias para acompanhar o ritmo de seqüenciamento e descoberta de novos genes (CALSA JUNIOR et al., 2004). Entre os métodos abertos de análise global de transcritos, várias técnicas baseadas na eletroforese em gel têm sido amplamente utilizadas em combinação com a PCR para a detecção e caracterização de genes expressos diferencialmente. Nos métodos moleculares, o número de amostras usadas

na validação de um teste deve incluir o máximo de variantes genéticas presentes na população para a qual o teste vai ser utilizado e sempre que forem introduzidas novas variantes deverá ocorrer a revalidação do teste. As amostras fenotipadas devem ser analisadas em estudo cego para avaliação do método.

Uma estratégia de amostragem e análise microbiológica, por exemplo, de alimento, significa um procedimento planejado para selecionar amostras de uma população e para conduzir a amostragem para obter as informações necessárias. Este plano determina como os resultados podem ser interpretados e se as informações de sistemas diferentes são comparáveis ou não. Em alimentos, isto pode ser alcançado naturalmente usando produtos contaminados ou amostras de produtos com níveis predeterminados de contaminação. Apesar da contaminação de uma matriz só imitar de modo superficial a presença de contaminantes naturais, é freqüentemente a melhor solução disponível. Tais preocupações são também aplicáveis aos testes com biopesticidas em mamíferos (roedores), já que são processos complexos de análise e incluem vários passos desde a amostragem dos tecidos dos animais expostos, preparo da solução inicial, condições de isolamento e métodos de quantificação de colônias, entre outros.

Segundo Feldsine et al. (2002), o protocolo de validação de procedimento de análise qualitativa moleculares como a detecção de patógenos em alimentos consiste em uma série de experiências na qual são avaliados os seguintes parâmetros: a) Validação intralaboratorial com a análise de tipos diversos de alimentos, de diferentes níveis de inóculo e controles, bem como de número de porções testadas por inóculo. Devem ser avaliados ainda ao menos dois lotes de cada tipo de alimento contaminado naturalmente, além de controles de amostras inoculadas e não inoculadas no mesmo período para verificar se há contaminação cruzada; b) Validação interlaboratorial com vários laboratórios, tipos de alimento, cultura de inoculação e doses. Devem ser avaliadas ainda amostras contaminadas natural e artificialmente além de testes para diferença significativa e indicadores de desempenho entre os laboratórios.

2.3. Métodos computacionais

Em relação aos métodos computacionais - softwares, há alguns procedimentos propostos que deverão ser avaliados e adaptados as condições de cada ensaio e infra-estrutura laboratorial (SHIN; NAM, 2007). O processo de validação de um software é difícil porque, em geral, os programas apresen-

tam comportamentos dependentes dos dados de entrada, os quais são muito variados em um sistema que opera com banco de dados e trabalha com grande quantidade de cálculo numérico (STEMPNIAK; LANDGRAF, 2003). Existem diversos métodos disponíveis para assegurar a qualidade de um software, tais como: a) Métodos analíticos – tratam das características finais do software produzido; b) Métodos construtivos – tratam do processo de desenvolvimento do software. Nesta categoria, pode-se assegurar a qualidade do software através do emprego de técnicas validadas para o processo de desenvolvimento do software, como para as fases de documentação, projeto, implementação, simulação, etc.; c) Métodos gerenciais – tratam da qualidade do software dentro do âmbito geral dos sistemas de gestão da qualidade.

As abordagens de validação empregadas para um software podem incluir padrões visuais da interface com o usuário, experimentação da interface pelo próprio usuário (facilidade de aprendizagem e aplicação do software para as finalidades práticas a que se destina); uso de métodos e técnicas convencionais para processamento dos resultados; execução de testes tipo caixa preta submetendo determinados componentes do software a entradas conhecidas e confrontar os resultados com valores também conhecidos; validação na origem das informações pré-armazenadas como tabelas e fórmulas matemáticas e validação de dados pelo próprio usuário que consiste na disponibilização de funcionalidades no software para o próprio usuário poder verificar, indicar a situação e proteger as informações contra alterações inadvertidas após tê-las validado.

De acordo com o Inmetro (2003a), a validação dos softwares comerciais não é necessária, mas sim das planilhas criadas segundo um software comercial. Uma planilha ou programa é sempre validado antes de sua primeira utilização ou após qualquer modificação. Uma planilha é validada comparando-se os resultados gerados com o processamento manual dos dados. A comparação também pode ser feita com outras planilhas ou programas previamente validados ou softwares comerciais. Qualquer alteração em um programa ou planilha é submetida a uma nova validação e o número da nova versão consta do nome do programa ou planilha ou do próprio documento, além de constar do documento de validação gerado. Os softwares desenvolvidos pelos laboratórios, bem como as adaptações dos softwares comerciais, devem ser validados. É importante ressaltar que qualquer que seja a sistemática adotada para validar as planilhas deverá ter a aprovação do chefe do laboratório. É recomendável que os documentos de texto sejam conferidos, confrontando-se seu conteúdo com os dados originais.

3. Etapas para o desenvolvimento e validação de ensaios

3.1. Etapas Gerais

As etapas gerais para o desenvolvimento e a validação de métodos de ensaio são:

1. Definição do ensaio e estabelecimento do embasamento técnico-científico - Nesta etapa, são definidos o objetivo do ensaio, o uso e as aplicações pretendidas através de consulta a bibliografia pertinente, tais como normas nacionais, normas internacionais, documentos técnicos, artigos científico, etc. A escolha do método analítico será em conformidade com as condições experimentais, segurança, custo, rapidez de resposta e possibilidade de automação. Preferencialmente, se possível, utilizar métodos publicados como normas nacionais, regionais e internacionais em sua última edição. Essa consulta auxilia na definição das bases do desenvolvimento do método e dos requisitos e sistemática para validação. Além da bibliografia pertinente pode-se se consultar especialistas de universidades e empresas que adotam o ensaio a ser implantado ou similar em sua rotina de teste.
2. Levantamento das necessidades materiais e de pessoal - Nesta etapa, devem-se especificar os equipamentos necessários e realizar levantamento de necessidades de modificações de infra-estrutura do laboratório e estabelecer o sistema de segurança necessário para o ensaio de forma a garantir a integridade física dos colaboradores e equipamentos utilizados. Ainda nessa etapa, é verificada a competência dos colaboradores para a execução do ensaio em questão, a definição da necessidade de contratação ou treinamento de colaboradores.
3. Elaboração e aprovação do procedimento de ensaio - Nesta etapa deve ser realizada a elaboração do procedimento de ensaio, quando necessário, através de ensaio piloto, repetindo quantas vezes forem necessárias para a concretização dos resultados encontrados e para certificar-se que o procedimento de ensaio condiz com o procedimento de uso do equipamento. O Plano de Desenvolvimento e Validação de Métodos de Ensaio deve apresentar informações quanto à descrição e cronograma das etapas do processo, às especificações e sistemática de aprovação de insumos, reagentes e equipamentos e instrumentos; à sistemática de validação, às especificações da qualidade analítica utilizadas para validar o desempenho

do ensaio e à aplicação de ações corretivas para resultados inadequados. Devem ser registrados, quando aplicável; as normas consultadas, os procedimentos de segurança, os equipamentos utilizados, o manuseio do material e dos equipamentos, os resultados e a estimativa da incerteza além da forma de coleta e registro dos dados. A elaboração do procedimento de ensaio, quando necessário, deve ser iniciada através de ensaio piloto, repetindo quantas vezes forem necessárias para a concretização dos resultados encontrados e para certificar-se que o procedimento de ensaio condiz com o procedimento de uso do equipamento. Os planos devem ser atualizados à medida que se efetua o desenvolvimento e deve ser assegurada uma comunicação efetiva entre todo o pessoal envolvido.

4. Calibração de equipamentos e padrões e manutenção - Nesta etapa devem ser verificadas as necessidades com relação a calibração e ajuste dos equipamentos para a realização do ensaio de acordo com procedimento institucionais bem como estabelecido o plano de manutenção periódica dos equipamentos utilizados. Os equipamentos e materiais devem ser calibrados e/ou verificados periodicamente segundo critério de uso definido pelo laboratório. Aqueles cujos resultados de calibração tenham sido considerados não-conformes (erros aceitáveis maiores que o estipulado) sofrerão as ações corretivas: verificação de necessidade de ajustes e manutenção e nova calibração. As necessidades com relação à calibração e ajuste dos equipamentos devem ser verificadas para a realização do ensaio de acordo com procedimento institucionais, para controle de equipamentos de medição, inspeção e ensaios. Os equipamentos e materiais utilizados em ensaios e análises devem sofrer manutenções preventivas, periódicas e rotineiras além de calibração periódicas, para garantir o seu funcionamento otimizado. Eles devem estar protegidos de fatores que afetem o seu bom funcionamento, como condições ambientais e possuam localização adequada no laboratório, que não introduzam contaminação ao sistema.

5. Realização de estudos de validação, estimativa da incerteza e registro dos dados - As formas de validação são diversas, dependendo do tipo, complexidade e grau de exatidão do ensaio e podem incluir: análise de sistemas de medição; calibração dos padrões de referência ou materiais de referência; comparações diretas com resultados obtidos por métodos normalizados; comparações interlaboratoriais e desenvolvimento de metodologias quando não existentes. Para tanto, nessa etapa, devem ser definidos requisitos para avaliação de cada um dos parâmetros considerados na validação.

A documentação dos métodos deve incluir dados de validação, limitações de aplicabilidade, procedimentos para controle da qualidade, calibração e controle de documentos. Métodos obsoletos devem ser descontinuados, mas devem ser guardados para fins de arquivo e identificados claramente como obsoletos de modo que seja possível comparar dados novos e antigos. Quando os métodos forem revisados, a validação precisa ser também atualizada. Os resultados dos estudos de validação de métodos de ensaios são anexados ao Plano de Desenvolvimento e Validação de Métodos de Ensaios. Para cada ensaio ou estudo deve haver um plano de validação elaborado, realizado e documentado. No caso de não aceitação dos resultados obtidos, deve-se verificar onde está a origem do problema. Assim, pode-se decidir por realizar novos ensaios, mudar o procedimento, investir em novos equipamentos ou ainda em treinamento para os colaboradores. Alterações no método de ensaio podem comprometer os estudos realizados. Desta forma, sempre que uma alteração ocorrer no método, um novo estudo de validação poderá ser requerido, dependendo das alterações realizadas. Uma vez que alterações no método de ensaio podem comprometer os estudos realizados, um novo estudo de validação deverá ser realizado sempre que uma alteração ocorrer no método.

A estimativa da incerteza do ensaio deve ser medida. A fim de estimar a incerteza geral, é necessário tratar separadamente cada fonte de incerteza para obter a contribuição total. Os componentes individuais de incerteza devem ser identificados e demonstrados estar sob controle bem como terem a sua contribuição avaliada para a variabilidade de resultados. A principal tarefa na atribuição de um valor para a incerteza de uma medição é a identificação das fontes relevantes de incerteza e a atribuição de um valor a cada contribuição significativa. É necessário manter um registro das fontes individuais de incerteza identificadas, o valor de cada contribuição e a sua origem. Os componentes de incerteza podem ser estimados com base em um modelo matemático. Caso o cálculo válido de incerteza não seja possível, os componentes de incerteza devem ser identificados e razoavelmente estimados.

A validação inicial de softwares deve verificar o maior número possível de aspectos da operação de um computador. O procedimento de validação usado para um sistema específico e quaisquer dados registrados durante a validação devem ser documentados. Verificações similares devem ser realizadas, se o uso do computador for alterado, ou após a manutenção, ou revisão do software. No caso da validação de um software de processamento de resultados de ensaios, deve-se realizar um ensaio, me-

didada ou verificação para comparar com um teste realizado através de outro dispositivo de medição. Programas de computador executando cálculos podem ser validados por comparação com resultados gerados manualmente e registrados em papel.

6. Realização de treinamento dos colaboradores – Nessa etapa, deve ser realizado o treinamento formal do procedimento de ensaio com os colaboradores envolvidos e realizar o registro do treinamento conforme o procedimento interno correspondente.

7. Avaliação do controle de qualidade do laboratório - O intervalo entre as verificações de controle de qualidade para monitorar o desempenho dos ensaios será influenciado pelo número dos ensaios ou estudos reais, de acordo com a atividade do laboratório. Alguns aspectos a serem considerados nessa etapa são: a) capacitação adequada da equipe de analistas nas técnicas utilizadas no laboratório; b) manutenção e calibração de equipamentos; c) cuidados com o material utilizado; d) realização adequada do procedimento analítico (utilização de brancos de amostra e amostras fortificadas, réplicas, amostras cegas e materiais de referência, estudo de interferências e efeitos de matriz, ensaios de recuperação), e e) acompanhamento da qualidade das análises por um controle de qualidade e testes intra e interlaboratoriais.

As várias etapas do processo analítico devem ficar sob controle do analista a fim de evitar fontes de erro. O controle das características dos ensaios e das variáveis envolvidas é feito de forma contínua e prevê fundamentos para a qualidade e melhoria do processo. Uma forma de esquematizar os dados e obter uma série histórica da qualidade ambiental laboratorial é a utilização de uma carta de controle que permita perceber quando os procedimentos efetuados não foram eficientes. No caso dos ensaios biológicos, também deve ser realizado um programa de monitoração de contaminação dos equipamentos e materiais utilizados nos ensaios cada vez que houver algum ajuste no método de descontaminação ou problemas com o equipamento utilizado.

O intervalo entre as verificações de controle de qualidade para monitorar o desempenho dos ensaios será influenciado pelo número dos ensaios reais, de acordo com a atividade do laboratório. Caso ocorra algum problema na condução das atividades, esta deverá ser refeita. A análise crítica das não-conformidades encontradas pode detectar tendências de erro de acordo com a quantificação causal e evitar a reincidência de problemas. O

objetivo do plano de inspeção é estabelecer um roteiro ou método para as medições. Estas medições podem ser realizadas por amostragem, contanto que seja escolhido o tamanho apropriado da amostra. A amostra deve ser independente, randômica e homogênea, para representar apropriadamente as características da população.

3.2. Definição de um plano de validação de métodos químicos

A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico. A boa prática na validação do método é descrita no Guia EURACHEM (1998). Já que não existe um acordo unânime sobre a interpretação de alguns dos termos acima, nem sobre as convenções usadas na sua determinação, ao mencionar dados de validação, é recomendável mencionar quaisquer convenções adotadas.

As principais características de desempenho incluem: seletividade e especificidade (descrição do mensurando); faixa de medição; calibração e rastreabilidade; tendência - em alguns campos da medição química, o termo recuperação é usado para descrever a tendência total; em outros campos, recuperação é usada em relação a determinados elementos de tendência; linearidade; limite de detecção/ limite de quantificação; robustez e precisão.

Métodos internamente desenvolvidos devem ser adequadamente validados, documentados e autorizados antes de uso. Quando eles estiverem disponíveis, materiais de referência com matrizes combinadas devem ser usados para determinar qualquer tendência, ou quando isto não for possível, os resultados devem ser comparados com outra(s) técnica(s), de preferência baseada(s) em diferentes princípios de medição. A medição da recuperação de analito contaminado adicionado, medição dos brancos e o estudo de interferências e efeitos matriciais podem ser também usados para verificação da tendência ou recuperação. A estimativa da incerteza deve fazer parte deste processo de validação e, além de cobrir os fatores acima, deve abordar questões, tais como a homogeneidade e estabilidade das amostras.

Os planos de validação de cada ensaio químico serão estabelecidos pela equipe envolvida no mesmo. A documentação dos métodos deve incluir dados de validação, limitações de aplicabilidade, procedimentos para controle da qualidade, calibração e controle de documentos.

As características de desempenho da validação citadas acima são inter-relacionadas, muitas delas contribuindo para a incerteza total de medição, e os dados gerados podem ser usados para avaliar a incerteza de medição durante a validação. A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores, dentro da qual o valor real deva se situar, com um nível de confiança especificado. Para que as medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a qualidade do resultado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Na obtenção ou estimativa da incerteza relativa a um método e analito específicos, é essencial assegurar que a estimativa considere explicitamente todas as fontes possíveis de incerteza, e avalie componentes significativos. A principal tarefa na atribuição de um valor para a incerteza de uma medição é a identificação das fontes relevantes de incerteza e a atribuição de um valor a cada contribuição significativa. As contribuições distintas precisam ser então combinadas, a fim de fornecer um valor global.

Tipicamente, as contribuições de incerteza para resultados analíticos podem incidir em quatro grupos principais (ANVISA, 2004):

- i) Contribuições a partir da variabilidade aleatória de curta duração, tipicamente estimada a partir dos experimentos de repetitividade.
- ii) Contribuições tais como efeitos do operador, incerteza de calibração, erros de gradação de escala, efeitos de equipamento e laboratório, estimativas a partir dos experimentos de reprodutibilidade entre os laboratórios, intercomparações internas, resultados dos ensaios de proficiência ou por julgamento profissional.
- iii) Contribuições fora do escopo dos experimentos entre laboratórios, tais como incerteza dos materiais de referência.
- iv) Outras fontes de incerteza, tais como variabilidade da amostragem (falta de homogeneidade), efeitos de matriz e incerteza sobre hipóteses subjacentes (tais como hipóteses sobre integridade da derivação).

Um registro precisa ser mantido das fontes individuais de incerteza identificadas, o valor de cada contribuição e a sua origem. Os componentes

de incerteza podem ser estimados com base em um modelo matemático. Tendo em vista o grande número de cálculos gerados, cálculos estes relativamente demorados e complexos, passou-se a perceber a inviabilidade de um sistema de gerenciamento que não fosse informatizado, devido ao grande tempo dispensado em todo este processo de geração de resultados (NASCI-MENTO; SEVERO, 2003).

3.3. Definição de um plano de validação de métodos biológicos

A harmonização da validação dos protocolos é desejável para a validação dos procedimentos analíticos a serem credenciados através de normas e legislação. Os métodos para ensaios biológicos não são tão bem definidos quanto para os compostos químicos. Contudo, devido à variedade de métodos microbiológicos e biológicos, é aceito que a validação reflita as reais condições de teste. Assim, os planos de validação de cada ensaio biológico serão estabelecidos pela equipe envolvida no mesmo caso a caso.

Os protocolos para validação de ensaios biológicos podem ser planejados em duas vertentes distintas. Na primeira, faz-se uma comparação entre dois métodos e a comparação entre eles será usada para a obtenção de parâmetros estatísticos de concordância entre os métodos. Na segunda, trata-se de uma avaliação de um método próprio ou do desenvolvimento de um novo método.

Em análises microbiológicas, o processo de quantificação de colônias é complexo e inclui vários passos, sendo os mais importantes: amostragem da porção de teste, preparação da suspensão inicial e das diluições decimais consecutivas, isolamento, incubação e contagem das colônias. A maioria desses componentes pode ser medida e avaliada. Outros componentes como, por exemplo, estabilidade da amostra deve ter a sua importância considerada para a variabilidade de resultados. Tradicionalmente, a estimativa da incerteza da quantidade de colônias viáveis é feita através da distribuição de Poisson e é geralmente pequena se é considerada somente a repetitividade da contagem feita por um analista.

Na estimativa da incerteza total, deve ser considerada a incerteza de cada um dos componentes que contribuem para a mesma sendo que a maioria das incertezas em microbiologia pode ser considerada independente. Desta forma, quando o resultado do teste é fruto de componentes com incertezas

estimadas ou conhecidas, como, por exemplo, do volume do inóculo e do método de leitura do resultado, obtém-se a incerteza combinada (NIEMELA, 2003).

A importância dos parâmetros relacionados à incubação parece ser considerada como desprezível já que não está incluída entre os fatores de incerteza comumente avaliados em métodos de cultivo. Quanto ao tempo de incubação, a experiência sugere que desvios de horas do tempo especificado não afetam os resultados significativamente (CORRY et al., 2007). Contudo, a importância deste parâmetro para a incerteza do método pode ser avaliada durante as repetições efetuadas para a validação do mesmo.

Caso o cálculo válido de incerteza não seja possível, os componentes de incerteza devem ser identificados e razoavelmente estimados. Assim, por exemplo, em uma análise microbiológica qualitativa, a precisão não pode ser expressa como um desvio padrão ou um desvio padrão relativo, mas pode ser expressa como taxas, verdadeiro e falso positivo (e negativo); caso seja seguida de identificada por métodos moleculares (sequenciamento da subunidade 16S rDNA) com similaridade de 98% e confirmado pelo método de identificação por cromatografia gasosa dos ácidos graxos da membrana celular. Esta deverá ser relacionada entre os componentes da incerteza (CORRY et al., 2007).

Em testes realizados com organismos vivos, o comportamento dos organismos teste depende de condições ambientais no laboratório. Desta forma, deve-se avaliar as condições de instalações como temperatura e luminosidade que podem afetar os resultados e contribuir para a incerteza (MOREL et al., 2006). Também podem ser usados controles positivos e/ou negativos em condições padronizadas, além do controle histórico dos resultados obtidos anteriormente.

O valor do controle obtido com os dados históricos depende da qualidade deste último. Eles são úteis quando se trata de experimentos semelhantes padronizados e realizados no mesmo laboratório (FESTING; ALTMAN, 2002). Esse controle pode ser feito através de gráficos que apresentem uma linha central esboçada como a média geral obtida em um determinado ensaio. Assim, devido a várias possibilidades de interpretações, é melhor fornecer instruções específicas para a análise dos controles, de como interpretar os resultados e o que fazer baseado nestes resultados. Para tanto, é necessário definir regras de aceitação e rejeição dos dados com o estabelecimento de uma regra estabelecendo claramente estes limites.

3.4. Definição de um plano de validação de métodos computacionais (softwares)

A validação inicial deve verificar o maior número possível de aspectos da operação de um computador. O procedimento de validação usado para um sistema específico e quaisquer dados registrados durante a validação devem ser documentados. Verificações similares devem ser realizadas, se o uso do computador for alterado, ou após a manutenção, ou revisão do software. Programas de computador executando cálculos podem ser validados por comparação com resultados gerados manualmente. Para a verificação da adequada operação de planilhas de cálculos, deverá ser executada uma comparação direta dos mesmos cálculos realizados pela planilha com os cálculos feitos manualmente, registrados em papel.

Dentre os métodos gerenciais de validação de software, há a norma ISO 9000-3 (Normas de Gestão da Qualidade e Garantia da Qualidade - Parte 3) que define diretrizes para facilitar a aplicação da norma ISO 9001 a organizações que desenvolvem, fornecem e mantêm software. Esta norma destina-se a fornecer orientação quando um contrato entre duas partes exigir a demonstração da capacidade do fornecedor em desenvolver, fornecer e manter produtos de software. Contudo, a ISO 9000-3 trata de quais processos a organização deve ter e manter, mas não orienta quanto aos passos que devem ser seguidos para chegar a desenvolver estes processos - nem de como aperfeiçoá-los. A melhoria contínua do processo de software é tratada, por exemplo, pelo modelo CMM (Capability Maturity Model).

O modelo CMM reuniu as melhores práticas de gerenciamento e desenvolvimento de software, dando origem a uma metodologia utilizada para a definição e avaliação das práticas-chaves do desenvolvimento de projetos de software. O modelo CMM teve como principal fundador o Departamento de Defesa dos Estados Unidos. O conceito central do CMM é o desenvolvimento dos processos que envolvem projetos de software, organizados por áreas-chaves, que permitem a empresa atingir um grau de maturidade (http://www.cin.ufpe.br/~mjmcj/cmm/visao_geral.html).

Quando um computador for usado para coletar e processar dados associados a ensaios químicos ou biológicos para validação daquela função, é geralmente suficiente assumir a operação correta, se o computador produzir respostas previstas, quando a entrada for com parâmetros conhecidos, pois muitas vezes o software não é acessível. Em ensaios, verificações adequadas sobre as funções de coleta e mani-

pulação de dados podem ser feitas, usando-se um Material de Referência.

Caso as planilhas estejam consideradas adequadas, estas serão protegidas por senhas de acesso, que impedem alterações indevidas. Os planos de validação de cada software serão estabelecidos pela equipe envolvida no mesmo. A transmissão eletrônica de dados deve ser verificada, para garantir que nenhuma degradação ocorra durante a transmissão (ANVISA, 2004). Isto pode ser realizado no computador, pelo uso de arquivos de verificação, mas, sempre que prático, a transmissão deve ser assegurada por uma cópia impressa dos dados. Deve ser observado que algumas falhas somente irão ocorrer, quando um grupo específico de parâmetros for inserido. Assim, deve-se verificar a presença de mensagens de erro.

Por fim, os sistemas automatizados controlados por computador deverão ser verificados quanto a operação satisfatória (incluindo desempenho em circunstâncias extremas) e estabelecimento da confiabilidade do sistema, por um plano de verificação e manutenção do sistema. Uma consideração importante é que o computador, interfaces e fiação de ligação tenham suficiente capacidade para as tarefas requeridas. Se qualquer parte do sistema for sobrecarregada, poderá haver perda de dados.

4. Considerações Finais

Os conceitos de validação de métodos continuam a evoluir e estão sempre sob consideração. A qualidade dos resultados gerada está diretamente relacionada com a qualidade do processo de validação de métodos. Nesse sentido, é sempre pertinente ressaltar que a validação de métodos deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e execução, uma vez que a estratégia de validação é específica para cada ensaio.

A proposta deste trabalho foi fornecer uma visão dos conceitos e procedimentos de validação utilizados no desenvolvimento de métodos químicos, biológicos e computacionais. Este artigo mostrou uma proposta de metodologia para desenvolvimento e validação de métodos de ensaio, composta de diferentes etapas que cobrem os requisitos da NBR ISO/IEC 17025:2005. Para tanto, várias discussões foram inseridas no decorrer do texto, embora não seja objetivo deste trabalho esgotar a discussão do tema. Antes, é esperado que as informações obtidas a partir desse trabalho evoquem o detalhamento de novos métodos de validação de ensaios em áreas carentes como os ensaios biológicos.

Referências

ANVISA. Guia para qualidade em química analítica: uma assistência a acreditação. Brasília, 2004. 76 p. (Série Acreditação, 1).

CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V.; FIGUEIRA, A. Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) na Genômica de Plantas, n. 33, 2004. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio33/analise.asp>> .

CORRY, J.E.; JARVIS, B.; PASSMORE, S.; HEDGES, A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 230-253, 2007.

ELLISON, S.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. **EURACHEM/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement.** 2. ed. London, 2000. (EURACHEM/CITAC, QUAM:P1).

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics.** London, 1998 Disponível em: <www.eurachem.org> .

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W.H. AOAC International Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of the AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1187-200, 2002.

FESTING, M.; ALTMAN, D. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. **ILAR Journal**, v. 43, n. 4, p. 244-258, 2002.

FREITAS, E.; LEMOS, A.; MARIN, V. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

INMETRO. **DOQ-DQUAL - Orientações para adoção da NBR ISO/IEC 17025** pelos laboratórios e credenciados e postulantes ao credenciamento. Rev. 06, abr/2001. Rio de Janeiro, 2001.

INMETRO. DOQ-CGECRE - Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rev. 08, mar/2003. Rio de Janeiro, 2003.

INMETRO. **NIE-DIMCI-016** - Controle de registros técnicos e da qualidade, Rev. 00, dez/2003. Rio de Janeiro, 2003a.

JARVIS, B.; HEDGES, A.J.; CORRY, J.E. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) *of bacterial colony counts*. *International Journal of Food Microbiology*, v. **116**, n. **1**, p. **44-51**, 2007.

MOREL, P.; ARRUDA, T.; BOHRER-MOREL, M.B. Calculation of uncertainties in influence quantities in biological essays. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 97-99, 2006.

NASCIMENTO, G.; SEVERO, F. Automação de cálculos de incertezas em análises ambientais. In: CONGRESSO EM METROLOGIA, 2003, Recife. **Anais: Metrologia para a vida**. Recife, 2003.

NIEMELÄ, S. Measurement uncertainty of microbiological viable counts. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 8, p. 559-563, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; MELO, L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

SHIN, J.; NAM, J. Validation of a computer software program for statistical analysis of accelerated stability studies on biological standards. **Biologicals**, v. 35, p.27-30, 2007.

STEMPNIAK, C. R.; LANDGRAF, W. R.. Automação de laboratórios de metrologia e ensaios. In: CONGRESSO CATARINENSE DE AUTOMAÇÃO SISTEMAS E INSTRUMENTAÇÃO, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003. p.36-44.