

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

CAROLINA SHENG WHEI MIAW

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUALITATIVO PARA
DETECÇÃO DE SOJA *ROUNDUP READY*® EM
GRÃOS DE SOJA POR *NESTED PCR* (REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE)**

**Belo Horizonte
2013**

CAROLINA SHENG WHEI MIAW

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUALITATIVO PARA
DETECÇÃO DE SOJA *ROUNDUP READY*® EM
GRÃOS DE SOJA POR *NESTED PCR* (REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Co-orientadora: Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira

Área de concentração: Ciência de Alimentos

**Belo Horizonte
2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

CAROLINA SHENG WHEI MIAW

**“VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DE SOJA
ROUNDUP READY® EM GRÃOS DE SOJA POR NESTED PCR
(REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)”**

APROVADA EM 28 DE FEVEREIRO DE 2013

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. EVANGUEDES KALAPOTHAKIS


Dr. LUIZ ARTUR COSTA DO VALLE


Dr. GECERNIR COLEN


Dra. SCHEILLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA FERREIRA
Orientadora e Presidente da Comissão

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

Ao Laboratório de Biologia Molecular (LBM), da Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA), do Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (IOM), da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) por disponibilizar os matérias e equipamentos necessários à realização dos experimentos práticos para a elaboração da presente dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Biblioteca da FAFAR, Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Prof^a Scheilla Vitorino Carvalho de Souza pelos ensinamentos, dedicação, paciência, confiança e amizade durante este aprendizado, constante incentivo e apoio ao trilhar este novo caminho.

À Dra. Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira, co-orientadora deste trabalho, pelas valiosas contribuições e ensinamentos que colaboraram para a qualidade deste trabalho.

À amiga e colaboradora Gláucia Celeste de Souza Amâncio pela dedicação, paciência, comprometimento e companheirismo sem a qual este trabalho não seria possível.

Aos demais integrantes do LBM pela cooperação e momentos compartilhados.

Ao Prof. Evanguedes Kalapothakis pelo apoio na aquisição de consumíveis que viabilizaram a execução do presente projeto.

À amiga e colaboradora Carina de Souza Gondim pelo aprendizado, paciência e comprometimento nos estudos com as temíveis planilhas.

Ao Prof. Roberto Gonçalves Junqueira pelos ensinamentos e valiosa ajuda nos modelos de regressão.

Aos membros da banca examinadora Prof. Evanguedes Kalapothakis, Dr. Luiz Artur Costa do Valle e Dr. Gecernir Cólen pelas considerações e sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus pais e irmãs pelo amor e carinho incondicionais, apoio e dedicação. Aos demais familiares pela força e atenção.

Aos meus amigos pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Alexandre, meu eterno companheiro, por me impulsionar a ser uma pessoa e profissional cada vez melhor.

À Deus pela vida e oportunidades oferecidas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	14
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. SOJA.....	21
3.1.1 HISTÓRIA DA SOJA	21
3.1.2 PRODUTOS DA SOJA.....	22
3.1.3 ASPECTOS NUTRICIONAIS	23
3.1.4 ASPECTOS ECONÔMICOS.....	26
3.1.5 SOJA TRANSGÊNICA	28
3.1.7 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE OGM EM ALIMENTOS	40
3.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS.....	58
3.2.1 PRINCIPAIS DOCUMENTOS ORIENTATIVOS.....	58
3.2.2 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO.....	64
3.2.2.1 Taxas de falsos resultados, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade	66
3.2.2.2 Limite de detecção e região de perda de confiabilidade	69
3.2.2.3 Robustez	74
3.2.2.4 Rastreabilidade metrológica	74
3.2.2.5 Acordância e concordância	75

3.2.2.6 Representatividade.....	76
3.2.3 LEVANTAMENTO DE ESTUDOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE SOJA GM EM ALIMENTOS	77
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	84
4.1. EQUIPAMENTOS	84
4.2. MATERIAIS.....	85
4.3. REAGENTES, PADRÕES E OUTROS.....	86
4.4. SOLUÇÕES	88
4.5. AMOSTRAS	90
4.5.1 VALIDAÇÃO.....	90
4.6. MÉTODOS DE ENSAIO.....	91
4.6.1	92
EXTRAÇÃO DE DNA	92
4.6.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	93
4.6.3 ANÁLISE QUALITATIVA POR <i>NESTED</i> PCR	95
4.6.4 PESQUISA DO GENE ENDÓGENO (LECTINA DE SOJA) EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA SOJA RR®	98
4.7. VALIDAÇÃO.....	101
4.7.1 TESTES PRELIMINARES.....	101
4.7.2 AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE FALSOS RESULTADOS, DE SENSIBILIDADE, DE SELETIVIDADE, DE CONFIABILIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO, REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE, ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA.....	102
4.7.3 AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA SELETIVIDADE	104
4.8. COMPARAÇÃO DAS FORMAS DE LEITURA DOS RESULTADOS.....	110
4.9. APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	110
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
5.1. VALIDAÇÃO.....	113
5.1.1 TESTES PRELIMINARES.....	113
5.1.2 TAXAS, REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO, ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA.....	114

5.1.2.1	TAXAS.....	114
5.1.2.2	REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO....	118
5.1.2.3	ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA.....	126
5.1.2.4	RASTREABILIDADE METROLÓGICA.....	130
5.1.3	AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA SELETIVIDADE	130
5.1.4	AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ	133
5.2.	COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO.....	134
5.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	138
6	CONCLUSÕES.....	140
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
8	CONSIDERAÇÕES.....	155
9	APENDICE.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional de produtos da soja conforme tabelas nacionais e internacionais	25
Tabela 2. Eventos liberados no Brasil para soja	35
Tabela 3. Parâmetros de desempenho propostos na literatura para validação de métodos qualitativos.....	61
Tabela 4. Parâmetros de desempenho estudados na validação de método qualitativos e respectivos parâmetros correspondentes na validação quantitativa. ..	65
Tabela 5. Tabela de contingência 2 x 2 utilizada para cálculo das taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade e de confiabilidade.....	68
Tabela 6. Tipos de funções sigmóides utilizadas na regressão logística não linear para construção da curva de desempenho e estimativa da região de perda de confiabilidade e do limite de detecção.....	73
Tabela 7. Estudos de validação de métodos qualitativos para detecção de soja <i>Roundup Ready</i> [®] em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase.	79
Tabela 8. Reagentes utilizados na composição do mix e respectivas concentrações	95
Tabela 9. Iniciadores utilizados na reação da <i>Nested PCR</i>	97
Tabela 10. Iniciadores utilizados para a pesquisa do gene da lectina.....	99
Tabela 11. Reagentes utilizados na composição do mix e respectivas concentrações	99
Tabela 12. Níveis e concentrações das amostras formuladas e respectivas massas do material de referência certificado de soja RR [®] e de soja 100 % convencional ...	103
Tabela 14. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração de soja <i>Roundup Ready</i> [®] , nos testes preliminares	113
Tabela 15. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração de soja <i>Roundup Ready</i> [®]	115
Tabela 16. Taxas de falso-positivos, de falso-negativos e de confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de soja <i>Roundup Ready</i> [®] , em nível com 100 % de confiabilidade, na presença de milho Bt11 e GA21	132

Tabela 17. Avaliação da robustez frente aos fatores concentração de DNA (ng/μL) e marca da Taq DNA polimerase para soja *Roundup Ready*[®] – quantificação por gel de agarose e fluorimetria..... 134

Tabela A.1 Resultados para detecção de soja RR[®], quantificação por eletroforese em gel de agarose e fluorimetria, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância..... 156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quatro principais grupos de produtos da soja e exemplos de respectivos representantes.	23
Figura 2. Etapas da produção de um organismo geneticamente modificado resistente às larvas de insetos.....	30
Figura 3. Representação esquemática da construção genética presente na soja <i>Roundup Ready</i> [®]	32
Figura 4. Perfil da área plantada no Brasil, em milhões de hectares, com soja convencional e geneticamente modificada nas safras 2000/2001 a 2011/2012.....	33
Figura 5. Símbolo definido na Portaria nº 2.658 de 22 de dezembro de 2003 que deve ser apresentado no rótulo de alimentos que contenham organismos geneticamente modificados em sua composição (BRASIL, 2003 d).....	39
Figura 6. Etapas de detecção, identificação e quantificação de organismos geneticamente modificados, considerando o limite de 1 % estabelecido na legislação brasileira.....	41
Figura 7. Representação esquemática da região de amplificação da soja <i>Roundup Ready</i> [®] pela <i>Nested PCR</i>	54
Figura 8. Representação esquemática da região de perda de confiabilidade de métodos qualitativos.....	70
Figura 9. Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade e limites relacionados.	72
Figura 10. Frequência dos parâmetros de desempenho estudados nas validações de métodos qualitativos avaliados para detecção de soja <i>Roundup Ready</i> [®] em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase.....	82
Figura 11. Representação esquemática do delineamento experimental dos testes preliminares.....	102
Figura 12. Representação esquemática do delineamento experimental proposto para avaliação das taxas, limite de detecção, região de perda de confiabilidade, acordância e concordância.....	104
Figura 13. Representações esquemáticas das construções genéticas presentes nos eventos de milho geneticamente modificados Bt11, MON810, GA21, NK603, TC1507 e Bt176.....	105

Figura 14. Representação esquemática do delineamento experimental proposto para avaliação complementar da seletividade (na presença de interferentes).....	107
Figura 15. Representação esquemática de delineamento experimental fatorial 2x3 para avaliação da robustez, em um nível de concentração com 100% de confiabilidade.	109
Figura 16. Resultado da <i>Nested</i> PCR para detecção do evento <i>Roundup Ready</i> [®] nas amostras cegas do processo de validação. Canaleta 1: padrão 123 pb (Invitrogen); canaleta 2 e 3: nível 0; canaleta 4 e 5: nível 1 (0,001 %); canaleta 6 e 7: nível 2 (0,005 %); canaleta 8 e 9: nível 3 (0,010 %); canaleta 10 e 11: nível 4 (0,015 %); canaleta 12 e 13: nível 5 (0,020 %); canaleta 14 e 15: nível 6 (0,025 %); canaleta 16 e 17: nível 7 (0,030 %); canaleta 18 e 19: nível 8 (0,035 %); canaleta 20 e 21: nível 9 (1,000 %); canaleta 22: controle positivo; canaleta 23: controle negativo da extração; canaleta 24: controle negativo da reação.....	114
Figura 17. Gráficos exploratórios dos resíduos (e _i) dos ajustes polinomiais obtidos pelas funções de Logito (a), Probit (b) e Gompertz (c) para soja RR [®] na quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose, incluindo os respectivos coeficientes de determinação (R ²) e <i>outliers</i> diagnosticados (■).	120
Figura 18. Gráficos exploratórios dos resíduos (e _i) dos ajustes polinomiais obtidos pelas funções de Logito (a), Probit (b) e Gompertz (c) para soja RR [®] na quantificação de DNA por fluorimetria, incluindo os respectivos coeficientes de determinação (R ²) e <i>outliers</i> diagnosticados (■).	121
Figura 19. Resultados experimentais (●) e curvas de desempenho (—), com respectivas equações obtidos por regressão não linear de Gompertz nas quantificações de DNA por eletroforese em gel de agarose (a) e fluorimetria (b). ...	123
Figura 20. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de soja RR [®] , com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) – quantificação por eletroforese em gel de agarose (a) e fluorimetria (b).	128
Figura 21. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de soja RR [®] , com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - quantificação por eletroforese em gel de agarose (a) e fluorimetria (b).	129
Figura 22. Detecção de milho por <i>Nested</i> PCR. Canaleta 1: padrão 123 pb (Invitrogen); canaleta 2: milho Bt 11(5 %); canaleta 3: milho MON 810 (5 %); canaleta 4: milho GA21 (5 %); canaleta 5: milho NK603 (5 %); canaleta 6: milho TC1507 (10 %); canaleta 7: milho Bt176 (2 %); canaleta 8: controle positivo (soja RR [®] 5 %); e canaleta 9: controle negativo da reação.	131
Figura 23. Resultados experimentais das formas de quantificação por eletroforese em gel de agarose (x) e por fluorimetria (■) para soja <i>Roundup Ready</i> [®]	135

Figura 24. Histograma das concentrações de DNA das amostras cegas do processo de validação determinadas por eletroforese em gel de agarose (a) e por fluorimetria (b)..... 137

Figura 25. Resultado típico da eletroforese em gel de agarose para determinação visual da concentração de DNA das amostras cegas do processo de validação. Padrão DNA íntegro de bacteriófago lambda (Pd1, Pd2 e Pd3 correspondentes às concentrações de 50, 100 e 200 ng/μL); canaleta 1: 100 ng/μL; canaleta 2: 200 ng/μL; canaleta 3: 150 ng/μL; canaleta 4: 100 ng/μL; canaletas 5-8: 200 ng/μL e canaleta 9: controle negativo da extração..... 138

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACO	Acordância
Ag	Antígeno
AHA	<i>American Heart Association</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
bla	Gene da enzima β -lactamase
CaMV 35S	Promotor do gene do vírus do mosaico da couve-flor
CON	Concordância
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CP4 EPSPS	Gene que codifica a enzima 5-enol-piruvato-chiquimato-3-fosfato sintase presente em bactérias do solo <i>Agrobacterium sp.</i> cepa CP4
CTAB	Cetiltrimetilamônio brometo
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CTP	Peptídeo de trânsito para o cloroplasto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
EC	<i>European Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EIA/RIMA	Estudos de Impacto Ambiental/Relatório de Impacto no Meio Ambiente
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EPSPS	Enzima 5-enol-piruvato-chiquimato-3-fosfato sintase
EURL-GMFF	<i>European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIPE	Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas
FP	Quantidade de resultados falso-positivos
FN	Quantidade de resultados falso-negativos

GM	Geneticamente modificados
GMDD	GMO Detection Method Database
GMO	<i>Genetically Modified Organism</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFL	Imunoensaio de Fluxo Lateral
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
ISAAA	Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JRC	<i>Joint Research Center</i>
LD	Limite de detecção
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MP	Medida Provisória
MRC	Material de Referência Certificado
nptII	Neomicina Fosfotransferase II
OGM	Organismos geneticamente modificados
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RPC	Região de perda de confiabilidade
RR®	<i>Roundup Ready®</i>
SCST	<i>Society of Commercial Seed Technologists</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCF	Taxa de confiabilidade
T-DNA	DNA transferível
TFN	Taxa de falso-negativo
TFP	Taxa de falso-positivo
Ti	Indutor de tumor

TN	Quantidade de resultados negativos corretos
T-NOS	Terminador do gene nopalina sintetase do <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TP	Quantidade de resultados positivos corretos
TSB	Taxa de sensibilidade
TST	Taxa de seletividade
UE	União Europeia
UI	Unidade internacional
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

RESUMO

Diante da expansão da soja geneticamente modificada e tendo como princípio o direito básico do consumidor de acesso à informação sobre as características dos produtos ofertados, a legislação brasileira e de outros países estabelece um limite de organismos geneticamente modificados para indicação de transgenia na rotulagem de alimentos. Provas laboratoriais qualitativas, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recomendadas - como a *Nested PCR*. Contudo, a validação dos métodos qualitativos, fundamental para a comprovação da confiabilidade de resultados analíticos, representa ainda um importante ponto crítico na gestão da qualidade de laboratórios de análises de alimentos. O objetivo do presente projeto foi a validação intralaboratorial de um método qualitativo para detecção de soja *Roundup Ready*[®] (RR[®]) em grãos de soja por *Nested PCR*. Amostras de soja contendo de 0,001 a 1 % de RR[®], mais o branco, foram analisadas. Técnicas de quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA), eletroforese em gel de agarose e fluorimetria, foram comparadas. A taxa de falso-positivos foi nula, com 100,0 % de taxas de seletividade e confiabilidade, para as duas formas de quantificação, demonstrando seletividade do método. Taxas de sensibilidade e confiabilidade variaram entre 23,3 e 100,0 % (gel de agarose) e entre 30,0 e 100,0 % (fluorimetria). Foram obtidos 100,0 % de resultados positivos para todos os níveis acima de 0,030 %, indicando sensibilidade. Os limites de detecção estimados para as técnicas de eletroforese em gel de agarose e fluorimetria foram de 0,007 e 0,005 %, respectivamente. O método foi seletivo em relação aos eventos de milho Bt11 e GA21 e robusto para diferentes concentrações de DNA alvo e marcas de Taq DNA polimerase. A análise de amostras comerciais coletadas pela Vigilância Sanitária do Estado de Minas Gerais permitiu demonstrar a aplicabilidade do método. O método foi adequado para o propósito de uso, considerando-se os limites máximos preconizados para organismos geneticamente modificados na legislação nacional e internacional.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, ensaio qualitativo, soja *Roundup Ready*[®], grãos de soja, organismos geneticamente modificados, *Nested PCR*.

ABSTRACT

Considering the expansion of genetically modified soybean and the basic principle of consumers' right to access information about the products, the Brazilian and other countries legislation establishes a limit of genetically modified organisms to label transgenic food. Qualitative tests based on polymerase chain reaction (PCR) have been recommended – such as Nested PCR. However, validation of qualitative methods, important to confirm the reliability of analytical results, is still a critical point in the quality management of food analysis laboratories. The objective of this project was to validate an in-house method for qualitative detection of Roundup Ready (RR[®]) soy in soybeans by Nested PCR. Samples of soy containing from 0.001 to 1 % of RR[®] and blank samples were analyzed. Techniques for quantification of the deoxyribonucleic acid (DNA), agarose gel electrophoresis and fluorimetry, were compared. The false-positive rate was zero, with selectivity and reliability rates of 100.0% for both techniques, demonstrating selectivity of the method. Sensitivity and reliability rates ranged between 23.3 and 100.0% (agarose gel) and between 30.0 and 100.0% (fluorimetry). 100.0% positive results were obtained for all levels above 0.030%, indicating sensitivity. Estimated detection limits for the techniques of agarose gel electrophoresis and fluorimetry were 0.007 and 0.005 %, respectively. The method was considered selective for maize events Bt11 and GA21 and robust for different concentrations of target DNA and brands of Taq DNA polymerase. Analysis of commercial samples collected by the Health Surveillance of Minas Gerais State demonstrated the applicability of the method. The method was fitness for purpose, considering the maximum limit recommended for genetically modified organisms in national and international legislation.

Key-words: in-house validation, qualitative assay, Roundup Ready soy, soybeans, genetically modified organisms, Nested PCR.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*, (L.) Merrill) é um dos produtos agrícolas mais importantes nacional e mundialmente. A safra 2012/2013 de soja no mundo está estimada em 260,46 milhões de toneladas, tendo o Brasil se tornado o maior produtor mundial desta oleaginosa nesta safra (CONAB, 2012). No País, a produção é liderada por Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (MAPA 2010).

O principal destino da soja em grão é o setor industrial, visando à produção de farelo de soja, para a alimentação animal (EMBRAPA, 2010). Na alimentação humana, a soja tem recebido destaque pela sua composição nutricional e propriedades funcionais (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 1998; PENHA *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, os avanços nas técnicas de manipulação de sequências genômicas, de transformação de células vegetais com novas construções genéticas, de regeneração de plantas transformadas, assim como no conhecimento em função de genes tiveram como resultado a produção de novas matérias-primas alimentares, com características alteradas pela transgenia (CONTRI, 2006).

A transgenia é uma técnica que pode contribuir de forma significativa para o melhoramento genético de plantas e animais, transformando uma planta convencional em outra que seja mais tolerante a herbicidas ou mais adaptada às condições ambientais, ou ainda, produzir variedades enriquecidas nutricionalmente ou que ajudem os seres humanos no combate a determinadas doenças. Os transgênicos são produtos ou organismos que receberam, artificialmente, um gene desejável de outro organismo, o que não seria possível apenas com o melhoramento genético clássico (NODARI & GUERRA, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Em 1994, os Estados Unidos introduziram nos seus supermercados o primeiro alimento geneticamente modificado (GM), o tomate *Flavr Savr*[®]. Atualmente, vários países (Estados Unidos, Canadá, Japão, Brasil, Argentina, Comunidade Europeia, entre outros) já aprovaram a produção e/ou a

comercialização de alimentos GM. As principais culturas são soja, algodão, canola e milho e os principais objetivos da transformação genética são a melhoria da qualidade, da produtividade e das características da planta e o desenvolvimento de resistência às pragas (CONTRI, 2006; JAMES, 2011). No Brasil, estão aprovados para comercialização, até o momento, 36 produtos agrícolas transgênicos, sendo 18 de milho, 5 de soja, 12 de algodão e 1 de feijão (BRASIL, 2013).

O número de culturas GM vem aumentando expressivamente, assim como o número de países produtores. Dados do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA) indicam que a área global de cultivo de plantas transgênicas no mundo avançou dos 1,7 milhões de hectares registrados em 1996 para cerca de 160 milhões de hectares em 2011 (JAMES, 2011).

Além dos estudos criteriosos sobre a segurança alimentar e ambiental, aos quais os alimentos GM são submetidos, e do processo de regulamentação até a aprovação do evento derivado de biotecnologia, a rotulagem de produtos contendo organismos geneticamente modificados (OGM) é requerida em vários países (CONTRI, 2006).

Segundo CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD (2006), a simples detecção destes organismos não garante a segurança de alimentos transgênicos, contudo, a capacidade de identificação e quantificação desses organismos e seus derivados em grãos, matérias-primas e produtos acabados é de fundamental importância. No Brasil, uma primeira razão para a detecção é o direito à informação adequada sobre produtos e serviços pelo consumidor, assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990); a segunda está pautada na imposição legal, de acordo com Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, de que o consumidor deverá ser informado da natureza transgênica dos alimentos ou ingredientes alimentares que estiverem sendo comercializados e que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima do limite de 1 % do produto (BRASIL, 2003 a); e a terceira razão é a geração de confiança nos alimentos que contêm OGM.

Desta forma, é imperativo que os governos, laboratórios de análise e todo o setor produtor de alimentos estejam interessados em desenvolver, padronizar e validar métodos para uma eficaz detecção e quantificação de OGM em alimentos e

ingredientes alimentares, visando garantir conformidade com requisitos regulamentares (AHMED, 2002; PAN, 2002; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

Métodos baseados na determinação do ácido desoxirribonucleico (DNA), especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recomendados por órgãos internacionais de regulamentação, pesquisa, comércio e certificação para realização de análises de detecção e quantificação de OGM em matérias-primas e alimentos, devido à maior estabilidade destas moléculas quando comparadas às proteínas (CRESPO *et al.*, 2001; PAN, 2002; ABRAHÃO, 2008; JRC, 2011).

Embora exista um guia do *Codex Alimentarius* sobre validação de métodos qualitativos aplicados à detecção de OGM por PCR, neste são tratados somente os estudos da taxa de falso-positivos (TFP), taxa de falso-negativos (TFN), limite de detecção (LD) e robustez (CODEX ALIMENTARIUS, 2010), não sendo abordados outros parâmetros de desempenho pertinentes, como taxas de sensibilidade (TSB), seletividade (TST) e confiabilidade (TCF), região de perda de confiabilidade (RPC), acordância (ACO) e concordância (CON), os quais são de extrema importância para a avaliação da adequação de métodos qualitativos aos seus respectivos propósitos de uso (GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011).

Assim, a importância da soja para a economia brasileira, a posição de destaque deste alimento na nutrição, e a regulamentação, em diversos países, que estabelece a obrigatoriedade de rotulagem de alimentos contendo OGM acima de um determinado limite, associadas à inexistência de trabalhos que contemplem todos os parâmetros necessários a uma adequada validação de métodos qualitativos, justificam o desenvolvimento do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Validar um método qualitativo, baseado na construção específica, para detecção de soja RR[®] em grãos de soja por *Nested PCR*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um método qualitativo para detecção de soja RR[®] em grãos de soja, incluindo etapas de extração do DNA, quantificação do DNA, por eletroforese em gel de agarose e fluorimetria, e detecção do evento por *Nested PCR* (construção específica), incluindo os parâmetros de desempenho: TSB, TST, TFN, TFP, TCF, rastreabilidade, RPC, LD, ACO, CON e robustez.
- Comparar o método em função das técnicas de quantificação do DNA por eletroforese em gel de agarose e por fluorimetria.
- Aplicar o método validado na análise de amostras de grãos de soja coletadas no comércio pela Vigilância Sanitária do estado de Minas Gerais, avaliando a conformidade das informações declaradas nos rótulos com a legislação brasileira.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. SOJA

3.1.1 HISTÓRIA DA SOJA

A mais antiga referência sobre a soja seria atribuída ao lendário imperador chinês Shennong ou Shen-nung, também conhecido como o Imperador Yan ou, ainda, o Imperador dos Cinco Grãos, herói cultural da mitologia chinesa, que se acredita ter vivido há cerca de 5.000 anos atrás. O arroz, o trigo, a cevada, o milho e a soja eram considerados “os cinco grãos sagrados”, por serem essenciais à estabilidade da civilização chinesa (BONATO & BONATO, 1987).

A soja hoje cultivada é muito diferente dos seus ancestrais, que eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do rio Yangtse, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (FEDERIZZI, 2005; EMBRAPA, 2011).

Até aproximadamente 1894, término da guerra entre a China e o Japão, a produção de soja ficou restrita à China. Apesar de ser conhecida e consumida pela civilização oriental por milhares de anos, a soja só foi introduzida no ocidente no final do século XV e início do século XVI, com a chegada dos navios europeus à Ásia, permanecendo como curiosidade nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha. Somente no século XVIII que pesquisadores europeus iniciaram estudos com a soja como fonte de óleo e nutriente animal e, no início do século XX, a soja passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos (REIS *et al.*, 2007; EMBRAPA, 2011). Na segunda década do século XX, os teores de lipídeos e proteínas do grão começaram a despertar o interesse das indústrias mundiais. Entretanto, as tentativas de introdução comercial do cultivo do grão na Rússia, Inglaterra e Alemanha fracassaram, provavelmente, devido às condições climáticas

desfavoráveis, além da ausência de conhecimento sobre a cultura e suas exigências (EMBRAPA, 2011).

A soja foi introduzida no Brasil em 1882, a partir de sementes provenientes dos Estados Unidos. Estas sementes foram produzidas pelo professor da Escola de Agronomia da Bahia, Gustavo Dutra, que realizou testes de adaptação do material genético introduzido. Contudo, não foram obtidos resultados positivos, pois a cultivar não era adaptada às condições de baixas latitudes. Em 1892, novos estudos foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, pelo pesquisador Daffert, o qual obteve os primeiros resultados positivos. Em 1901, o Instituto Agrônomo de Campinas distribuiu as primeiras sementes de soja para os produtores paulistas. A exemplo do que ocorreu nos Estados Unidos, a soja foi inicialmente utilizada no Brasil como cultura forrageira, com exceção de alguns produtores, que utilizavam o grão para alimento dos animais de suas propriedades (COSTA, 1996).

A soja, sem dúvida, foi a grande responsável pela profissionalização e especialização da agricultura, por volta dos anos de 1960, em algumas regiões do Brasil. Ela foi também a principal responsável pela introdução do conceito de agronegócio no país, devido à quantidade de investimentos, empresas e pessoas envolvidas em sua produção e processamento, bem como, pela necessidade da visão empresarial de administração da atividade por parte de todos os envolvidos neste complexo agroindustrial (BRUM, 2002).

3.1.2 PRODUTOS DA SOJA

Os subprodutos da soja são utilizados pela indústria de alimentos na fabricação de produtos de padaria, substitutos do leite, embutidos, ração animal, etc. Apesar do amplo espectro de produtos que podem ser obtidos a partir da soja, o principal destino da soja em grão é o setor industrial, visando à produção de farelo de soja, utilizado, sobretudo, na elaboração de rações para atividades de pecuária (EMBRAPA, 2010).

A partir da soja são obtidos quatro grupos de produtos: produtos não-desengordurados, produtos do óleo bruto, produtos do farelo desengordurado cru e produtos de tradição oriental (CABRAL & MODESTA, 1981), conforme ilustrado na **Figura 1**.

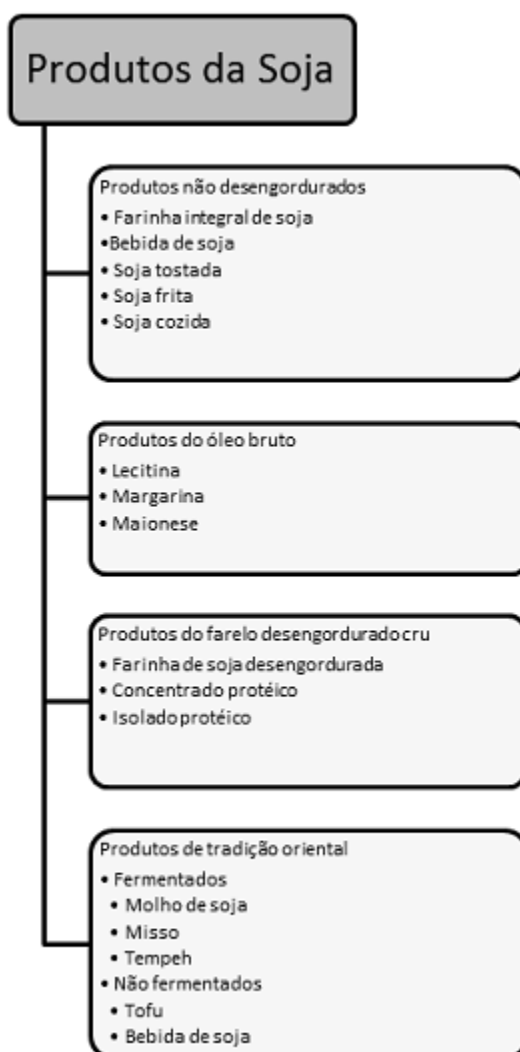


Figura 1. Quatro principais grupos de produtos da soja e exemplos de respectivos representantes.

Adaptado de BERK (1992).

3.1.3 ASPECTOS NUTRICIONAIS

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais desse alimento, tanto devido ao

elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada e ao conteúdo significativo de minerais e fibras, quanto pela quantidade reduzida de gordura saturada e ausência de colesterol (MORAIS & SILVA, 2000; GRIESHOP & FAHEY, 2001; SILVA *et al.*, 2006).

A soja fornece nutrientes ao organismo e benefícios para a saúde. É rica em proteínas, contém isoflavonas, fitatos, fitosteróis, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados. Também constitui boa fonte de minerais como ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre, fósforo, manganês e vitaminas do complexo B (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 1998; PENHA *et al.*, 2007). As isoflavonas constituem uma classe de fitoquímicos bioativos que tem sido estudada para determinar seu papel potencial na prevenção de várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, osteoporose e câncer. A soja e seus produtos processados são importantes fontes de quantidades significativas de isoflavonas na dieta humana (ESTEVES & MONTEIRO, 2001; STEINER *et al.*, 2008).

A composição nutricional de alguns produtos de soja encontra-se apresentada na **Tabela 1**.

A funcionalidade da proteína de soja foi reconhecida em 1994 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão de controle de alimentos dos Estados Unidos, quando foi admitido informar, para finalidade de rotulagem nutricional, que “dietas com baixo conteúdo de gorduras saturadas e colesterol e que incluam o consumo diário de 25 g de proteína de soja podem reduzir os riscos de doenças do coração” (FDA, 2009). A *American Heart Association* (AHA) recomenda o consumo de alimentos com soja para pacientes com elevados níveis de colesterol total e da fração *low density lipoprotein* (LDL) e indica tais produtos como substitutos de alimentos ricos em proteína animal para auxiliar na diminuição da ingestão de gordura saturada (AHA, 2006).

Tabela 1. Composição nutricional de produtos da soja conforme tabelas nacionais e internacionais

Componente por 100 g de alimento	Bebida de soja		Soja tostada	Soja frita	Soja cozida	Óleo de soja		Lecitina	Maionese de soja sem colesterol	Farelo de soja desengordurado cru	Farinha de soja desengor- durada	Concentra- do protéico	Isolado protéico	Queijo de soja		
	TACO (2006)	USDA (2011)	USDA (2011)	USDA (2011)	USDA (2011)	TACO (2006)	USDA (2011)	USDA (2011)	USDA (2011)	BRASIL (1993)	USDA (2011)	USDA (2011)	USDA (2011)	USDA (2011)	TACO (2006)	USDA (2011)
	Referência															
Umidade (%)	91,3	90,98	1,95	67,20	79,45	NA	0	0	34,60	12,5	6,94	7,25	5,80	4,98	86,6	70,90
Proteína (g)	2,4	2,94	35,22	13,10	8,47	NA	0	0	0,10	48	44,95	47,01	63,63	80,69	6,6	12,50
Lipídios (g)	1,6	1,99	25,40	7,1	4,45	100,0	100,0	100	47,70	2,5	2,39	1,22	0,46	3,39	4,0	8,10
Colesterol (mg)	NA	0	0	0	0	NA	0	0	0	NI	0	0	0	0	NA	0
Carboidratos (g)	4,3	3,45	33,55	9,40	6,53	NA	0	0	15,80	NI	40,14	38,37	25,41	7,36	2,1	6,90
Fibra alimentar (g)	0,4	0,4	17,7	0,8	0,8	NA	0	0	0	5,0	NI	17,5	5,5	5,6	0,8	0
Cinzas (g)	0,5	0,64	3,88	3,20	1,1	NI	0	0	1,80	6,0	5,58	6,15	4,7	3,58	0,7	1,60
Cálcio (mg)	17	140	138	82	59	NI	0	0	0	NI	244	241	363	178	81	188
Magnésio (mg)	NI	NI	145	96	60	NI	0	0	0	NI	306	290	140	39	NI	228
Manganês (mg)	NI	NI	2,158	1,133	0,71	NI	0	0	NI	NI	3,8	3,018	4,19	1,493	NI	0,889
Fósforo (mg)	NI	NI	363	216	135	NI	0	0	0	NI	701	674	839	776	NI	222
Ferro (mg)	NI	0,49	3,90	0,40	1,31	NI	0,05	0	0,01	NI	13,7	9,24	10,78	14,50	NI	5,60
Sódio (mg)	NI	50	4	14	10	NI	0	0	353	NI	3	20	900	1005	NI	20
Potássio (mg)	NI	141	1470	567	355	NI	0	0	10	NI	2490	2384	450	81	NI	199
Cobre (mg)	NI	0,123	0,828	0,527	0,33	NI	0	0	0,001	NI	2,0	4,065	0,976	1,599	NI	0,38
Zinco (mg)	NI	0,24	3,14	2,10	1,04	NI	0,01	0	0,11	NI	5,06	2,46	4,40	4,03	NI	1,72
Retinol (Vit. A) (UI)	NI	393	0	0	40	NI	0	0	0	NI	40	40	0	0	NI	42
Tiamina (B1) (mg)	NI	0,062	0,1	0,42	0,205	NI	0	0	0	NI	0,691	0,698	0,316	0,176	NI	0
Riboflavina (B2) (mg)	NI	0,199	0,145	0,19	0,053	NI	0	0	0	NI	0,251	0,253	0,142	0,1	NI	0,14
Piridoxina (B6) (mg)	NI	0,233	0,208	0,168	0,105	NI	0	0	0	NI	0,569	0,574	0,134	0,1	NI	0,07
Niacina (B3) (mg)	NI	3,292	1,41	1,100	1,092	NI	0	0	0	NI	2,587	2,612	0,716	1,438	NI	0,5
Vitamina C (mg)	NI	7,2	2,2	12	8,3	NI	0	0	0	NI	0	0	0	0	NI	0
Vitamina E (mg)	NI	2,52	NI	NI	0,21	NI	8,18	8,18	5,00	NI	0	0,12	0	0	NI	0,60
Ácido graxo saturado (g)	0,2	0,206	3,674	0,985	0,617	15,2	15,65	15,005	7,50	NI	0,268	0,136	0,052	0,422	0,4	1,172
Ácido graxo monoinsaturado (g)	0,3	0,412	5,61	1,609	1,009	23,3	22,783	10,977	10,50	NI	0,409	0,208	0,079	0,645	0,5	1,789
Ácido graxo poliinsaturado (g)	0,6	1,19	14,34	14,339	2,513	60,0	57,74	45,318	27,60	NI	1,045	0,533	0,201	1,648	1,7	4,572

NA: Não Aplicável, NI: Não Informado, TACO: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, UI: Unidade Internacional, USDA: *United States Department of Agriculture*.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) inclui a proteína de soja na lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, podendo constar a seguinte frase de alegação: “o consumo diário de no mínimo 25 g pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado com dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2011).

No entanto, o principal destino da soja ainda é a alimentação animal, visando à produção de carnes e ovos. Apesar do interesse considerável nos produtos de soja como alimento, a proporção de proteína de soja consumida diretamente na alimentação humana ainda é pequena (BERK, 1992; EMBRAPA, 2010).

A soja apresenta algumas características que limitam seu uso na alimentação humana. A mais importante delas é seu sabor típico, denominado “*beany-flavor*”, ou ainda, sabor de feijão cru, que para muitos é considerado desagradável. Esse sabor está diretamente ligado à presença de substâncias, como aldeídos, que são formadas durante o processamento do grão. Esses produtos são derivados da oxidação do óleo, um processo que é iniciado pela ação de enzimas que estão normalmente presentes no grão, denominadas lipoxigenases. Além de alterar o sabor do grão de soja, esses produtos provocam a rancificação do óleo e diminuem a vida de prateleira de alimentos produzidos à base de soja (AXELROD, CHEESBROUGH & LAAKSO, 1981; MORAES *et al.*, 2006). Além disto, na soja crua, assim como na maioria das leguminosas, existem fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, hemaglutininas e saponinas, os quais podem ser destruídos ou inativados total ou parcialmente por tratamento térmico (CABRAL & MODESTA, 1981; SILVA & SILVA, 2000).

3.1.4 ASPECTOS ECONÔMICOS

A soja é uma importante cultura da agricultura mundial. A produção mundial de soja para a safra de 2012/2013 está estimada em 260,46 milhões de toneladas na safra, um aumento de aproximadamente 10,3 % em comparação à safra 2011/2012 (CONAB, 2012).

De acordo com o 4º Levantamento de Grãos, a produção de soja do Brasil, maior produtor mundial, deve atingir 82,7 milhões de toneladas na safra de 2012/2013, com uma área plantada de 27,3 milhões de hectares e produtividade de 3.023 kg/ha (CONAB, 2013). A safra de 2012/2013 americana estava estimada em 87,22 milhões de toneladas mas, devido a problemas climáticos, como a forte seca e altas temperaturas, esta sofreu uma drástica queda, sendo novamente estimada em 73,27 milhões de toneladas, com uma área plantada de 31 milhões de hectares e produtividade de 2.400 kg/ha (CONAB, 2012; FIPE, 2012).

Desta forma, a produção mundial de soja está concentrada em três países, Brasil, Estados Unidos e Argentina, os quais respondem por 71,5 % e 81,5 % da área plantada e da produção mundial da oleaginosa, respectivamente (EMBRAPA, 2011). O Brasil apresenta a maior capacidade de crescimento da atual produção, tanto pelo aumento da produtividade, quanto pelo potencial de expansão da área cultivada (VENCATO *et al.*, 2010).

No Brasil, a produção de soja é liderada pelos estados de Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, que produzem 82,0 % da soja nacional. No entanto, a produção de soja tem evoluído também para novas áreas no Maranhão, Tocantins, Piauí, Bahia e Santa Catarina que respondem por 13,0 % da produção brasileira (MAPA, 2010).

Para safra de 2012/2013 estima-se que o estado do Mato Grosso, maior produtor nacional, produza 20,8 milhões de toneladas, numa área plantada de 6,45 milhões de hectares, com produtividade de 3.223 kg/ha. Enquanto para o Paraná, segundo maior produtor brasileiro de soja, a produção prevista é de 15,5 milhões de toneladas, em uma área de 4,6 milhões de hectares, com produtividade de 3.393 kg/ha (IBGE, 2012).

Com relação às exportações globais em 2013, a previsão é de 94,0 milhões de toneladas, sendo o Brasil o maior exportador mundial. O País deverá exportar 37,6 milhões de toneladas em 2012/2013. A previsão para os Estados Unidos é de 30,2 milhões de toneladas, menor volume desde 2005/2006. Em terceiro lugar vem a Argentina com previsão de exportar 13,5 milhões de toneladas. Os três países juntos são responsáveis por 86 % das exportações mundiais (FIPE, 2012).

As importações mundiais de soja para a safra 2012/13 devem ficar próximas de 91,87 milhões de toneladas, sendo a China o maior importador. Ela deverá importar cerca de 59,5 milhões de toneladas e a União Europeia, segundo maior importador, 10,7 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

O principal destino da soja em grão é o setor industrial, visando à produção de farelo de soja, utilizado, sobretudo, na elaboração de rações para atividades de pecuária. As empresas esmagadoras são o destino de 87,6 % da soja consumida, enquanto o destino para a alimentação humana representa apenas 6,2 %. China, Estados Unidos, Brasil e União Europeia são responsáveis por mais de 80 % do consumo mundial do grão (EMBRAPA, 2010).

As exportações do Brasil relativas ao complexo soja, em 2012, totalizaram US\$ 24,65 bilhões, sendo grãos US\$ 17,19 bilhões (32,52 milhões de toneladas), farelo US\$ 5,55 bilhões (12,5 milhões de toneladas) e óleo US\$ 1,91 bilhões (1,63 milhões de toneladas) (MDIC, 2012).

3.1.5 SOJA TRANSGÊNICA

OGM são organismos que tiveram o seu material genético alterado por qualquer técnica de engenharia genética (NODARI & GUERRA, 2000). Esse processo é capaz de conferir às plantas, por exemplo, novas características, tais como resistência a agrotóxicos, melhor tolerância ao estresse ambiental, além da modificação da sua qualidade nutricional. A transgenia pode contribuir significativamente para o melhoramento genético de vegetais, visando otimizar a produção de alimentos, fármacos, bem como outros produtos industriais (NODARI & GUERRA, 2003).

Os principais objetivos da transformação genética de sementes são: melhorar a qualidade, a produtividade e as características da planta e desenvolver resistência às pragas. Pelo menos 50 % das plantas GM possuem como nova característica tolerância a algum herbicida e aproximadamente 85 % delas possuem ou tolerância a herbicida ou resistência a alguma praga (JAMES, 2011).

Informações sobre a estrutura básica de um OGM são de fundamental relevância para o entendimento dos princípios dos métodos de detecção destes organismos em alimentos. Os principais elementos que compõem a construção gênica característica de um OGM, ou seja, o evento, incluem: o promotor, que regula a leitura do gene (transcrição); o gene de interesse, que determina a característica desejável; e o elemento terminador, responsável pelo término da transcrição. Além destas, outras sequências exógenas de DNA, responsáveis pela regulação e estabilização do gene inserido, podem estar presentes (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

LAJOLO & NUTTI (2003) descrevem as etapas envolvidas no processo de transformação, que compreendem a localização do gene correspondente a uma característica desejada, a obtenção e clonagem ou multiplicação desse gene, a “engenharia” do gene, a transformação da célula do organismo receptor e, finalmente, a seleção da planta e fixação da característica desejada.

A etapa inicial é a identificação e obtenção do gene (fragmento de DNA) de interesse a ser transferido de um organismo (planta ou bactéria) a outro. O gene é isolado do organismo “doador”, duplicado e introduzido em um vetor de clonagem. Essas modificações envolvem a adição de um promotor, do gene de interesse e de uma sequência terminadora. O vetor de clonagem é normalmente um plasmídeo destinado à multiplicação do gene. O plasmídeo contendo o gene de interesse é inserido em uma bactéria, a qual é multiplicada em cultura; multiplicando-se a bactéria, também se multiplica o plasmídeo (LAJOLO & NUTTI, 2003).

O DNA, obtido numa quantidade maior, é isolado e inserido na célula a ser transformada, por processos físicos ou biológicos. Entre os processos físicos, a biobalística é um dos mais empregados. Micropartículas metálicas são recobertas pela molécula de DNA a ser transferida e “atiradas” para dentro do núcleo da célula a ser transformada. Uma pequena fração se incorporará a seu DNA. No processo biológico, utiliza-se o *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria do solo capaz de infectar células de plantas e transferir parte do seu material genético para um tecido vegetal. Esta bactéria contém, além do seu cromossomo, um plasmídeo conhecido como plasmídeo indutor de tumor (Ti), em cujo DNA há uma região – o DNA

transferível (T-DNA), que pode ser transferida para os cromossomos de plantas (**Figura 2**). A estratégia é incluir no T-DNA a construção genética a ser transferida para a planta e usar os mecanismos naturais de transformação, colocando-se ambos em contato - o *Agrobacterium tumefaciens* já com o plasmídeo modificado e a célula vegetal que será transformada e, depois de selecionada, poderá gerar uma nova planta (LAJOLO & NUTTI, 2003).

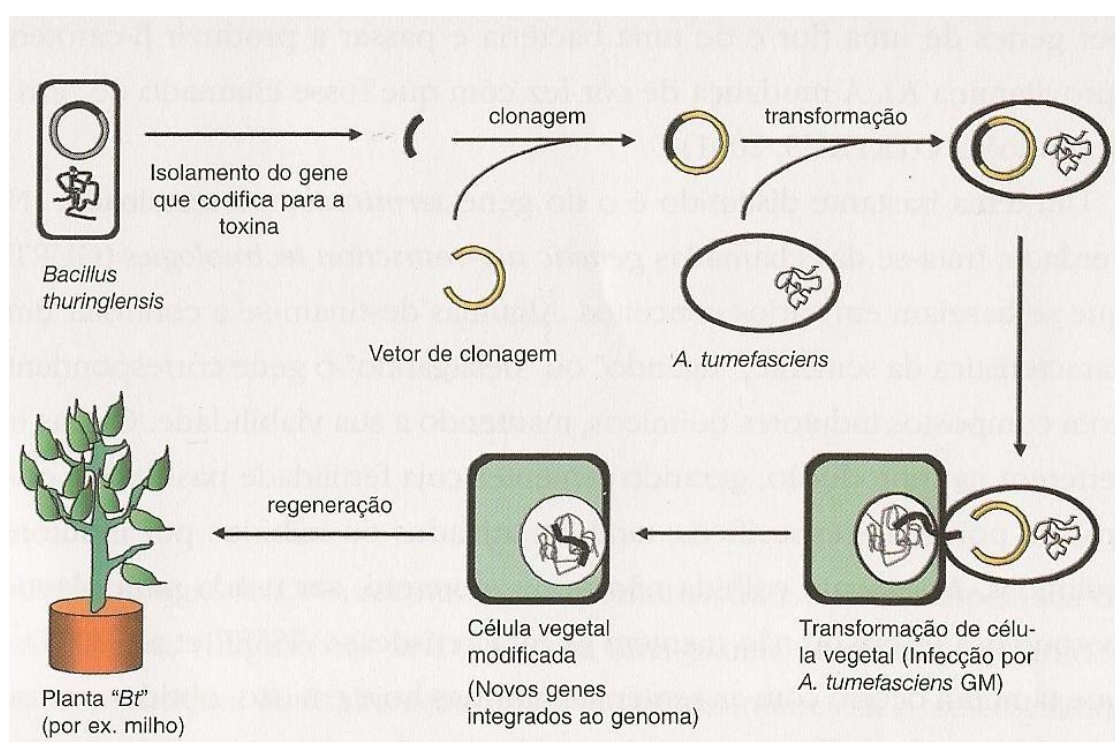


Figura 2. Etapas da produção de um organismo geneticamente modificado resistente às larvas de insetos.

Fonte: LAJOLO & NUTTI (2003).

Como os processos de transformação são pouco eficientes, associam-se ao gene de interesse, outros, conhecidos como genes marcadores, para facilitar a seleção das células que realmente foram transformadas, ou seja, as que transportam o gene desejado. Os marcadores são genes que produzem coloração ou são genes de resistência a antibióticos ou herbicidas. Junto com o gene de

interesse e os marcadores, são introduzidos também o promotor e o terminador, que sinalizam o começo e o fim do gene a ser expresso (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

O promotor é uma sequência de nucleotídeos reconhecida pelo sistema de leitura - ácido ribonucleico (RNA) polimerase - como o começo da transcrição do gene e define quando o gene irá expressar-se, em que órgão ou tecido e quanto de proteína irá produzir. Assim, com a escolha adequada do promotor, é possível fazer com que o gene de interesse se expresse em determinado órgão, por exemplo, num fruto, para manter sua firmeza; numa folha, para protegê-la do ataque de insetos. Em muitas variedades de plantas transgênicas aprovadas, o promotor do gene isolado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S) é o mais usado. O terminador, na soja RR[®], é derivado do gene da nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS) (LAJOLO & NUTTI, 2003; MARKOULATOS *et al.*, 2004). Além disso, vários outros elementos podem estar presentes em uma construção genética. Normalmente, sua finalidade é controlar e estabilizar a função do gene, demonstrar a presença da construção no OGM ou facilitar a combinação dos elementos na construção (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

Nas modificações genéticas que ocorrem em melhoramentos convencionais também há transferência de genes, mas comumente entre plantas de uma mesma espécie e por processos de reprodução normal da planta. A transferência, porém, é menos seletiva, envolvendo centenas de genes. Na transferência seletiva, o gene transferido irá incorporar-se ao DNA nuclear da célula transformada, a qual, regenerando-se, dará origem a uma planta com um ou alguns genes que ela antes não possuía. Essa planta terá então novas propriedades originadas pela expressão dos novos genes (LAJOLO & NUTTI, 2003).

Normalmente, as características desejadas, como resistência a insetos e tolerância a herbicidas são obtidas pela introdução de um novo gene. Em certos casos, porém, genes preexistentes podem ser removidos ou bloqueados (PADGETTE *et al.*, 1996).

A soja transgênica RR[®], evento GTS 40-3-2, foi desenvolvida pela companhia Monsanto nos anos 80 com o intuito de disponibilizar um material tolerante à ação de herbicidas à base de glifosato, que são comumente usados para dessecação de

vegetação invasora em culturas perenes. O glifosato, ingrediente ativo do *Roundup*[®], é um herbicida não seletivo, com amplo espectro de ação, utilizado mundialmente para controle de ervas daninhas. Age como um inibidor competitivo da enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), uma enzima essencial na síntese de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina e triptofano. A inibição da EPSPS resulta no atraso do crescimento, desbalanço de aminoácidos e consequente morte da planta (QUERCI & MAZZARA, 2006; ABRAHÃO, 2008).

A soja convencional não é resistente ao herbicida glifosato porque tem a enzima EPSPS, que é inibida por ele. O que se fez, foi obter o gene dessa enzima de outro organismo, uma bactéria, e provocar uma alteração molecular correspondente a um aminoácido, tornando-a mais resistente ao herbicida. O gene modificado que codifica a enzima CP4 EPSPS presente em bactérias do solo *Agrobacterium sp.* cepa CP4 (CP4 EPSPS) é o que foi introduzido no DNA da soja, gerando resistência ao glifosato (PADGETTE *et al.*, 1996).

O evento GTS 40-3-2 da Monsanto recebeu o gene CP4 EPSPS, utilizando a biobalística. O gene CTP4 (peptídeo de trânsito para o cloroplasto) foi isolado da planta *Petunia hybrida* e é responsável por conduzir a nova proteína EPSPS para o interior do cloroplasto onde se localiza o sítio de ação do glifosato e a via do chiquimato. O gene CP4 EPSPS está ligado à sequência CTP e ambos estão sob a regulação do promotor constitutivo CaMV 35S, ativo em todos os tecidos da planta, e uma porção da região 3' terminal não codificadora T-NOS, derivada do gene da nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens*, como demonstrado na **Figura 3** (PADGETTE *et al.*, 1995; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006; BRANQUINHO, 2010).

CaMV 35S	CTP	CP4 EPSPS	T-NOS
----------	-----	-----------	-------

Figura 3. Representação esquemática da construção genética presente na soja *Roundup Ready*[®].

CaMV 35S: promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor, CTP: peptídeo de trânsito para o cloroplasto da enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), CP4 EPSPS: gene da EPSPS, T-NOS: terminador do gene da nopalina sintetase.
Adaptado de PADGETTE *et al.* (1995).

A área cultivada com plantas transgênicas no mundo avançou dos 1,7 milhões de hectares registrados em 1996 para cerca de 160 milhões de hectares em 2011. Atualmente, 36 países têm autorização para plantio e comercialização de plantas GM. As culturas transgênicas autorizadas para comercialização são inúmeras, sendo as principais: soja, milho, algodão e canola (JAMES, 2011; BRASIL, 2013).

A soja transgênica foi introduzida pela primeira vez nos Estados Unidos nos anos 90 quando as variedades resistentes ao glifosato tornaram-se disponíveis. Em 2008, as variedades transgênicas (exclusivamente tolerantes a herbicidas) ocuparam 92 % dos 31,3 milhões de área de soja plantada nos Estados Unidos (HEATHERLY, 2009).

No Brasil, para a safra de 2011/2012 houve um crescimento da área semeada com variedades de soja transgênica em 13,4 % em relação ao plantio transgênico da safra anterior, passando de 18,4 milhões de hectares para 20,8 milhões de hectares, ou seja, 82,7 % da área total prevista. Na **Figura 4** encontra-se ilustrada a nítida tendência de substituição da soja convencional pela transgênica no Brasil. Para milho e algodão, a porcentagem de área plantada com transgênicos corresponde a 65 % e 39 %, respectivamente (CELERES, 2011).

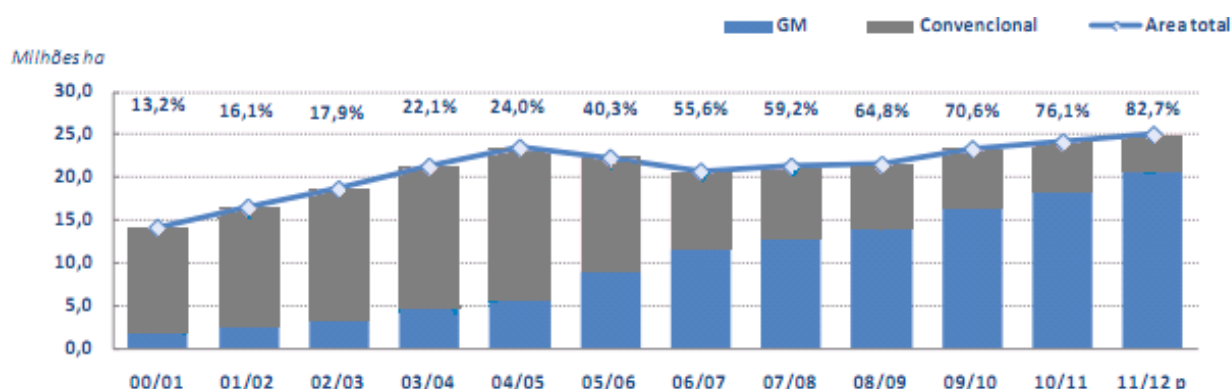


Figura 4. Perfil da área plantada no Brasil, em milhões de hectares, com soja convencional e geneticamente modificada nas safras 2000/2001 a 2011/2012.

Fonte: CÉLERES (2011).

Quanto às tecnologias, no Brasil, o ano de 2011 foi o primeiro com plantio de variedades de soja com a tecnologia de genes combinados, com resistência a insetos e tolerância a herbicidas. Porém, é importante frisar que esses hectares iniciais destinam-se essencialmente a produção de sementes, devendo o seu plantio em escala comercial ser iniciado no ano agrícola 2012/2013 (CÉLERES, 2011). Os eventos de soja liberados no Brasil encontram-se relacionados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Eventos liberados no Brasil para soja

Designação do OGM	Requerente	Espécie	Característica Inserida	Método de introdução da característica	Uso proposto	Data de aprovação
Soja Roundup Ready® - Evento GTS-40-3-2	Monsanto do Brasil Ltda.	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Tolerância ao herbicida glifosato	O gene CP4 EPSPS, que codifica a enzima EPSPS foi isolado da bactéria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4 e inserido no genoma da soja através do método de aceleração de partículas (biobalística).	Livre prática de atividades de cultivo, registro, uso, ensaios, testes, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, importação e descarte da referida soja.	Setembro de 1998
Soja CV127 Evento BPS-CV127-9	BASF S.A. e Embrapa Soja	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Tolerância a herbicida do grupo químico das imidazolinonas	Transformação por biobalística da variedade comercial da soja Conquista, utilizando um fragmento de DNA do plasmídeo pAC321, contendo o cassette de expressão do gene <i>csr1-2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (tolerância a herbicida do grupo químico das imidazolinonas) e a sequência completa da subunidade gama da proteína AtSEC61y.	Livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte e quaisquer outras atividades relacionadas a este OGM.	Dezembro de 2009
Soja Liberty Link® - Evento A2704-12	Bayer S.A.	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Tolerância ao glufosinato de amônio	Aceleração de partículas em meristemas apicais de soja, conforme metodologia descrita por Christou <i>et al.</i> (1988) e utilizando o plasmídeo pB2/35Sack previamente fragmentado.	Livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação, descarte e quaisquer outras atividades relacionadas a este OGM.	Fevereiro de 2010
Soja Liberty Link® - Evento A5547-127	Bayer S.A.	<i>Glycine Max</i>	Tolerância ao glufosinato de amônio	Método de aceleração de partículas.	Cultivo, produção de grãos, consumo humano e animal dos produtos e derivados.	Fevereiro de 2010
Soja MON 87701 x MON 89788	Monsanto do Brasil Ltda.	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Tolerância a herbicida e resistência a insetos	Cruzamento dos parentais de soja geneticamente modificadas resistente a insetos, MON 87701 e tolerante a glifosato MON 89788. O evento MON 87701 possui o gene Cry1Ac, oriundo de <i>Bacillus thuringiensis</i> e o evento MON 89788 possui o gene CP4 EPSPS, oriundo de <i>Agrobacterium sp.</i>	Livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte e quaisquer outras atividades relacionadas a essa soja e suas progênies.	Agosto de 2010.

Fonte: BRASIL (2013).

3.1.6 LEGISLAÇÃO PARA OGM NO BRASIL E NO MUNDO

A regulamentação para OGM se baseia em dois princípios fundamentais: o princípio de equivalência substancial, adotado pelos Estados Unidos e o princípio da precaução, adotado pelos países da União Europeia (UE). Os Estados Unidos adotaram uma política de desregulamentação dos produtos transgênicos, enquanto que a UE criou mecanismos reguladores que restringiram a sua adoção entre 1999 e 2004. O princípio de equivalência substancial se baseia na avaliação da segurança alimentar, considerando que os OGM quimicamente equivalentes aos organismos obtidos através de técnicas convencionais de melhoramento genético não requerem estudos toxicológicos adicionais. Ao contrário do princípio da precaução, que é baseado no gerenciamento do risco e considera que a adoção de uma nova tecnologia ou produto deve ser adiada enquanto não houver evidências suficientes de sua inocuidade. Dessa forma, a aprovação de plantio e/ou comercialização de OGM em países que adotam o princípio da precaução dependem da avaliação cuidadosa, por parte de agências regulatórias, de estudos sobre a caracterização molecular do evento, estudos de equivalência nutricional, toxicidade, nutrição animal, expressão de proteína heteróloga e avaliações agro-ecológicas realizadas ao longo de mais de uma safra da cultura (BRASIL, 2005 a; UNIÃO EUROPÉIA, 2013).

No Brasil, a semelhança do modelo europeu e também baseado no princípio da precaução, em janeiro de 1995 foi criada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), pela Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, que representa o órgão oficial brasileiro que regulamenta todos os processos envolvendo OGM (BRASIL, 1995). Esta Lei foi revogada pela Lei de Biossegurança nº 11.105, de 24 março de 2005, que define a CTNBio como o órgão responsável por coordenar as atividades que envolvem OGM no país, como o estabelecimento de normas de segurança e mecanismos de fiscalização. A aprovação para a comercialização do plantio de soja RR[®] com fins comerciais é regulamentada por esta mesma Lei. No artigo 40, é reafirmado que os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou que sejam produzidos a partir de

OGM ou derivados deverão conter informação nesse sentido em seus rótulos (BRASIL, 2005 a).

Em 1997, a CTNBio autorizou, pela primeira vez no Brasil, a realização de testes de campo para fins de pesquisa com a soja transgênica (EMBRAPA, 2003).

Em janeiro de 1998, a CTNBio emitiu, por meio do Comunicado nº 54, parecer técnico conclusivo favorável à solicitação encaminhada pela Monsanto, de liberação da comercialização de soja RR[®] (BRASIL, 1998 a). Esta ação gerou a reação do Instituto de Defesa do Consumidor e outras organizações não governamentais, que tiveram o apoio do IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente), justificada pela necessidade da apresentação dos Estudos de Impacto Ambiental/Relatório de Impacto no Meio Ambiente (EIA/RIMA) (EMBRAPA, 2003). Então, a Instrução Normativa nº 18, de 15 de dezembro de 1998, emitida pela CTNBio, estabeleceu que as atividades de cultivo, registro e outros usos de cultivares de soja RR[®] ficariam isentas de avaliação prévia da CTNBio e exigiu que fosse feito, por um período de cinco anos, o monitoramento científico dos plantios comerciais da soja RR[®] (BRASIL, 1998 b).

Em outubro de 1998, ocorreu a primeira apreensão de soja transgênica plantada em solos brasileiros, na região central do Rio Grande do Sul. Os agricultores responsáveis foram indiciados pela Polícia Federal, mas o processo foi suspenso em 1999, após um acordo entre o Ministério Público Federal e a defesa dos produtores. Na safra 2000/2001 foram descobertos novos plantios clandestinos de soja RR[®]. As sementes contrabandeadas eram da Argentina e ficaram conhecidas como "soja maradona", sendo as plantações incineradas e as lavouras interditadas por 180 dias. Os produtores tiveram prejuízos, também devido às sementes não serem adaptadas ao solo brasileiro (EMBRAPA, 2003).

Na safra 2002/2003 os produtores gaúchos assumiram novamente o risco de cultivar um produto ilegal. A partir disto, o plantio e comercialização da soja RR[®] foram autorizados por Medidas Provisórias (MP) presidenciais convertidas em Lei pelo Congresso Nacional, como a MP nº 11, posterior Lei nº 10.688/2003 (BRASIL, 2003 b), MP nº 131, posterior Lei nº 10.814/2003 (BRASIL, 2003 c) e MP nº 233, posterior Lei nº 11.092/2005 (BRASIL, 2005 b).

Assim, em 24 de abril de 2003 foi publicado o Decreto nº 4.680, que estabeleceu um limite de 1 % para a presença não intencional de OGM, acima do qual a sua presença deveria ser informada no rótulo, exigindo a informação da espécie doadora do gene inserido (BRASIL, 2003 a).

O Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança foi o primeiro acordo internacional que regeu a transferência, manejo e uso de organismos vivos modificados por meio da biotecnologia moderna. Adotado em 2000 pelos membros da Convenção sobre Diversidade Biológica, o protocolo buscava um comércio internacional de transgênicos mais transparente, através de medidas de segurança de acordo com as necessidades de consumidores, indústrias e, principalmente, do meio ambiente. Foi aprovado em 29 de janeiro de 2000, entrando em vigor em setembro de 2003. Atualmente, 161 países fazem parte do Protocolo. O Brasil e Japão são signatários desde 2004, enquanto Estados Unidos, Argentina, Austrália e Canadá não são (BIOSAFETY CLEARING-HOUSE, 2011). O objetivo do Protocolo é contribuir para assegurar um nível adequado de proteção no campo da transferência, da manipulação e do uso seguros dos organismos vivos modificados resultantes da biotecnologia moderna que possam ter efeitos adversos na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica, levando em conta os riscos para a saúde humana, e enfocando especificamente os movimentos transfronteiriços (BRASIL, 2006).

Na UE, a determinação prevista no Regulamento (CE) nº 1.829/2003, de 22 de setembro de 2003 – relativo a gêneros alimentícios e alimentos para animais GM - e no Regulamento (CE) nº 1.830/2003, de 22 de setembro de 2003 - relativo à rastreabilidade e rotulagem de OGM e à rastreabilidade dos gêneros alimentícios e alimentos para animais produzidos a partir de OGM, prevê rotulagem obrigatória em produtos que apresentam 0,9 % ou mais de OGM nos ingredientes individuais que entraram no seu preparo (UNIÃO EUROPEIA, 2003). Na Suíça o limite é de 0,1 % e na Rússia e Japão 5 %. Nos EUA, embora a recente legislação não exija a rotulagem, o governo recomenda fazê-la voluntariamente, exigindo apenas que as empresas produtoras de alimentos contendo OGM notifiquem órgãos reguladores, como *Food and Drug Administration (FDA)*, *United States Department of Agriculture*

(USDA) e *Environmental Protection Agency* (EPA), antes de o novo produto ser comercializado (THOMSON, 2003).

A Portaria nº 2.658 de 22 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003 d) define o símbolo que deve compor a rotulagem tanto dos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal embalados como nos vendidos a granel ou *in natura*, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM (**Figura 5**).



Figura 5. Símbolo definido na Portaria nº 2.658 de 22 de dezembro de 2003 que deve ser apresentado no rótulo de alimentos que contenham organismos geneticamente modificados em sua composição (BRASIL, 2003 d).

O Código de Defesa do Consumidor, que surgiu em 1990 (Lei nº 8.078), busca a proteção da saúde contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O Código externa o entendimento social de serem a qualidade e o risco responsabilidades do fabricante e/ou fornecedor. No artigo 6º inciso III e no artigo 31 do Código de Defesa do Consumidor é definido como direito básico do consumidor o acesso à informação sobre as características dos produtos ofertados em relação à sua qualidade, composição, origem e riscos que apresentem à saúde e segurança, veiculada de forma clara, precisa e ostensiva (BRASIL, 1990).

Desta forma, a questão da segurança alimentar está embasada no direito dos consumidores de saberem o que está presente nos produtos que compram. Sem um fluxo de informação transparente sobre os produtos GM, a escolha informada não pode ser sustentada (PAN, 2002).

3.1.7 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE OGM EM ALIMENTOS

Até recentemente, o controle de alimentos centrava-se na contaminação microbiológica, química e biológica, assim como nas fraudes e, em menor extensão, à adequação nutricional. Hoje, o controle alimentar abrange todas as áreas como a composição química, aspectos higiênicos, adequação nutricional e autenticidade, concentrando-se em compostos químicos presentes em concentrações mínimas ou traços. Vários métodos para detecção de OGM já foram desenvolvidos, sendo a grande maioria baseada na detecção de proteínas e DNA (AHMED, 2002).

Os OGM geralmente são caracterizados pela presença de um ou mais segmentos de DNA exógenos, que podem ou não proporcionar a expressão de novas proteínas. Sendo assim, a detecção destes organismos é baseada na sequência de DNA exógena ou na proteína transgênica. Na **Figura 6**, encontra-se retratada uma sequência genérica das etapas analíticas envolvidas na determinação de OGM em alimentos, a qual compreende três etapas: i) detecção (triagem) de OGM, a fim de obter uma primeira percepção sobre a presença de OGM no produto; ii) identificação do OGM, para revelar quais eventos estão presentes; e iii) quantificação do OGM, para checar a necessidade de declaração na rotulagem ou não, conforme a legislação (PETIT *et al.*, 2003).

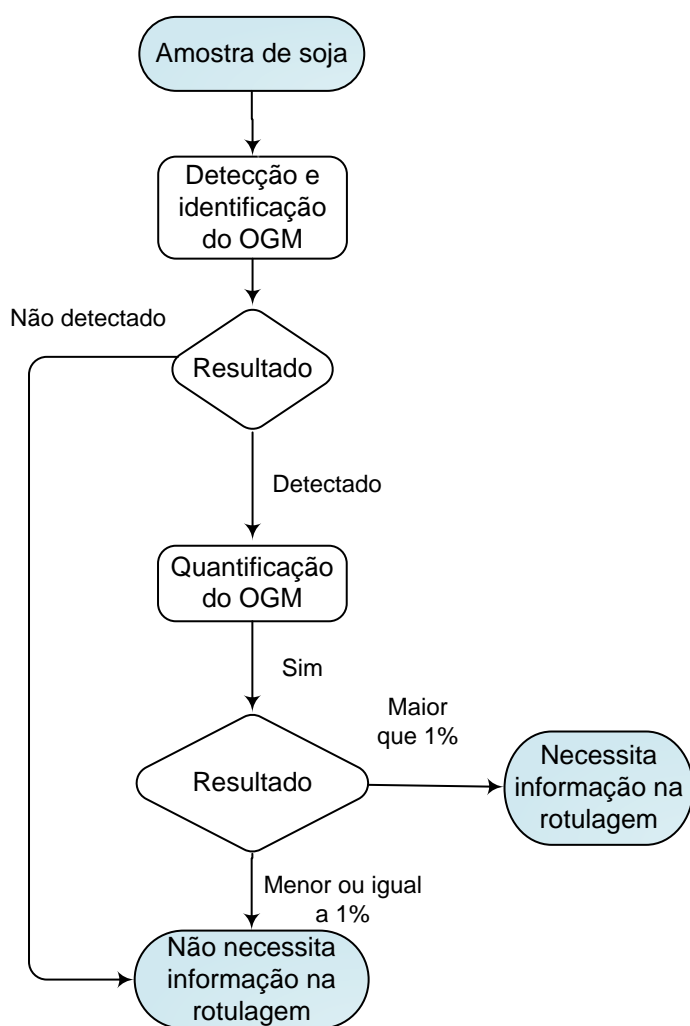


Figura 6. Etapas de detecção, identificação e quantificação de organismos geneticamente modificados, considerando o limite de 1 % estabelecido na legislação brasileira.

Adaptado de ANKLAM *et al.* (2002).

3.1.7.1 Detecção baseada na presença de proteínas

A tecnologia de imunoenaios utilizando anticorpos é ideal para detecção quantitativa e qualitativa de proteínas em matrizes complexas quando o analito é conhecido (AHMED, 2002). Os imunoenaios são utilizados para detecção e quantificação das “novas” proteínas introduzidas através da manipulação genética de plantas. O componente principal de um imunoenaiio é um anticorpo com alta

especificidade e afinidade pela molécula alvo, isto é, a proteína recombinante (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

Imunoensaios com anticorpos ligados a uma fase sólida têm sido usados em dois formatos: i) ensaio de duplo anticorpo ou “sanduíche”; e ii) ensaio competitivo. No ensaio “sanduíche” são utilizados dois anticorpos específicos para a proteína transgênica (antígeno ou Ag), sendo que um sensibiliza a microplaca, visando a captura do Ag presente na amostra, e o outro geralmente está conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que revela a reação (produção de cor). No ensaio competitivo, o Ag presente na amostra e um padrão (Ag conjugado com uma enzima) competem pela ligação do anticorpo de captura. Neste ensaio, a concentração de Ag é inversamente proporcional à intensidade colorimétrica produzida (AHMED, 2002; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

Contudo, a detecção de OGM por técnicas que empregam imunoensaios nem sempre é possível. Isto ocorre quando o nível de expressão da proteína transgênica nas partes das plantas que são utilizadas na produção de alimentos é muito baixo (AHMED, 2002). A concentração de proteína transgênica nos tecidos de plantas varia em função da idade, variedade e condições ambientais. O processamento do alimento pode promover a remoção das proteínas em determinados produtos, como em xaropes e óleos altamente refinados, ou a desnaturação das mesmas, alterando a sua conformação e impedindo o seu reconhecimento pelo anticorpo (STAVE, 2002). Os imunoensaios não detectam alimentos contendo OGM cuja modificação genética resulta no aumento da expressão de uma proteína nativa (MIRAGLIA *et al.*, 2004) e também são incapazes de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes eventos mas expressam a mesma proteína transgênica (KOK *et al.*, 2002).

Técnicas imunoenzimáticas como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), o imunoensaio de fluxo lateral (IFL) e o *western blot* são os principais imunoensaios utilizados na detecção e quantificação de alimentos contendo OGM, principalmente o evento da soja RR[®] (MAGIN *et al.*, 2000; AHMED, 2002).

O ELISA é uma técnica sensível, específica, segura, robusta, rápida e que geralmente não requer muito treinamento. Além disso, é ideal para a análise

simultânea de um grande número de amostras e para testes de rotina de alimentos crus e ingredientes básicos (YATES, 1999). Seu princípio se baseia tanto no ensaio “sanduíche” como no ensaio competitivo, sendo o primeiro mais recomendado devido à maior sensibilidade (STAVE, 1999). O LD varia de 0,01 a 1%. No entanto, a técnica de ELISA exige que a proteína esteja intacta, assim como no IFL, não constituindo um método de detecção apropriado para OGM se o gene inserido não expressar uma proteína ou se as proteínas estiverem degradadas. Portanto, os imunoenaios não estão disponíveis para todos os OGM comercializados (GMOTESTING, 2013).

O IFL é uma variação do ELISA. Trata-se de um teste qualitativo, prático, não dispendioso e rápido, cujos resultados são obtidos entre 5 e 15 minutos, sendo indicado para triagens. Além disso, não necessita de pessoal treinado e equipamentos especiais. As fitas de IFL foram desenvolvidas comercialmente para detectar a endotoxina Cry1Ab (que confere à planta a característica de resistência a algumas espécies de insetos da Ordem *Lepidoptera*) ou a proteína CP4 EPSPS presente em plantas de soja, milho, canola e beterraba GM (LIPTON *et al.*, 2000). Existem no mercado diversos *kits* para diferentes eventos (AHMED, 2002) e, atualmente, fitas de IFL que podem detectar simultaneamente mais de uma proteína em uma mesma fita (SCST, 2006).

No IFL são utilizados dois anticorpos específicos contra a proteína transgênica: um anticorpo de captura e um anticorpo de detecção conjugado a um reagente de cor. O anticorpo de detecção está na extremidade da fita que é inserida na amostra em solução. A seguir, este anticorpo, a proteína alvo e o complexo “anticorpo de detecção – proteína alvo” migram por capilaridade até a outra extremidade da fita, que contém duas zonas de captura, uma específica para a proteína alvo e a outra específica para o anticorpo de detecção. A presença de duas bandas coloridas indica que o teste é positivo para a proteína alvo enquanto que a presença de uma banda colorida indica que o teste foi realizado corretamente, mas foi negativo (AHMED, 2002; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

Apesar da rapidez e conveniência dos testes de IFL, estes apresentam limitação para emprego na detecção de OGM, visto que nem toda sequência de

DNA pode ser analisada. Cumpre considerar também a baixa sensibilidade dos testes de IFL em relação à PCR, com limites variando de 0,1 a 1 % (GMOTESTING, 2013).

O *western blot* é uma técnica qualitativa altamente seletiva, que proporciona resultados adequados para determinar se uma amostra contém a proteína-alvo abaixo ou acima de um limite pré-determinado, sendo particularmente indicada para análise de proteínas insolúveis (BRETT *et al.*, 1999).

As proteínas são submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, desnaturadas e carregadas negativamente pela exposição a um detergente, como dodecil sulfato de sódio (SDS). Em seguida, são transferidas, geralmente, para uma folha de nitrocelulose, embora outros tipos de membranas possam ser usados. As proteínas mantêm o mesmo padrão de separação que apresentaram no gel. A membrana é bloqueada com uma solução de albumina bovina ou leite em pó desnatado a fim de reduzir as interações não-específicas da proteína entre a membrana e o anticorpo. O anticorpo é adicionado à solução, sendo capaz de se ligar à sua proteína específica. O anticorpo tem uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase) ou corante ligado a ele que não pode ser visualizado neste momento. A localização do anticorpo é revelada através da incubação com um substrato incolor que a enzima converte a um produto colorido que pode ser visto e fotografado (AHMED, 2002; DAVIDSON COLLEGE, 2011). Por ser um método laborioso, tem sido adotado preferencialmente nos laboratórios de pesquisa do que nos de rotina (AHMED, 2002). Em grãos de soja, estudos indicam LD elevados, quando comparados aos obtidos por PCR, e dificuldades para detecção de OGM em amostras processadas (VAN DUIJN *et al.*, 1999;. YATES, 1999).

3.1.7.2 Detecção baseada na presença de DNA

Como o DNA é uma molécula estável, alimentos processados são geralmente analisados por métodos baseados na pesquisa desta molécula (GREINER, 2005). Assim, a detecção de DNA recombinante em alimentos é possível por PCR, uma técnica que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, e é sensível, seletiva, segura, capaz de detectar uma ampla variedade de

eventos (BERTHEAU *et al.*, 2002) e de distinguir variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, mas expressam a mesma proteína (YAMAGUCHI *et al.*, 2003). As principais limitações da PCR são a dificuldade na construção dos iniciadores, uma vez que a informação sobre a sequência da modificação genética geralmente é confidencial, até que o evento seja liberado (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003), a necessidade de pessoal treinado e equipamentos especiais, o elevado custo, pois cada teste é específico para uma única modificação genética, e a necessidade de material de referência certificado, cuja disponibilidade geralmente é limitada (MIRAGLIA *et al.*, 2004).

Independentemente da variedade de métodos utilizados para análise de DNA, a PCR, nos seus diferentes formatos, tem sido a técnica de escolha, amplamente aplicada na determinação de OGM e aceita para fins de avaliação da conformidade com propósitos regulamentares (PAN, 2002; PETIT *et al.*, 2003; ABRAHÃO, 2008).

O gene transgênico é apenas um entre os milhares de genes do genoma. Além disso, na prática diária, é necessário detectar uma única semente geneticamente modificada entre 1.000 a 10.000 sementes convencionais e a PCR tem demonstrado ter sensibilidade suficiente para tal. O LD da PCR está entre 20 pg e 10 ng de DNA alvo, correspondendo a níveis de OGM entre 0,0001 e 1 %. (LÜTHY, 1999).

Para a execução da PCR, adiciona-se ao DNA extraído da amostra em análise uma mistura contendo: os desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), que são as unidades componentes das novas moléculas, os iniciadores (*primers*), a enzima Taq DNA polimerase, uma solução tampão e cloreto de magnésio. Esta mistura é colocada no aparato de PCR, o termociclador, que alterna ciclos de temperatura preestabelecidos com tempos determinados (CONTRI, 2006).

Na primeira etapa do ciclo, a temperatura é elevada para 95 °C por pouco tempo para que haja a separação da dupla fita de DNA (desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura é abaixada para que ocorra o anelamento dos iniciadores com o DNA-molde. Na última etapa do ciclo, a temperatura é novamente elevada para 72 °C para que possa ocorrer a extensão da nova fita de DNA. Em seguida, um novo ciclo é iniciado. O fragmento produzido na reação anterior serve também como

molde para a reação seguinte. A PCR envolve, portanto, cerca de 30 ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores com suas sequências complementares e polimerização da fita complementar ao molde. Os segmentos de DNA são sintetizados em uma progressão geométrica, pois a cada ciclo origina-se um novo segmento a partir do inicial e de cada um dos segmentos já produzidos no ciclo anterior (CONTRI, 2006).

A qualidade, pureza e o rendimento do DNA a ser utilizado na PCR são fatores críticos na análise de OGM por esta técnica. A etapa de extração de ácidos nucléicos é o primeiro passo na maioria dos estudos de biologia molecular e em todas as técnicas de DNA recombinante. O objetivo desta importante etapa é a obtenção de um ácido nucléico puro e íntegro (ANKLAM *et al.*, 2002).

A qualidade do DNA varia de acordo com o material em análise, o grau de processamento ao qual a amostra foi submetida e o método de extração aplicado. A pureza do DNA pode ser afetada por vários contaminantes presentes nas matrizes alimentares. Estes contaminantes podem ser substâncias originárias da amostra ou químicos utilizados durante o procedimento de extração do DNA (ANKLAM *et al.*, 2002). Lipídeos, polissacarídeos, polifenóis e outros componentes secundários são conhecidos por causarem problemas na análise de PCR, uma vez que podem interagir irreversivelmente com as proteínas e ácidos nucléicos e agir como inibidores da PCR (GREINER, 2005).

Devido a estes efeitos, a sensibilidade de detecção e quantificação de OGM, estabelecidas durante a validação, deve ser específica para a matriz a ser analisada, não podendo ser extrapolada para outras. A menor quantidade de DNA extraído da matriz alvo ou o comprometimento da integridade das moléculas de DNA causam o aumento dos limites de detecção e quantificação, expressos em termos de DNA transgênico em relação ao DNA total da matriz. Em casos em que a eficiência da extração é extremamente baixa, a reprodutibilidade do método é baixa e os valores de limite de detecção e quantificação desconhecidos, o que pode gerar resultados falso-negativos (MARCELINO, 2006).

Quantidades significativas de DNA amplificável são, geralmente, difíceis de serem obtidas de alimentos processados uma vez que o DNA pode ser degradado

durante o processamento do alimento. Segundo GREINER (2005), os alimentos são submetidos a vários tipos de processamento, incluindo tratamentos físicos, químicos e enzimáticos, os quais influenciam na quantidade e qualidade do DNA: processos mecânicos promovem a fragmentação do DNA, tratamentos térmicos resultam na sua degradação e tratamentos enzimáticos acarretam em hidrólise enzimática e modificações no DNA. O DNA é sensível a agentes ácidos e alcalinos devido à degradação hidrolítica. Em condições ácidas, as purinas são removidas do esqueleto de ácidos nucleicos devido à clivagem das ligações N-glicosídicas entre os resíduos de desoxirriboses e das bases. Conseqüentemente, as ligações fosfodiéster adjacentes são hidrolisadas, acarretando o encurtamento das fitas de DNA (PEANO *et al.*, 2004).

Quanto menor for a quantidade do ingrediente alvo, da qual se pretende extrair DNA ou proteína para análise, em relação aos outros ingredientes presentes no produto, mais difícil será a detecção de resíduos transgênicos (MARCELINO, 2006).

Segundo CONTRI (2006), o protocolo para análise de OGM em alimentos segue as seguintes linhas gerais: i) extração e purificação do DNA da amostra por um método apropriado; ii) determinação da concentração de DNA extraído por espectrofotometria ou eletroforese em gel de agarose e verificação de sua qualidade, ou seja, do seu grau de fragmentação; iii) determinação da presença de DNA amplificável, pela amplificação de fragmentos de genes específicos presentes na amostra a ser analisada. No caso da soja, amplifica-se um fragmento do gene da lectina. Para milho, pode-se utilizar a amplificação de fragmentos dos genes de uma zeína ou da invertase; e, iv) amplificação do DNA com iniciadores específicos para seqüências presentes no transgene.

Extração e quantificação de DNA

Diferentes protocolos de isolamento de DNA, com inúmeras variações, são utilizados para a extração deste ácido nucleico a partir de matrizes complexas: o

método CTAB (cetiltrimetilamônio brometo) e colunas de sílica ligantes de DNA (GREINER, 2005).

Em geral, a extração de DNA deve seguir as seguintes etapas: i) lise da parede celular, com gelo seco ou nitrogênio líquido; ii) rompimento da membrana celular, utilizando um detergente (CTAB ou SDS), um componente necessário em qualquer tampão de extração de DNA; iii) inativação de nucleases endógenas pela adição de detergentes e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), quelante de cátions bivalentes como Mg^{+2} e Ca^{+2} , co-fatores obrigatórios de muitas enzimas; iv) proteinase K, que pode ser adicionada para inativação e degradação das proteínas, particularmente em protocolos que utilizam colunas de sílica ligantes de DNA; v) separação de polissacarídeos inibidores devido à sua diferente solubilidade na presença de CTAB em relação ao DNA; vi) separação de lipídios e polifenóis realizada pela extração com solventes orgânicos como o clorofórmio; vii) separação do DNA do detergente aumentando a concentração de sal e precipitação com isopropanol ou etanol. Alternativamente aos passos v a vii, a separação do DNA dos outros componentes celulares pode ser realizada pela purificação em uma coluna de sílica ligante de DNA (ANKLAM *et al.*, 2002, SOMMA, 2006).

Devido à boa separação dos polissacarídeos do DNA, o método CTAB mostra-se eficiente para uma ampla variedade de vegetais e alimentos derivados. *Kits* baseados em colunas de sílica ligantes de DNA provaram ser adequados para extração de DNA de boa qualidade a partir de alimentos processados (GREINER, 2005).

Métodos de purificação do DNA genômico por ligação a coluna de sílica, disponível na forma de *kits* comerciais, tais como o DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), são também utilizados pela sua conveniência e pela eficácia no isolamento de DNA genômico de tecidos vegetais. Outra vantagem é que não requerem uso de solventes como fenol ou clorofórmio durante a extração e envolvem poucas etapas de manipulação das amostras. Além disso, esses métodos têm se mostrado eficientes na extração de DNA de algumas matrizes menos complexas como farinha de soja (CORBISIER *et al.*, 2005).

Uma conveniência do método de coluna de sílica é a sua rapidez quando comparado ao método CTAB. O método de coluna de sílica é capaz de permitir a purificação de DNA em até uma hora, enquanto que o CTAB pode demorar até seis horas. O método CTAB, por sua vez, tem a seu favor o baixo custo e a independência de *kits* comerciais, usualmente de custo elevado. O método de coluna de sílica pode custar até cinco vezes o valor do método CTAB por amostra e não é produzido no Brasil, sendo necessária a sua importação (CONTRI, 2006).

O Qubit[®] 2.0 Fluorometer é um fluorímetro que possibilita a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes. Estes corantes são específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em concentrações baixas, conferindo a esta metodologia uma alta seletividade e sensibilidade, além de permitir quantificar apenas RNA ou DNA. O Qubit[®] utiliza a tecnologia PicoGreen, que fluoresce apenas quando se liga ao DNA de cadeia dupla, tornando-se um método de quantificação mais preciso do que os espectrofotométricos (como *Transmitted Light Drop Analyser* e NanoDrop) (O'NEILL *et al.*, 2011).

Um método alternativo é a quantificação por gel de agarose. Este é útil quando apenas pequenas quantidades de ácido nucléico estão disponíveis. A quantidade de ácido nucléico pode ser estimada, quando comparada a uma série de padrões de concentração, a partir da inspeção visual da intensidade da fluorescência emitida pelo brometo de etídio quando irradiado com a luz ultravioleta (SOMMA, 2006).

Detecção de OGM em alimentos por PCR

Segundo MEYER (1999), métodos analíticos baseados na pesquisa do DNA tornaram-se mais importantes na qualidade e segurança de alimentos devido à sua simplicidade, seletividade e sensibilidade no monitoramento de microrganismos, detecção de constituintes alimentares como trigo e soja (MEYER *et al.*, 1996) e na identificação de espécies de carnes (MEYER, CANDRIAN & LÜTHY, 1994) e peixes (HÜBNER, BURGNER & LÜTHY, 1997). A detecção do tomate *Flavr Savr*[®] foi o primeiro método desenvolvido especificamente para a identificação de um OGM

(MEYER *et al.*, 1995). Em 1999, alguns métodos qualitativos de detecção de DNA, que forneciam respostas binárias (presença/ausência, sim/não), estavam disponíveis para uma ampla gama de alimentos e já haviam sido submetidos a estudos interlaboratoriais (SCHREIBER, 1999).

Nas amostras em que existe DNA GM, todo DNA exógeno introduzido, em princípio, é capaz de ser detectado: sequências de promotores, genes de interesse introduzidos, sinais de terminação e genes marcadores (CRESPO *et al.*, 2001).

Segundo HOLST-JENSEN *et al.* (2003), testes de detecção de OGM em alimentos podem ser agrupados em quatro categorias, com diferentes níveis de seletividade.

Categoria 1 – Métodos para triagem: a maioria dos OGM apresentam vários elementos genéticos como o promotor CaMV P-35S, o terminador do CaMV T-35S, ambos do vírus do mosaico da couve-flor, ou o terminador T-NOS. Os vetores de clonagem mais comumente utilizados são plasmídeo pBR322 e seus derivados que contém genes codificadores de resistência a ampicilina (*bla*) ou neomicina/kanamicina (*nptII*). Assim, métodos baseados nesta categoria possuem amplas aplicações para triagens de OGM. Porém, métodos para triagem não podem ser utilizados para a identificação de um OGM específico, visto que a maioria dos OGM disponíveis possuem um ou mais destes elementos. Além disso, estes ocorrem naturalmente em algumas plantas e microrganismos do solo (PAN, 2002), sendo que a sua presença não implica necessariamente na presença de DNA derivado de um OGM.

Categoria 2 – Métodos gene-específicos: genes de interesse também podem ocorrer naturalmente, mas são frequentemente alterados, por exemplo, por truncamento. Métodos baseados na pesquisa do gene de interesse são mais seletivos que os métodos de triagem, pois um resultado positivo obtido com um método de categoria 2 normalmente implica na presença de DNA derivado de OGM e, em muitos casos, é possível identificar o OGM do qual este DNA é derivado.

Categoria 3 – Métodos baseados na construção específica: estes métodos visam junções entre elementos adjacentes do transgene inserido, por exemplo, a

junção entre o promotor e o gene de interesse. Com estes métodos um resultado positivo aparecerá apenas na presença de material GM e será possível identificar a fonte do DNA de forma mais segura do que com a utilização de métodos de categoria 2.

Categoria 4 – Métodos evento-específicos: o alvo deste método é a junção entre o genoma receptor e o DNA inserido no locus de integração. No entanto, estes métodos apresentam limitações. Quando dois OGM são cruzados (dois diferentes milhos GM como T25 e Mon810), o híbrido descendente pode conter modificações genéticas incluindo os alvos dos dois eventos e serão indistinguíveis dos organismos genitores em uma análise de PCR. Este fenômeno é conhecido como *gene stacking* ou “empilhamento de genes”. Nos Estados Unidos, este tipo de OGM híbrido não necessita regulamentação se os dois organismos genitores já forem autorizados. Na Europa e no Brasil, o híbrido é tratado como um novo OGM, havendo exigência de nova autorização.

PCR qualitativa

Na detecção de OGM em lotes de sementes convencionais é aconselhado começar com um método de triagem, onde diferentes OGM podem ser rastreados em apenas um ensaio. São pesquisados os genes específicos das regiões do promotor e do terminador. Se houver resultado positivo para um ou mais elementos genéticos de uma construção genética, métodos específicos devem ser realizados. Se OGM diferentes, contendo a mesma construção genética, estiverem no mercado é obrigatório o desenvolvimento de um método evento específico (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

Entre as principais técnicas de detecção qualitativa estão a PCR convencional, PCR Multiplex e a *Nested PCR*

PCR convencional

Em uma PCR convencional, a presença de bandas específicas de tamanho esperado nos perfis de eletroforese da amostra e do controle positivo significa a provável presença de OGM, enquanto a ausência desta banda no controle negativo é esperada. Vale ressaltar que os controles devem ser materiais de referência certificados (MRC) ou amostras sabidamente positivas ou negativas. Assim, quando o produto da PCR proveniente da amplificação do DNA recombinante apresentar o fragmento esperado no perfil de eletroforese da amostra, o resultado positivo indica a presença de uma modificação genética, porém não é possível identificar o tipo de modificação ou organismo que foi modificado (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

Se o resultado da PCR convencional for positivo, uma PCR qualitativa mais seletiva deve ser realizada. Este método auxiliar emprega iniciadores que flanqueiam dois elementos genéticos adjacentes que estão presentes apenas em OGM, como o promotor e o gene de interesse ou o gene de interesse e o terminador (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003; MIRAGLIA *et al.*, 2004).

PCR multiplex

A PCR multiplex é uma técnica robusta, rápida e confiável que permite a detecção de várias linhagens transgênicas simultaneamente. Por meio da combinação de diversos pares de iniciadores no mesmo tubo de reação é possível obter um grande número de informações em pouco tempo e com economia de reagentes em relação à PCR convencional (DINON, 2007).

É uma técnica mais trabalhosa para padronização pois a combinação de diferentes iniciadores pode resultar na amplificação de sequências não-alvo e quando há mais de um fragmento alvo sendo amplificado em uma reação, estes competirão pelos reagentes. Assim, é necessário muito cuidado ao se realizar a validação de métodos por PCR multiplex (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

Nested PCR

Na PCR são amplificadas sequências específicas de DNA a partir de uma mistura complexa de DNA. É possível construir iniciadores para amplificar um único *locus* de um genoma inteiro. De uma única molécula, é possível produzir mais de um bilhão de cópias muito rapidamente. No entanto, a possibilidade de amplificar a sequência de DNA não desejável também é aumentada mais de um bilhão de vezes. A seletividade da PCR é determinada pela seletividade dos iniciadores da PCR. Assim, na *Nested PCR* dois pares de iniciadores são usados para um único *locus*. O primeiro par amplifica o *locus* como na PCR convencional. O segundo par de iniciadores liga-se a uma região mais interna do produto da primeira amplificação, produzindo um fragmento mais curto do que o primeiro. A vantagem da *Nested PCR* é que se o fragmento amplificado não for o esperado, a probabilidade dessa região ser amplificada pela segunda vez pelo segundo conjunto de iniciadores é reduzida. A *Nested PCR*, como método para detecção do evento RR[®] em soja, é a metodologia de escolha dos laboratórios que analisam OGM, devido a sua alta seletividade e sensibilidade (FERREIRA, 2006; BROD *et al.*, 2007; BRANQUINHO, 2010).

Os pares de iniciadores GMO5/GMO9 e GMO7/GMO8 foram desenhados para a detecção específica da construção da soja RR[®] por *Nested PCR*, produzindo um fragmento interno de 169 pares de bases (pb) (**Figura 7**). Os iniciadores GMO5 e GMO7 são complementares ao promotor CaMV 35S, o GMO9 hibridiza com o gene CP4 EPSPS e o GMO8 com o gene CTP (QUERCI, JERMINI & VAN DEN EEDE, 2006).

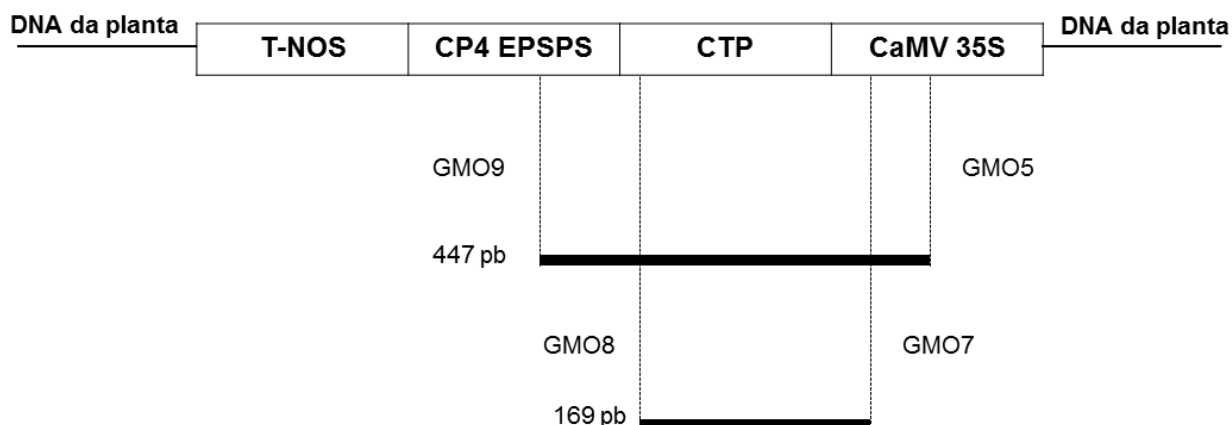


Figura 7. Representação esquemática da região de amplificação da soja *Roundup Ready*® pela *Nested PCR*.

Adaptado de MEYER & JACCAUD (1997).

O gene da soja RR® possui a seguinte sequência (GMDD, 2013):

```

CCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGTTTTCTTGTTTTGGATCTAAAAACTGAAAAAT
TCAGAACCTTG TGCAAATTATTCAAACCCTTCAATTTAACCGATGCTAATGAGTTA
TTTTGCATGCTTTAATTTGTTTCTATCAAATGTTTATTTTTTTTTACTAGAAATAAC
TTATTGCATTTCAATCAAATAAGATCATACATACAGGTAAAATAAACATAGGGA
ACCCAAATGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCC
ACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCA
AGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTA
TCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACA
CGCTGACAAGCTGACTCTAGCAGATCTTTCAAGAATGGCACAATAACAACAT
GGCTCAAGGGATACAAACCCTTAATCCCAATTCCAATTTCCATAAACCCCAAGTT
CCTAAATCTTCAAGTTTTCTTGTTTTGGATCTAAAAACTGAAAAATTCAGCAAA
TTCTATGTTGGTTTTGAAAAAGATTCAATTTTTATGCAAAGTTTTGTTCTTTAG
GATTCAGCATCAGTGGCTACAGCCTGCATGCTTCACGGTGCAAGCAGCCGGC
CCGCAACCGCCCGCAAATCCTCTGGCCTTTCCGGAACCGTCCGCATTCCCGGC
GACAAGTCGATCTCCACCGGTCCTTCATGTTCCGGCGGTCTCGCGAGCGGTGA
AACGCGCATCACCGGCCTTCTGGAAGGCGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGG

```

CCATGCAGGCCATGGGCGCCAGGATCCGTAAGGAAGGCGACACCTGGATCATC
GATGGCGTCGGCAATGGCGGCCTCCTGGCGCCTGAGGCGCCGCTCGATTTTCG
GCAATGCCGCCACGGGCTGCCGCCTGACCATGGGCCTCGTCGGGGTCTACGA
TTTCGACAGCACCTTCATCGGGCAGGCCTCGCTCACAAAGCGCCCGATGGGCC
GCGTGTTGAACCCGCTGCGCGAAATGGGCGTGCAGGTGAAATCGGAAGACGGT
GACCGTCTTCCCGTTACCTTGCGCGGGCCGAAGACGCCGACGCCGATCACCTA
CCGCGTGCCGATGGCCTCCGCACAGGTGAAGTCCGCCGTGCTGCTCGCCGGC
CTCAACACGCCCGGCATCACGACGGTCATCGAGCCGATCATGACGCGCGATCA
TACGGAAAAGATGCTGCAGGGCTTTGGCGCCAACCTTACCGTCGAGACGGATG
CGGACGGCGTGCGCACCATCCGCCTGGAAGGCCGCGGCAAGCTCACCGGCCA
AGTCATCGACGTGCCGGGCGACCCGTCTCGACGGCCTTCCCGCTGGTTGCG
GCCCTGCTTGTTCCGGGCTCCGACGTCACCATCCTCAACGTGCTGATGAACCC
CACCCGCACCGGCCTCATCCTGACGCTGCAGGAAATGGGCGCCGACATCGAAG
TCATCAACCCGCGCCTTGCCGGCGGCGAAGACGTGGCGGACCTGCGCGTTTCG
CTCCTCCACGCTGAAGGGCGTCACGGTGCCGGAAGACCGCGCGCCTCCGATG
ATCGACGAATATCCGATTCTCGCTGTCGCCGCCGCCTTCGCGGAAGGGGCGAC
CGTGATGAACGGTCTGGAAGAACTCCGCGTCAAGGAAAGCGACCGCCTCTCGG
CCGTCGCCAATGGCCTCAAGCTCAATGGCGTGGATTGCGATGAGGGCGAGACG
TCGCTCGTCGTGCGTGGCCGCCCTGACGGCAAGGGGCTCGGCAACGCCTCGG
GCGCCGCCGTCGCCACCCATCTCGATCACCGCATCGCCATGAGCTTCTCGTC
ATGGGCCTCGTGTCGAAAACCCTGTCACGGTGGACGATGCCACGATGATCGC
CACGAGCTTCCCGGAGTTCATGGACCTGATGGCCGGGCTGGGCGCGAAGATC
GAACTCTCCGATACGAAGGCTGCCTGATGAGCTCGAATTCGAGCTCGGTACCG
GATCCAATCCCCGATCGTTCACAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAAT
CCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGC
ATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATT
AGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAA
ACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGGATCGA
TCCCCACCGGTCCTTCATGTTCCGGCGGTCTCGCGAGCGGTGAAACGCGCATC
ACCGGCCTTCTGGAAGGCGAGGACGTCATCAATACGGGCAAGGCCATGCAGGC
CATGGGCGCCAGGATCCGTAAGGAAGGCGACACCTGGATCATCGATGGCGTCG
GCAATGGCGGCCTCCTGGCGCCTGAGGCGCCGCTCGATTTTCGGCAATGCCGC
CACGGGCTGCCGCCTGACCATGGGCCTCGTCGGGGTCTACGATTTCAAGCGCA

TCATGCTGGGAAATTTTAGCGAGATTATAAGTATCTTCCTGGGGATCTCTGCTGT
TACTGGTGAATAGTGAGACAGAGTCTTCTGAGCTCATAGGATAAAATAAATTATA
ATTAGTAAATTTTTTAATTAATAAATAAATCAACTTTCATAAATAATTTTTTTTATAGA
ATATGTTGACATTCTAGCCGGATATAGA ACTAATGTAAAGAAACCTTAAAAATTTT
GTTTGAAGAATATGTTATTGAAAGACAAATCTAATTAAGTTTATCAGGGTCATTT
GTTGAAGATAGGAAACCTTCAGCAATTTGAATATTAAGTAACTGCTTCTCCCAGA
ATGATCGGAGTTTCTCCTCCTGCTATTACATGAGCAAAAATAAAAAATAAATAAAA
GATAAGATTAAGCTTCAACATGTGAAGGAGTAGTACACTCACCAGTGACCCTAAT
AGGCAACAGCATGAAAAAAAAATAAAAAAGAATAAAAATAGCATCTACATATAGCT
TCTCGTTGTTAGAAAAACAAA ACTATTTGGGATCGGAGAAGAACTGTTTGAGGC
GAATGGCCTGGTCGTCGCGGCCATCGTCGAGAAGTTCGTGAAGAAGCTCGAAT
GCGGTGAGAAGGTAGTTCTCTTCCAACAGAAAGTTCACCACGCAATTGCACAGC
GAAGATCTCTCCACGTCCATTTTCTCTCTGTCTCTGATCTTAAGCCATTCATTC
AAGACAAGACAAGAGAAGAGAAGAGA

PCR quantitativa

No Brasil, a quantificação é muito importante na análise de OGM em alimentos, uma vez que, dependendo da sua concentração, o alimento será ou não rotulado como contendo produto GM (MIRAGLIA *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006). Para isso, foram desenvolvidas técnicas de quantificação como a PCR competitiva e a PCR em Tempo Real.

PCR competitiva

A PCR competitiva se baseia na co-amplificação do DNA alvo e de um DNA competidor, que apresenta os mesmos sítios de anelamento para os iniciadores do fragmento alvo. A concentração de OGM presente na amostra é dada pela razão entre o número de cópias do DNA alvo e o número de cópias do gene característico da espécie, multiplicada por 100 %. A PCR competitiva tem sido empregada na quantificação da soja RR[®], milho Bt176 e Bt11, promotor CaMV 35S e terminador T-NOS (RUDI *et al.*, 2003). A principal vantagem deste método é que qualquer

variação na eficiência da amplificação dos dois alvos ou a presença de substâncias inibidoras afetará a amplificação dos dois alvos da mesma forma. Apesar de ser um método robusto, rápido, sensível e adequado para análise de rotina, é dispendioso, oneroso, requer experiência e padrões competidores adequados, sendo bastante comum a contaminação da amostra devido à excessiva manipulação. Além disso, a confiabilidade da quantificação por este método depende muito da técnica usada para detectar os produtos da amplificação. O procedimento usual consiste em separar os produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose e quantificar os fragmentos de DNA. Esse procedimento é pouco reproduzível e consome muito tempo (GARCÍA-CANÁS, CIFUENTES & GONZÁLEZ, 2004).

PCR em Tempo Real

A PCR em Tempo Real, utilizada e indicada pelo *Joint Research Center* (JRC), é uma técnica extremamente precisa e menos trabalhosa que a PCR competitiva. Ao contrário dessa, que quantifica nos ciclos finais da PCR, a PCR em Tempo Real monitora a reação ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A fluorescência é originada durante a hibridização do DNA alvo com sondas ou iniciadores marcados com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Pelo registro de sinal fluorescente em cada ciclo, é possível monitorar a reação de PCR durante a fase exponencial e o primeiro aumento significativo de fluorescência corresponde à quantidade inicial de cópias de DNA alvo. Nesta fase, é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência em que todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado *threshold* e é calculado em função da fluorescência basal (*background*). A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido como *cycle threshold* (Ct). O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA alvo (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006; MARCELINO, 2006; BRANQUINHO, 2010).

3.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

3.2.1 PRINCIPAIS DOCUMENTOS ORIENTATIVOS

Antes de qualquer método analítico ser aplicado para testar amostras de rotina, este deve ser validado, portanto suas características de desempenho devem ser definidas e devidamente avaliadas. A ISO/IEC 17025 descreve a importância da validação de método e sua aplicação em laboratórios de análise. Esta é a norma internacional que contém requisitos técnicos e de direção que devem ser atendidos pelos laboratórios de ensaio e calibração para implementação e manutenção de sistemas de gestão da qualidade. Nela é estabelecido que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados, métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Apesar de não tratar a necessidade de validação para métodos normalizados, na referida norma é definido que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005 a).

A validação pode ser definida como a confirmação da adequação de determinado método para o propósito de uso (*fitness for purpose*). Conforme a NBR ISO 9000:2005 (ABNT, 2005 b), validação é a comprovação, por fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (SOUZA, 2007).

A validação se aplica a um protocolo definido, para a determinação de um analito específico e num intervalo de concentrações em um tipo particular de material, usado para um propósito específico. Em geral, a validação deve verificar que o método é adequado para a finalidade proposta, englobando as concentrações de analito testadas e as matrizes para o qual ele é aplicado. Estas características, juntamente com uma declaração de critério de adequação ao uso, devem ser completamente especificados antes da validação ocorrer (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Estudos de validação podem ser estruturados em processos intra ou interlaboratoriais. Os estudos interlaboratoriais envolvem a análise de uma mesma amostra (ou amostras idênticas), pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para determinar os parâmetros de desempenho de um método. Estes estudos incluem medidas em condições de repetitividade e reprodutibilidade (HORWITZ, 1995; EC, 2002). Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (EC, 2002). Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo. As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos devido à sua flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novos métodos (VAN DER VOET *et al.*, 1999). Procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes organismos oficiais têm proposto protocolos para este tipo de validação (SOUZA, 2007).

Segundo o trabalho de revisão publicado por GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA (2011), ações devem ser tomadas no sentido de desenvolver, implementar e harmonizar estratégias para garantia da qualidade de provas binárias, frente às tendências atuais em validação de métodos qualitativos. Existem vários documentos que podem ser utilizados como referência na elaboração de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos, contudo, ainda não há uniformidade sobre quais características devam ser determinadas no processo de validação. O documento orientativo DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (INMETRO, 2010) é a principal referência nacional. Importantes referências internacionais incluem o guia publicado pelo EURACHEM (EURACHEM, 1998) e o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International), *International Standards Organization* (ISO) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Ainda não existe um guia genérico harmonizado para a validação de métodos qualitativos, apesar de haver

uma iniciativa da IUPAC no desenvolvimento de um modelo para estudos interlaboratoriais (IUPAC, 2012).

Em relação à validação de métodos de análise de OGM em alimentos existem dois guias específicos publicados.

O documento *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO*, criado pelo *European Network of Genetically Modified Organism Laboratories* (ENGL, 2008) e acolhido pelo JRC, inclui recomendações para validação de métodos para análise de OGM pelo *European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed* (EURL-GMFF), que fornece o embasamento científico necessário para implementar a legislação de OGM no mercado europeu.

O guia do *Codex Alimentarius* (2010) *Guidelines on criteria for methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology* trata sobre os procedimentos necessários à validação métodos de detecção, identificação e quantificação de sequências específicas de DNA e de proteínas em alimentos obtidos por técnicas de biotecnologia, com distinção entre os quantitativos e qualitativos por PCR ou ELISA.

Na **Tabela 3** estão elencados os parâmetros de desempenho descritos nos principais guias, documentos orientativos e referências sobre validação de métodos qualitativos.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho propostos na literatura para validação de métodos qualitativos

Parâmetro	EURACHEM (1998)	THOMPSON, ELLISON & WOOD (2002)	TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS (2004)	CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005)	ELLISON & FEARN (2005)	INMETRO (2010)	CODEX ALIMENTARIUS (2010)
						Propriedades físicas	
Acordância e concordância	-	-	-	-	Sim	-	-
Adequação ao uso (<i>fitness for purpose</i>)	-	Sim	-	-	-	-	-
Confiabilidade ¹	-	-	-	Sim	Sim	-	-
Limite de detecção	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Rastreabilidade	-	-	-	Sim	-	-	-
Região de perda de confiabilidade	-	-	Sim	Sim	Sim	-	-
Representatividade	-	-	-	Sim	-	-	-
Robustez	-	Sim	Sim	Sim	-	Sim	Sim
Taxa de falso-negativo	Sim	-	Sim	Sim ⁵	Sim	-	Sim
Taxa de falso-positivo	Sim	-	Sim	Sim ⁵	Sim	-	Sim
Taxa de seletividade (especificidade)	Sim ²	Sim ³	Sim ⁴	Sim ⁵	Sim ⁶	Sim ³	-
Taxa de sensibilidade	-	-	Sim	Sim ⁵	Sim ⁶	-	-

1 Taxa de confiabilidade, eficiência, índice de Youden e taxa de verossimilhança em CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005) e ELLISON & FEARN (2005).

2 Confirmação de identidade e seletividade/especificidade no guia do EURACHEM (1998).

3 Seletividade no documento do INMETRO (2010) e AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

4 Taxa de especificidade em TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS (2004).

5 Falso-negativo, falso positivo, especificidade e sensibilidade em CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005).

6 Especificidade e sensibilidade em ELLISON & FEARN (2005).

Pode-se observar que em nenhum caso todos os parâmetros são considerados em uma única referência. Além disto, em muitos casos a terminologia adotada para designação dos parâmetros não apresenta-se de forma harmonizada, destacando-se o parâmetro seletividade, tratado na maioria das vezes como especificidade, apesar de haver uma recomendação da IUPAC para promoção do uso do primeiro em detrimento do segundo na área de química analítica (VESSMAN *et al.*, 2001). Tal recomendação é para que o termo seletividade seja promovido para expressar a extensão na qual um método em particular pode ser utilizado para determinar analitos, sob determinadas condições, na presença de outros componentes de comportamento similar. Enquanto a seletividade pode ser graduada, a especificidade não. Segundo a IUPAC, um método é ou não específico, sendo que poucos se houver algum, o são (VESSMAN *et al.*, 2001).

Segundo HÜBNER *et al.* (2001) a especificidade é definida como a capacidade de um método detectar uma substância ou uma classe de substâncias, sem interferência de outros componentes presentes na amostra, e identificar o analito de forma inequívoca. A seletividade é a capacidade de um método detectar componentes diferentes, em paralelo, sem interferência recíproca e identificar o analito inequivocadamente.

Considerando-se que os métodos para detecção de OGM em alimentos não são específicos para um determinado evento, mas sim determinam partes ou junções deste, as quais também podem estar presentes em eventos distintos daquele sob investigação, optou-se por seguir a recomendação da IUPAC no presente trabalho.

Para métodos qualitativos, nos documentos do INMETRO (2010) e EURACHEM (2008) são considerados os parâmetros seletividade e LD. Estudos de robustez são tratados no documento do INMETRO (2010), mas não no guia EURACHEM (1998). Nesse guia são mencionados estudos das taxas de falsos resultados para validação de métodos qualitativos (GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011).

No guia harmonizado pela AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002) não é feita distinção entre métodos qualitativos e quantitativos ao

apresentar os parâmetros de desempenho da validação. Contudo, a seletividade é tratada como um parâmetro essencialmente qualitativo e a aplicação dos parâmetros LD e robustez estão implícitos nas definições apresentadas (GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011).

Para validação de métodos qualitativos, no guia do *Codex Alimentarius* são abordados os parâmetros LD, TFP, TFN e robustez. No entanto, as atuais abordagens metrológicas para a validação de métodos qualitativos sinalizam para uma análise mais aprofundada na validação desses ensaios, visando à verificação da qualidade e confiabilidade das respostas binárias obtidas. Assim, além dos parâmetros previstos no guia, a literatura trata a necessidade de avaliação de outros parâmetros como: TCF - relacionada à veracidade, TSB - referente à sensibilidade, TST - correspondente à seletividade, RPC - associada à incerteza, ACO e CON - correspondentes à precisão, representatividade e rastreabilidade (GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011).

O estudo da TCF, taxas de falsos resultados e representatividade é importante, pois estes são atributos relacionados à qualidade dos resultados analíticos e estão também relacionados com a rastreabilidade e RPC. Já sensibilidade, seletividade, precisão e robustez são associadas ao processo analítico e considerados parâmetros base para os anteriores (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).

Especificamente para a PCR Multiplex, o estudo de efeitos competitivos é citado como um parâmetro necessário, embora na maioria das vezes omitido nos estudos de validação (BAHRDT *et al.*, 2010).

Portanto, em relação aos métodos qualitativos existe a necessidade de adequação do guia específico para validação de métodos para detecção de OGM em alimentos, publicado pelo CODEX ALIMENTARIUS (2010), no sentido de inclusão de estudos de parâmetros específicos e fundamentais para uma avaliação segura da adequação ao uso de provas binárias (RÍOS & TÉLLEZ, 2005; VALCÁRCEL & CÁRDENAS, 2005, GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011). No caso do documento do ENGL (2008) é necessária a inclusão de todas as figuras de

mérito para validação de métodos qualitativos, visto que não são apresentadas abordagens de validação para este tipo de método.

3.2.2 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO

Os métodos de ensaio podem ser classificados em métodos quantitativos e qualitativos. Métodos quantitativos são definidos como aqueles que determinam a quantidade de determinado analito numa amostra em valores numéricos de uma unidade de medida apropriada (EC, 2002; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). Métodos qualitativos, de acordo com a União Europeia, avaliam a presença ou ausência de um ou mais analitos em uma amostra devido às suas propriedades físicas, químicas ou biológicas (EC, 2002). Já a AOAC o define como um método de análise cuja resposta seja a presença ou ausência do analito, detectado direta ou indiretamente, na amostra (FELDSINE, ABEYTA & ANDREWS, 2002). Nas análises qualitativas, a resposta binária (sim/não) pode vir de um instrumento de medida, de *kits* de testes, que envolvem mudanças sensoriais, ou outros (EC, 2002; PULIDO *et al.*, 2003).

Na rotina dos laboratórios, inicia-se a análise com a determinação da presença de um ou mais analitos (métodos de triagem) e em seguida, estima-se o nível de concentração dos mesmos (métodos de confirmação e quantificação) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Assim, os métodos qualitativos têm sido empregados para triagens antes da confirmação e quantificação, devido a vantagens como redução do custo analítico, rapidez, simplicidade ou minimização de erros devido a atrasos entre a amostragem e a análise (VALCÁRCEL, CÁRDENAS & GALLEGO, 1999).

Na **Tabela 4** estão relacionados os parâmetros aplicáveis à validação de métodos quantitativos e respectivos parâmetros para a validação de métodos qualitativos.

Tabela 4. Parâmetros de desempenho estudados na validação de método qualitativos e respectivos parâmetros correspondentes na validação quantitativa.

Método Qualitativo	Método Quantitativo
Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de confiabilidade, rastreabilidade metrológica	Veracidade
Taxa de sensibilidade	Sensibilidade
Taxa de seletividade/Confirmação de identidade	Seletividade
Região de perda de confiabilidade	Incerteza
Limite de detecção	Limites
Robustez	Robustez
Acordância e Concordância	Precisão

Fonte: GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA (2011).

Para avaliação das taxas, indica-se o uso de fórmulas baseadas nas tabelas de contingência e no Teorema de Bayes. Na estimativa da RPC e do LD a construção da curva de desempenho é a mais indicada (TRULLOLS, RUISANCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005). No caso da precisão, que nos métodos qualitativos é representada pelos parâmetros ACO e CON, a estimativa é realizada com cálculos baseados nas teorias de probabilidade e análise combinatória (LANGTONN *et al.*, 2002; ELLISON & FEARN, 2005).

Os estudos complementares de seletividade devem envolver ensaios com padrões ou amostras de referência, amostras com e sem o analito (EURACHEM, 1998; EC, 2002; INMETRO, 2010) uma vez que a presença de interferentes pode inibir ou acentuar a detecção do analito de interesse. A alteração nas taxas de falsos resultados e na TCF indica o efeito do interferente na detecção do analito (ELLISON, 2000).

Para avaliar a robustez é indica-se a realização de experimentos fatoriais (AGUILERA *et al.*, 2006), também com amostras adicionadas em nível de 100 % de confiabilidade. Assim como no estudo complementar de seletividade, a análise dos dados do estudo de robustez é realizada pela avaliação da alteração na TCF.

3.2.2.1 Taxas de falsos resultados, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade

Em métodos qualitativos as TFP e TFN são determinadas. A TFP é a probabilidade de se obter um resultado positivo, uma vez que o analito não está presente na amostra (ou do método avaliado responder positivamente a um método de referência). A TFN é a probabilidade de obtenção de um resultado negativo quando a substância está presente na amostra (ou do método avaliado responder negativamente a um método de referência) (FELDSINE, ABEYTA & ANDREWS, 2002; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Assim, TFP é definida como a razão entre o número de resultados falso-positivos (FP) e a soma desse com o número de resultados negativos corretos ou número total de negativos conhecidos (TN), multiplicada por 100 (**Eq.1**) e TFN é a razão entre o número de resultados falso-negativos (FN) e a soma desse com o número de resultados positivos corretos ou número total de positivos conhecidos (TP), multiplicada por 100 (**Eq.2**) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; TRULLOLS *et al.*, 2005).

$$TFP = \frac{FP}{FP + TN} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$$TFN = \frac{FN}{FN + TP} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

A confiabilidade da informação analítica é um dos principais objetivos da química analítica. Isto significa assegurar a coerência entre as informações químicas obtidas pelo laboratório com as exigidas pelo cliente no contexto do problema analítico (RÍOS & TELLEZ, 2005). A TCF de um método qualitativo é definida pela proporção de resultados corretos (positivos ou negativos) em uma bateria de testes independentes. Trata-se de um parâmetro positivo, que engloba os erros nas medições qualitativas (TFP e TFN), dado pela equação:

$$TCF = 100 - TFP - TFN \quad \text{Eq. 3}$$

A confiabilidade é uma propriedade principal dos testes qualitativos, podendo ser comparada à veracidade dos métodos quantitativos (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).

As TSB e TST são parâmetros de desempenho de métodos qualitativos, intimamente relacionados com as taxas de falsos resultados. Em métodos quantitativos a sensibilidade, ou, poder do teste, corresponde à habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas, enquanto que em métodos qualitativos, a TSB corresponde à probabilidade de um método classificar como positiva uma amostra sabidamente positiva (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005). O poder do teste é também definido como $1-\beta$, em que β representa a probabilidade de se obter resultados falso-negativos (PULIDO *et al.*, 2003).

Analogamente, a seletividade consiste na habilidade em detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas, e a TST é a probabilidade de classificar como negativa uma amostra sabidamente negativa (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; ELLISON & FEARN, 2005). Em testes de hipóteses estatísticos (1-seletividade) é relacionada ao nível de significância α , o qual representa a probabilidade de se obter resultados falso-positivos (PULIDO *et al.*, 2003).

Seletividade é a base essencial para a confiabilidade; quanto maior a seletividade, melhor a certeza da identidade e qualificação da amostra (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).

Assim, a TSB é definida como a razão entre a soma do TP com FN, multiplicada por 100 (**Eq. 4**), enquanto a TST pode ser definida como a razão entre a soma do TN com FP, multiplicada por 100 (**Eq. 5**) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005):

$$TSB = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

$$TST = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Tabelas de contingência

As tabelas de contingência se baseiam no cálculo de probabilidades. A tabela mais simples e mais comumente utilizada é a 2x2 que utiliza dois resultados possíveis: positivo (igual ou maior que um valor especificado) ou negativo (menor que um valor especificado), como apresentado na **Tabela 5** (PULIDO *et al.*, 2003). Estas tabelas são usadas na determinação das taxas de falsos resultados, TST, TSB e TCF para cada nível de concentração estudado (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Tabela 5. Tabela de contingência 2 x 2 utilizada para cálculo das taxas de falsos resultados, de seletividade, de sensibilidade e de confiabilidade

Resultado do teste	Analito Presente	Analito Ausente	Total
Positivo	TP	FP	TP+FP
Negativo	FN	TN	FN+TN
Total	TP+FN	FP+TN	N

FP = quantidade de resultados falso-positivos; FN = quantidade de resultados falso-negativos; TP = quantidade de resultados positivos corretos; TN = quantidade de resultados negativos corretos; N = TP+FP+FN+TN.

Fonte: GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA (2011).

As tabelas de contingência são muito utilizadas para avaliar a confiabilidade dos testes de triagem e na comparação entre diferentes ensaios, e baseia-se na sensibilidade e seletividade, quando aplicadas às mesmas amostras. As diferenças na sensibilidade e seletividade dos testes pode ser resultado do acaso, já que a diferença entre os resultados e situações reais está sujeita a erros aleatórios, especialmente quando se tem um número de amostras pequeno. De acordo com o objetivo da análise, é preferível que o método seja mais sensível que seletivo, ou vice-versa. Em geral, um aumento na sensibilidade ocasiona um decréscimo na seletividade. Assim, quanto maior o número de amostras, mais informação possuirá

a tabela de contingência e, conseqüentemente, maior será a confiabilidade desses parâmetros (PULIDO *et al.*, 2003).

Uma vantagem muito importante das tabelas de contingência é que elas podem ser facilmente aplicáveis em muitos tipos de bioensaios como imunológicos, microbiológicos, clínicos e bioquímicos. Neste contexto, alguns termos e definições têm significados diferentes dos termos utilizados em química analítica (por exemplo, sensibilidade e especificidade), podendo causar confusão na sua terminologia. Apesar das tabelas de contingência indicarem o desempenho geral do ensaio, elas não podem estimar a probabilidade de erro de uma amostra. Outra desvantagem é que seu desempenho depende do tamanho da amostra e do delineamento experimental utilizado para construí-la (PULIDO *et al.*, 2003).

3.2.2.2 Limite de detecção e região de perda de confiabilidade

Na análise qualitativa, devido à obtenção de respostas binárias, não há um número associado ao resultado, como na análise quantitativa. Assim, a incerteza é expressa não como um valor numérico, mas como a região de probabilidade de se cometer erros ou a região em que falsas respostas são obtidas (ou falso-positivos ou falso-negativos) (PULIDO *et al.*, 2003; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; RÍOS & TELLEZ, 2005).

Por isso, alguns autores preferem chamá-la de RPC ao invés de uma região de incerteza (RÍOS *et al.*, 2003). Esta região é definida por um limite superior e inferior de concentração, entre os quais o método pode fornecer respostas falsas, como representado na **Figura 8**. Como essas respostas podem ser positivas ou negativas, os limites superior e inferior que definem essa região dependem da probabilidade de se obter estas respostas falsas, que é fixado pelo analista (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

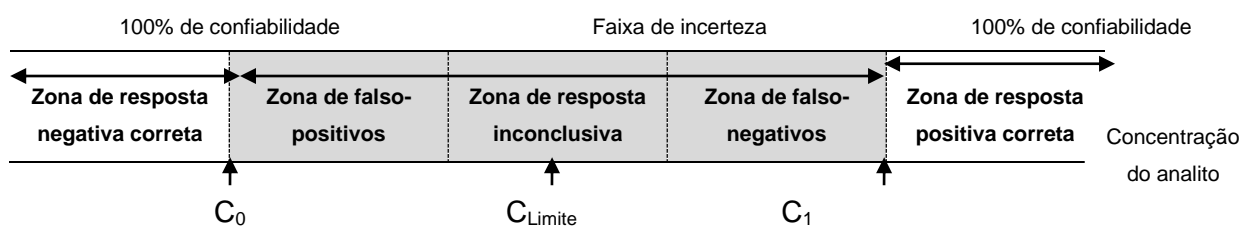


Figura 8. Representação esquemática da região de perda de confiabilidade de métodos qualitativos.

Adaptado de CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005).

O LD, conforme definido para análises quantitativas, pode ser calculado quando a resposta é um valor numérico, sendo consideradas duas probabilidades de erro α e β . A probabilidade de se cometer um erro do tipo I ou erro α , é rejeitar H_0 (hipótese nula) quando H_0 é verdadeira (mede a taxa dos falso-positivos) e o erro β é a probabilidade de se cometer um erro do tipo II, de não rejeitar H_0 quando H_0 é falsa (mede a taxa de falso-negativos) (CURRIE, 1995). Porém, quando a resposta é binária, o desvio padrão de amostras brancas não pode ser calculado e as probabilidades de erro não podem ser consideradas ao mesmo tempo. O LD pode ser definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada, confiavelmente como positiva, numa dada matriz. Isto implica em considerar somente o erro tipo II, usualmente de 5 %. Esta definição é apresentada no contexto de verificação de um nível máximo de concentração permitido, mas se for extrapolado a determinação de uma concentração mínima permitida, a probabilidade de erro tipo I, deve ser considerada também a 5 %. Como as duas probabilidades de erro não podem ser consideradas simultaneamente, no primeiro caso o limite de detecção coincidirá com o limite superior da região de perda de confiabilidade, na qual a taxa de sensibilidade é de 95 % e, no segundo caso, ele coincidirá com o menor limite da região de perda de confiabilidade (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

Várias referências quantitativas estão envolvidas nos resultados de métodos qualitativos: o LD, que é uma característica intrínseca do método de ensaio, o limite de tolerância imposto pela legislação ou pelo cliente, e, o limite de corte (*cut-off*)

imposto pelo laboratório para garantir a confiabilidade da resposta binária com relação ao limite de tolerância (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).

O limite de corte define as regiões em que respostas verdadeiramente positivas ou negativas são obtidas. Além disso, os limites que definem a região onde os resultados das amostras inconclusivas são obtidos dependem do erro associado a este limite. Informações significativas sobre o desempenho do teste podem ser inferidas a partir do limite de corte (TRULLOLS *et al.*, 2005).

Curvas de desempenho

As curvas de desempenho são obtidas pela construção de um gráfico de probabilidade em função da concentração. Em uma situação ideal, em que x representa a concentração verdadeira, $P(x)$ a taxa de resultados positivos e $N(x)$ a taxa de resultados negativos, para uma determinada concentração de referência C ($x = C$), os possíveis resultados obtidos em um método binário são: i) não (resultados negativos), quando $x < C$, com $P(x) = 0\%$ e $N(x) = 100\%$; e ii) sim (resultados positivos), quando $x > C$, com $P(x) = 100\%$ e $N(x) = 0\%$ (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).

No entanto, em situações reais, em concentrações próximas a C ($C_0 < C < C_1$), $P(x)$ e $N(x)$ apresentam valores entre 0% e 100% . A faixa de concentração que inclui esses valores intermediários é a RPC. Assim, nesta região, são obtidas as taxas de falso-positivos ($C_0 < x < C$) e as taxas de falso-negativos ($C < x < C_1$). Para amostras contendo $x < C_0$ e $x > C_1$, são obtidos resultados negativos e positivos, respectivamente, com 100% de confiabilidade (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).

Na **Figura 9**, estão ilustradas curvas de desempenho para a situação ideal e para uma situação real genérica, em que $\alpha = \beta = 0,05$. Na curva de desempenho real, o LD pode ser estabelecido em função de α ou de β no intervalo da RPC que, por sua vez, é determinada pela região de maior inclinação da curva, ou seja, pelo intervalo entre os níveis nos quais a probabilidade de resultados positivos deixa de ser 0% e 100% (EURACHEM, 1998; PULIDO *et al.*, 2003; SIMONET, RÍOS &

VALCÁRCEL, 2004; TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Assim, os limites C_0 e C_1 , que definem a RPC, podem ser determinados pelo cálculo das concentrações do analito que produzem 5 % de probabilidade de obtenção de falso-positivos e 95 % de resultados positivos corretos (o que corresponde a 5 % de probabilidade de obtenção de falso-negativos) (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).

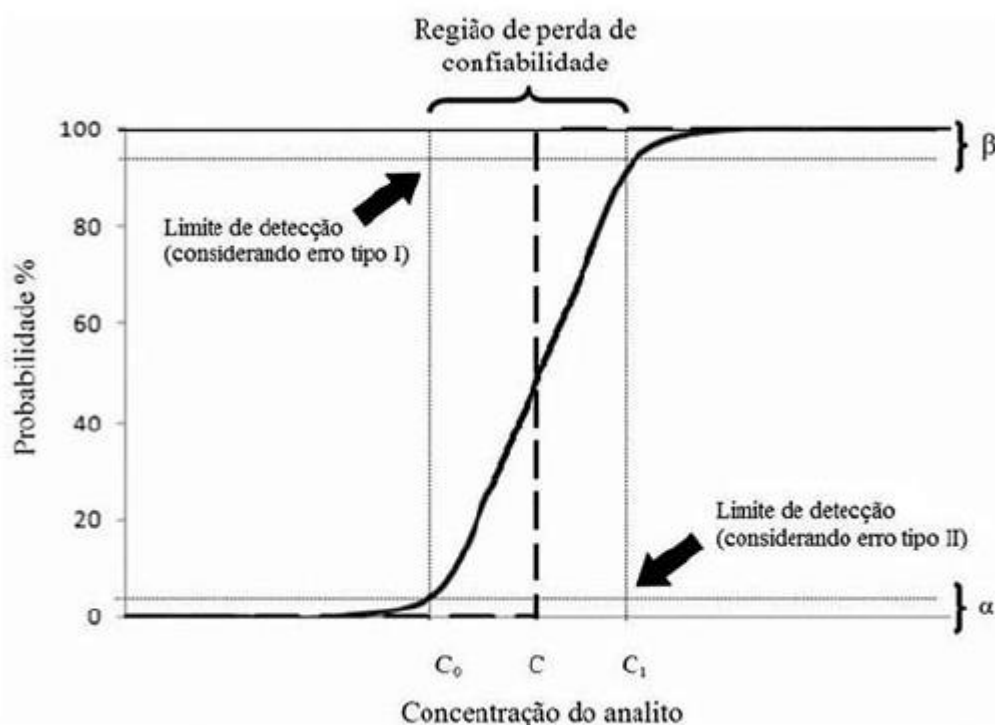


Figura 9. Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade e limites relacionados.

Fonte: GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA (2011).

A principal desvantagem das curvas de desempenho é a necessidade de realizar análises em replicatas, o que traz consequências negativas, como aumento do tempo e custo do processo (PULIDO *et al.*, 2003). Contudo, foi observado por ELLISON & FEARN (2005) que o estudo de um grande número de níveis com poucas repetições por nível, em vez de poucos níveis com muitas repetições, fornece estimativas de probabilidades relativamente confiáveis, o que pode ser considerada uma grande vantagem sob o ponto de vista prático.

Este procedimento é bastante usado quando não há muito conhecimento sobre a precisão do método de triagem utilizado, por exemplo, no caso de um método analítico recém-implantado em um laboratório (PULIDO *et al.*, 2003).

Cálculo da RPC

Após a construção da curva de desempenho (Fig. 8), a RPC pode ser estimada assumindo a região de maior inclinação da curva como linear (SONG, SCHLECHT & ASHLEY, 2001) conforme proposto por SOUZA & JUNQUEIRA (2005) ou fazendo a regressão logística não linear. Segundo GONDIM (2012), equações sigmóides devem ser testadas, como as descritas na **Tabela 6**. A significância do coeficiente de determinação (**Equação 9**) e o perfil não tendencioso do gráfico de resíduos (**Equação 10**), após tratamento de *outliers* (valores dispersos) pelo teste de *Jackknife*, são os critérios sugeridos para escolha do modelo (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Tabela 6. Tipos de funções sigmóides utilizadas na regressão logística não linear para construção da curva de desempenho e estimativa da região de perda de confiabilidade e do limite de detecção

Nome	Equação	Parâmetros	Referência
Logito	$p = \frac{a}{1 + b \cdot \exp(-cx)} \text{ Eq. 6}$	p = porcentagem de resultados positivos;	FITZHUGH (1976)
Probit	$p = \frac{\exp(a + bx)}{1 + \exp(a + bx)} \times 100 \text{ Eq. 7}$	x = concentração do analito;	ELLISON & FEARN (2005)
Gompertz	$p = a \cdot \exp(-\exp(b - cx)) \text{ Eq. 8}$	a, b e c = coeficientes da função	FITZHUGH (1976)

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Eq. 9}$$

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Eq. 10}$$

Sendo \hat{y}_i a variável dependente estimada pela regressão, y_i a resposta medida e \bar{y} a média das respostas medidas. Em qualquer uma das opções utilizadas, a RPC e o LD do método qualitativo podem ser calculados, definindo-se as probabilidades de erro α (tipo I) e β (tipo II) (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004). Os parâmetros RPC e LD serão considerados adequados aos propósitos de uso do método, se os mesmos estiverem abaixo do nível no qual se espera encontrar o analito.

3.2.2.3 Robustez

Robustez é uma propriedade básica analítica de um método qualitativo, que descreve a resistência de alteração da resposta quando aplicado às alíquotas individuais de uma mesma amostra sob condições experimentais previamente selecionadas e ligeiramente diferentes que acarretam alterações na confiabilidade e nas taxas de falsos resultados. Desse modo, a robustez deve ser determinada em diferentes níveis de concentração do analito para cada um dos analitos considerados (RÍOS *et al.*, 2003; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).

3.2.2.4 Rastreabilidade metrológica

A rastreabilidade metrológica reflete uma propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estando relacionada com referências estabelecidas, geralmente padrões nacionais ou internacionais, através de uma

cadeia ininterrupta de calibrações de um sistema de medição ou comparações, todas com incertezas declaradas (VALCÁRCEL & RÍOS, 1997).

Referências químicas são os elementos-chave para garantir a rastreabilidade de resultados qualitativos. Assim, padrões químicos puros são usados como referências servindo como base de comparação para compostos desconhecidos da amostra (RÍOS & TELLEZ, 2005). A rastreabilidade também pode ser obtida comparando os resultados obtidos pelo método em validação com aqueles obtidos por um método de referência ou pelo uso de MRC (TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).

3.2.2.5 Acordância e concordância

Dois outros parâmetros são muito importantes nas validações de métodos qualitativos, quando estruturados em processos interlaboratoriais: a ACO e CON, que correspondem, respectivamente, aos conceitos de precisão sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade. A repetitividade fornece uma medida da variabilidade entre as análises realizadas em materiais de teste idênticos pelo mesmo técnico do mesmo laboratório, em condições tão semelhantes quanto possíveis, enquanto que a reprodutibilidade mede a variabilidade quando as análises são realizadas por técnicos diferentes em diferentes laboratórios (LANGTONN *et al.*, 2002).

ACO é a probabilidade de obter, para duas amostras idênticas, testadas no mesmo laboratório sob condições de repetitividade, o mesmo resultado. A soma da quantidade de combinações de pares obtida pelo número de resultados positivos com a quantidade de combinações de pares obtida pelo número de resultados negativos dividida pela quantidade de combinações de pares, que podem ser formados pelo total de análises realizadas, fornece a probabilidade de cada laboratório ou de cada bateria analítica, ou seja, a ACO. De uma maneira mais simples, a ACO pode ser calculada pela **Equação 11**:

$$ACO = \frac{\{k(k - 1) + (n - k)(n - k - 1)\}}{n(n - 1)} \quad \text{Eq. 11}$$

Sendo n o total de resultados obtidos pelo laboratório ou bateria analítica e k o número de resultados positivos obtidos pelo laboratório ou bateria analítica.

CON é a probabilidade de obter, para duas amostras idênticas, testadas em laboratórios diferentes, sob condições de reprodutibilidade, o mesmo resultado. Esse parâmetro é estimado pelas proporções correspondentes de pares de resultados de dados concordantes (ELLISON & FEARN, 2005). A CON pode ser calculada de modo intuitivo enumerando-se as associações de resultados concordantes positivos e negativos de cada laboratório ou bateria analítica com os demais resultados do conjunto. A CON será então o resultado da divisão entre a soma de associações de resultados concordantes positivos e negativos de todos os laboratórios ou baterias e a soma das associações de resultados dos laboratórios ou baterias. De modo simplificado, a CON pode ser calculada pela **Equação 12**:

$$CON = \frac{2[k(k - nb)] + nb(nb - 1) - ACO_m[nb(n - 1)]}{n^2b(b - 1)} \quad \text{Eq. 12}$$

Sendo b o número de laboratórios ou baterias analíticas e ACO_m a acórdância média dos laboratórios (LANGTONN *et al.*, 2002).

Na avaliação da ACO e CON, valores iguais a 1 são considerados aceitáveis nas faixas de concentração do analito em que o método apresenta 100 % de confiabilidade. Além disso, a tendência do perfil dos resultados de ACO em função da concentração do analito, numa mesma bateria analítica, é de declínio dos valores de ACO até um valor intermediário da RPC e, a partir desse ponto, de aumento nos valores de ACO até o valor máximo de 1,0. Outro aspecto a ser observado na avaliação dos resultados desses parâmetros é que na RPC, os valores de ACO e CON variam e tendem a ser menores na porção média da região (ELLISON & FEARN, 2005).

3.2.2.6 Representatividade

Em um delineamento experimental para a validação de métodos qualitativos é de grande importância a realização de um número significativo de análises aleatórias

para avaliar os parâmetros do método. Isso é necessário para obtenção de valores dos parâmetros de validação com níveis de confiança semelhantes aos resultados de métodos quantitativos (GOWIK, 2009), uma vez que um resultado qualitativo fornece muito menos informações que um resultado quantitativo, independente do método estatístico empregado (SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; GOWIK, 2009). Como para os métodos quantitativos, a independência deve ser assegurada pela análise aleatória das amostras (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005).

Na validação de métodos qualitativos, a representatividade torna-se um componente fundamental para assegurar a qualidade das respostas binárias. Uma resposta 100 % confiável, mas não representativa das amostras teste, indica um resultado inadequado em relação à qualidade do método. Estratégias adequadas de amostragem e a correta aplicação do protocolo de amostragem são as bases para a representatividade (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). A escolha das amostras deve fornecer estimativas de sensibilidade e seletividade, numa dada faixa de concentração, implicando em um delineamento que empregue amostras numa faixa representativa de concentrações e, pelo menos, um branco, além de alguns itens com interferentes. As replicatas também são essenciais na avaliação de métodos qualitativos, para que seja possível estimar as frequências (ELLISON & FEARN, 2005).

3.2.3 LEVANTAMENTO DE ESTUDOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE SOJA GM EM ALIMENTOS

Em 2011, o JRC publicou um compêndio de métodos de referência qualitativos e quantitativos validados para análise de OGM (JRC, 2011). Nesta publicação foram definidos os principais parâmetros de desempenho de validação, tendo como referências os documentos do ENGL (2008) e do *Codex Alimentarius* (2010), além do documento da IUPAC (HORWITZ, 1995) para validações interlaboratoriais.

Na **Tabela 7** estão relacionadas publicações sobre validação de métodos qualitativos para a detecção de soja RR[®] em soja e produtos de soja, incluindo aquelas relacionadas no compêndio do JRC. Dentre os estudos, predominaram processos interlaboratoriais em detrimento dos intralaboratoriais e a técnica de PCR Convencional em relação à PCR em Tempo Real.

Tabela 7. Estudos de validação de métodos qualitativos para detecção de soja *Roundup Ready*® em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase.

Matriz	Sequência alvo	Tipo de validação	Técnica analítica	Parâmetros de desempenho avaliados	Uso de MRC	Referência
Derivados de soja	Promotor CaMV 35S, gene CTP e gene CP4 EPSPS/gene da lectina	Intralaboratorial	PCR convencional e <i>Nested</i> PCR	Especificidade, limite de detecção e sensibilidade	NÃO	MEYER & JACCAUD, 1997
Grãos de soja	Promotor CaMV 35S e terminador T-NOS/gene da lectina	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, limite de detecção, sensibilidade e taxas de falsos resultados	SIM (IRMM)	LIPP <i>et al.</i> , 1999
Misturas e alimentos processados contendo ingredientes derivados de soja (soja acidificada, fórmula infantil e biscoito)	Promotor CaMV 35S e terminador T-NOS	Interlaboratorial	PCR convencional	Taxas de falso-resultado e sensibilidade	NÃO	LIPP <i>et al.</i> , 2001
Soja, misturas de soja, trigo e preparado para biscoito com soja RR® e produtos processados derivados de soja adquiridos do comércio (tofu, óleo de soja, bebidas de soja, croquete de camarão, pão, biscoito com chocolate e ração para bovino)	Promotor CaMV 35S e terminador T-NOS/gene da lectina	Intralaboratorial	PCR convencional	Limite de detecção e sensibilidade	SIM (IRMM)	TAVERNIERS <i>et al.</i> , 2001

continua

Tabela 7. Estudos de validação de métodos qualitativos para detecção de soja *Roundup Ready*® em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase (continuação).

Matriz	Sequência alvo	Tipo de validação	Técnica analítica	Parâmetros de desempenho avaliados	Uso de MRC	Referência
Soja RR® e não GM	Promotor CaMV 35S e gene CP4 EPSPS/gene da lectina	Interlaboratorial	PCR em Tempo Real Multiplex acoplado a microensaio de hibridização direta dos amplicons (DualChip® GMO)	Especificidade, limite de detecção, robustez, sensibilidade, taxas de falso-resultado	SIM (IRMM)	LEIMANIS <i>et al.</i> , 2008
Soja em pó, grãos de soja e salsicha	Promotor CaMV 35S, gene CP4 EPSPS e terminador T-NOS/gene da lectina	Intralaboratorial	PCR convencional	Limite de detecção e sensibilidade	SIM (Fluka)	MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS, 2008
Soja e farelo de soja	Promotor CaMV 35S, terminador T-NOS e gene de construção específica RR®/gene da lectina	Intralaboratorial	PCR convencional	Aplicabilidade, especificidade, limite de detecção, robustez, seletividade ¹ e sensibilidade	SIM	SIERADZKI, MAZUR & KWIA TEK, 2008
Alimentos, rações, sementes e DNA	Promotor CaMV 35S e terminador T-NOS	Intralaboratorial	PCR em Tempo Real Hexaplex (TaqMan®)	Efeitos competitivos ² , especificidade, estabilidade, limite de detecção, confiabilidade, robustez e sensibilidade	SIM (IRMM)	BAHRDT <i>et al.</i> , 2010
Biscoito de soja	Promotor CaMV 35S	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultado	NÃO	JRC, 2011
Grãos de soja	Promotor CaMV 35S/gene da lectina	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultado	SIM (IRMM 410)	JRC, 2011

continua

Tabela 7. Estudos de validação de métodos qualitativos para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase (continuação).

Matriz	Sequência alvo	Tipo de validação	Técnica analítica	Parâmetros de desempenho avaliados	Uso de MRC	Referência
Soja	Terminador T-NOS/gene da lectina	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultado	SIM (IRMM 410)	JRC, 2011
Biscoitos de soja e milho	Terminador T-NOS	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultado	NÃO	JRC, 2011
Soja	Junção entre CaMV 35S e CTP/gene da lectina	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultado	SIM (IRMM 410)	JRC, 2011
Farinha de soja	Junção entre CaMV 35S e CTP/gene da lectina	Interlaboratorial	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultado	SIM (Fluka)	JRC, 2011
Sementes de soja	Gene de construção específica RR [®] /gene da lectina	Interlaboratorial	PCR convencional	Acordância, concordância, especificidade, limite de detecção, sensibilidade, taxas de falso-resultado	NÃO	KODAMA <i>et al.</i> , 2011
Farinha de soja	Promotor CaMV 35S, terminador T-NOS e gene CP4 EPSPS/gene da lectina	Intralaboratorial	PCR em Tempo Real	Especificidade, extração e purificação do DNA, limite de detecção e sensibilidade	NÃO	MANO <i>et al.</i> , 2012

Todos os parâmetros de desempenho para os quais tenham sido apresentados materiais e métodos e resultados foram relacionados nesta tabela, independentemente da declaração do estudo do parâmetro pelos autores.

CaMV 35S: promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor; CP4 EPSPS: CP4 5-enol-piruvato-chiquimato-3-fosfato sintase; CTP: peptídeo de trânsito para o cloroplasto; DNA: ácido desoxirribonucléico; GM: geneticamente modificado; IRMM: *Institute for Reference Materials and Measurements*; MRC: material de referência certificado; PCR: reação em cadeia da polimerase; RR[®]: *Roundup Ready*[®]; T-NOS: terminador do gene nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens*.

1 Parâmetros seletividade e especificidade tratados separadamente.

2 Parâmetro não previsto nos guias específicos, mas tratado na literatura como fundamental para validações de métodos por PCR Multiplex.

De acordo com a **Figura 10**, os parâmetros mais frequentemente avaliados nas validações qualitativas foram TSB e TST, que foram considerados, respectivamente, em 100 e 81 % dos trabalhos elencados neste levantamento. As taxas de falsos resultados, rastreabilidade e LD foram investigadas, respectivamente, em 63, 56 e 56 % das publicações sobre validação de métodos para detecção de soja RR[®] em produtos de soja por PCR. Os parâmetros menos frequentes foram robustez (19 %), TCF (6 %), ACO, CON (6 %) e representatividade (6 %). O mínimo considerado nos documentos do EURACHEM (1998), PULIDO *et al.* (2003) e RÍOS *et al.* (2003) para um estudo representativo é de 5 níveis e 10 replicatas por nível. Cumpre considerar que outras referências relativas à validação de métodos qualitativos como SIMONET *et al.* (2004) e CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005) indicam 30 replicatas por nível como um mínimo necessário. Além disto, o parâmetro que representa a incerteza de medição em métodos qualitativos, região de perda de confiabilidade, não foi estimado nos trabalhos relacionados.

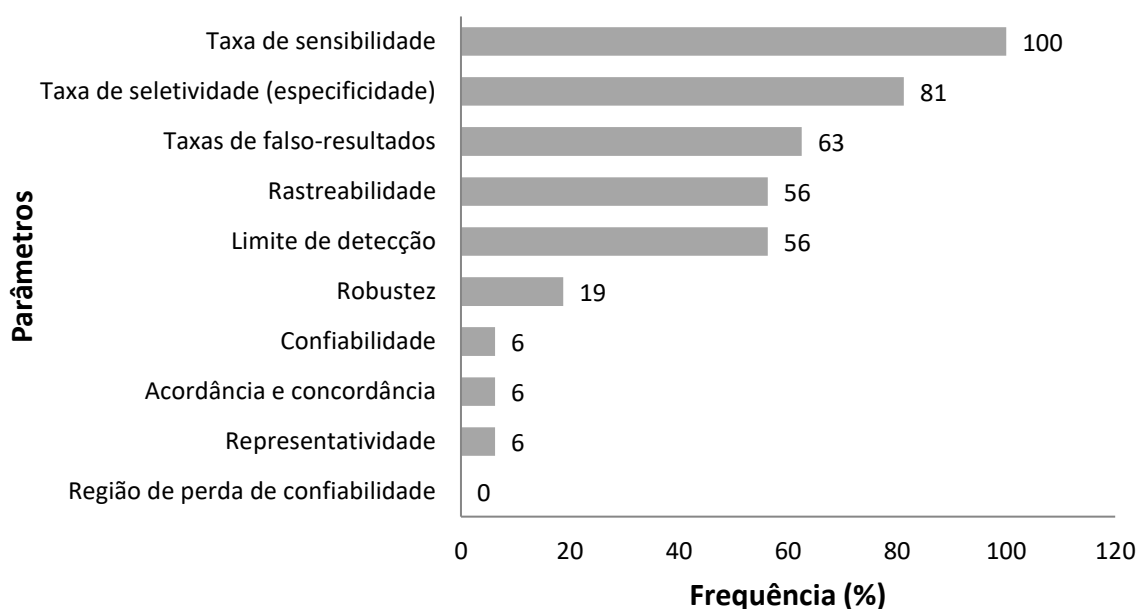


Figura 10. Frequência dos parâmetros de desempenho estudados nas validações de métodos qualitativos avaliados para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase.

Mesmo após a publicação do guia do *Codex Alimentarius* (2010), a maioria dos estudos de validação não abordou os parâmetros recomendados nestes documentos.

4.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Serviço de Ciências Bioquímicas, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

4.1. EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos (IKA MS1 Minishaker).
- Agitador magnético (IKA RET Basic).
- Autoclave qualificada pela empresa CMA Calibração (Baumer B523).
- Balança analítica com resolução 0,0001 g e capacidade máxima de 210,0000 g, calibrada por laboratório acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0183 (Quimis Q500L210C).
- Balança analítica com resolução 0,1 g e capacidade máxima de 1510,0 g, calibrada por laboratório acreditado CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0183 (Mettler Toledo PB1501).
- Banho-maria termostático com resolução 0,1 °C e temperatura máxima de 150,0 °C, qualificado pela empresa Medição (Jouan NT30), monitorado por termômetro externo calibrado.
- Cabine de proteção biológica nível 2, certificada pela empresa Vista Validação (Veco FL-9590).
- Centrífugas com resolução de 10 rpm e rotação máxima de 14000 rpm, qualificadas pela empresa Medição (Micro Jouan A14 e Jouan BR41).
- Congeladores ajustados em temperaturas entre -26 e -18 °C (Electrolux e Consul), monitorados por termômetros externos calibrados.
- Cuba de eletroforese (Life Technologies Horizon 2025).
- Fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen).
- Máquina de gelo (Everest).
- Micropipetas de 0,5 a 10 µL, 2 a 20 µL, 5 a 50 µL, 10 a 100 µL, 20 a 200 µL e 100 a 1000 µL, calibradas por laboratório acreditado CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0183 (Capp, Gilson e Discovery).

- Moinho para amostras em grãos (Marconi MA-090CF com peneira de 20/30 mesh e crivo circular).
- pHmetro resolução 0,1 pH e pH máximo 14, qualificado pela empresa Medição, (Digimed DM20).
- Purificador para água ultrapura qualificado pela Millipore Corporation (MilliQ Synthesis Ellix5).
- Refrigerador ajustado em temperaturas entre 2 e 10 °C (Electrolux), monitorado por termômetro externo calibrado.
- Sistema de fotodocumentação digital (câmera Kodak DC120 e software 1D *Image Analysis Software*).
- Termociclador qualificado pela empresa Vista Validação (*Eppendorf Mastercycler Gradient*).
- Termociclador qualificado pela empresa Vista Validação (*Eppendorf Mastercycler EP Realplex*).
- Termo higrômetro de máxima e mínima com resolução de 0,1 °C e faixa de temperatura -50 a 70 °C, calibrado por laboratório acreditado CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 065 (INCOTERM).
- Termômetro de máxima e mínima com resolução de 0,5 °C e temperatura máxima de 210 °C calibrado por laboratório acreditado CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 065 (INCOTERM L-144/05).
- Transiluminador de luz UV (Life Technologies TFX-20M).

4.2. MATERIAIS

- Balões volumétricos de vidro de 500 e 1000 mL.
- Barras magnéticas.
- Bastões de vidro.
- Béqueres de vidro de 100, 500 e 1000 mL.
- Espátulas.
- Etiquetas / caneta para marcação.
- Frascos de vidro âmbar para armazenamento de soluções.
- Funil.

- Gaze.
- Grades para tubos.
- Microtubos tipo *ependorf* de 0,2 e 1,5 mL.
- Papel absorvente.
- Provetas de 10, 500, 1000 e 2000 mL.
- Recipiente para banho de gelo.
- Saco plástico para embalagem das amostras processadas.
- Tesoura.
- Tubos tipo Falcon de 15 mL.

4.3. REAGENTES, PADRÕES E OUTROS

Todos dos reagentes utilizados apresentaram grau de pureza apropriado.

- Ácido bórico para análise (p.a.) Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)
- Ácido clorídrico p.a. Quimex (South Hamlin, Midlothian, Illinois).
- Agarose para eletroforese em gel Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).
- Água ultrapura autoclavada Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda. (Belo Horizonte, MG, Brasil) e Millipore (Bedford, Massachusetts, USA).
- Álcool etílico 70 % e 80 °GL Merck (Darmstadt, Germany).
- Azul de bromofenol Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).
- Brometo de etídio (10 mg/mL) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).
- Cetiltrimetilamônio brometo (CTAB) p.a. Merck (Darmstadt, Germany).
- Cloreto de sódio p.a. Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Clorofórmio p.a. Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Deoxinucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP 100 mmol/L, Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ, USA).
- Enzima Proteinase K (20 mg/mL) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).
- Enzima RNase A (10 mg/mL) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

- Glicerol p.a. Gibco (Grand Island, NY, USA).
- Hidróxido de sódio p.a. Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Iniciadores (GMO 3, 4, 5, 7, 8 e 9) sintetizados na escala entre 200 e 250 nmol com rendimento na faixa de 15 OD, por purificação padrão (DST) Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, USA).
- Isopropanol p.a. Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- *Kit* de ensaio Qubit® dsDNA BR (reagente Qubit® dsDNA BR, tampão e padrões de DNA #1 e #2) Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- *Kit* de MRC de soja, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, nos níveis de concentrações de soja RR® de 0,1; 1,0; 10,0 % produzido pelo *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) (Europe Reference Material ERM-BF410 Fluka Biochemica 94162).
- *Kit* de soluções Taq (Enzima Taq polimerase, Tampão Taq Polimerase e Cloreto de magnésio) marcas A e B.
- Kit TaqMan® GMO soy 35S Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).
- Marcador de peso molecular de 123 pb (pares de base) Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- MRC de milho, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, concentração de milho Bt11 de 5 % produzido pelo IRMM (Europe Reference Material ERM-BF412f Fluka Biochemica amostras 1732 e 1238).
- MRC de milho, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, concentração de milho GA21 de 5 % produzido pelo IRMM (Europe Reference Material ERM-BF414f Fluka Biochemica amostras 0791 e 0799).
- MRC de milho, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, concentração de milho MON810 de 5 % produzido pelo IRMM (Europe Reference Material ERM-BF413f Fluka Biochemica amostra 4556).
- MRC de milho, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, concentração de milho NK603 de 5% produzido pelo IRMM (Europe Reference Material ERM-BF415f Fluka Biochemica amostra 0792).
- MRC de milho, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, concentração de milho TC1507 de

10 % produzido pelo IRMM (Europe Reference Material ERM-BF418d Fluka Biochemica amostra 0716).

- MRC de milho, na forma de pó seco adquirido em frascos de vidro âmbar, com aproximadamente 1 g, sob atmosfera de argônio, concentração de milho Bt176 de 2 % produzido pelo IRMM (Europe Reference Material ERM-BF411e Fluka Biochemica amostra 0652).

- Padrão DNA íntegro de bacteriófago lambda Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ, USA).

- Sal dissódico dihidratado do ácido etileno diamino tetracético (EDTA) p.a. Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

- Tris(hidroximetil)aminometano (Trizma) Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

- Xileno de cianol Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

4.4. SOLUÇÕES

2' deoxinucleotídeos 5' trifosfato 0,0025 mol/L: a solução foi preparada adicionando-se 5 μ L de deoxinucleotídeo dATP (0,100 mol/L), 5 μ L de deoxinucleotídeo dCTP (0,100 mol/L), 5 μ L de deoxinucleotídeo dGTP (0,100 mol/L), 5 μ L de deoxinucleotídeo dTTP (0,100 mol/L) e 180 μ L de água ultrapura. A solução foi acondicionada sob congelamento (-18 a -26 °C) até uso.

Ácido clorídrico 0,1 mol/L: foram medidos 250 mL de água ultrapura em uma proveta de 500 mL, que serão transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL. Foi medido 8,5 mL de ácido clorídrico em uma proveta de 10 mL que, em seguida, foi transferido para o balão contendo a água. O volume foi completado com água ultrapura para 1000 mL.

Brometo de etídio (0,5 μ g/mL): a solução inicial 10 mg/mL foi diluída para 10 μ g/mL. Foram usados 5 μ L para cada 100 mL de gel.

Cloreto de sódio 1,2 mol/L: 7,0 g de cloreto de sódio foram pesados em béquer, adicionados de cerca de 60 mL de água ultrapura e dissolvidos sob agitação em agitador magnético. O volume foi completado com água ultrapura para 100 mL.

Cloreto de sódio 3 mol/L: 17,5 g de cloreto de sódio foram pesados em béquer, adicionados de cerca de 60 mL de água ultrapura e dissolvidos sob agitação em agitador magnético. O volume foi completado com água ultrapura até 100 mL.

EDTA 0,5 mol/L: 18,6 g de EDTA foram pesados em béquer, adicionados de cerca 60 mL de água ultrapura e dissolvidos sob agitação em agitador magnético. O pH foi ajustado para 8 com solução de hidróxido de sódio 5 mol/L e o volume completado com água ultrapura até 100 mL.

Enzima Proteinase K 20 mg/mL: foram adicionados a 100 mg de Proteinase K 5 mL de água ultrapura e a solução foi homogeneizada.

Enzima RNase 10 mg/mL: foram adicionados a 10 mg de RNase 1 mL de água ultrapura e a solução foi homogeneizada.

Gel de agarose a 1 % e 2 % (m/v): 1,0 g e 2,0 g de agarose foram diluídos em 100 mL de tampão TBE 1 X.

Hidróxido de sódio 1 mol/L e 5 mol/L: foram pesados 20 g de hidróxido de sódio em béquer. Em banho de gelo, foi colocado um béquer de 500 mL com 200 mL de água ultrapura isenta de gás carbônico (recentemente fervida e resfriada a 25 °C) adicionando-se aos poucos o hidróxido de sódio. A solução foi homogeneizada até dissolução com bastão de vidro. A solução foi transferida para um frasco de plástico e deixada em repouso por 12 h. Depois de decantado, a solução clara foi transferida para outro frasco de plástico, com auxílio de um funil de plástico. A solução foi armazenada em temperatura ambiente e protegida do gás carbônico do ar. Para a solução de 5 mol/L foram utilizados 100 g de hidróxido de sódio.

Iniciadores: a concentração inicial depende do fabricante. Foi feita uma solução estoque de concentração de 200 $\mu\text{mol/L}$, diluindo com água ultrapura. Para as análises, esta solução foi diluída para 3 $\mu\text{mol/L}$.

Tampão de amostra 6X: 0,05 g de azul de bromofenol, 0,05 g de xileno de cianol e 6 mL de glicerol p.a foram adicionados em tubo tipo Falcon de 15 mL. O volume foi completado com 20 mL de água ultrapura.

Tampão de extração CTAB: foram adicionados 10 mL de tampão Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0, 46,6 mL de cloreto de sódio 3 mol/L, 4 mL de EDTA 0,5 mol/L e 2 g de CTAB em um béquer e dissolvidos sob agitação em agitador magnético. O volume foi completado com água ultrapura até 100 mL.

Tampão de precipitação CTAB: 1,33 mL de cloreto de sódio 3 mol/L foram adicionados a 0,5 g de CTAB e o volume completado com água ultrapura para 100 mL. O pH foi ajustado para 8,0 com menos de uma gota de hidróxido de sódio 1 mol/L.

Tampão TBE (Trizma + EDTA) 10X: 108 g de Trizma, 55 g de ácido bórico, 40 mL EDTA 0,5 mol/L e 600 mL de água ultrapura foram adicionados em um béquer e dissolvidos sob agitação em agitador magnético. O pH foi ajustado para 8 com ácido clorídrico 0,1 mol/L e o volume completado com água ultrapura até 1000 mL. O conteúdo foi autoclavado a 121 °C por 15 min.

Tampão TBE (Trizma + EDTA) 1X: foram medidos 100 mL da solução tampão TBE 10X e o volume completado para 1000 mL com água ultrapura.

Tampão TE (Tris HCl + EDTA) 10:1: 1 mL de Tris-HCl foi adicionado a 200 µL de EDTA 0,5 mol/L e o volume completado para 100 mL com água ultrapura.

Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0: 121,1 g de Trizma foram pesados, adicionados de 600 mL de água ultrapura e agitados. O pH foi ajustado para 8 com ácido clorídrico 0,1 mol/L e o volume completado com água ultrapura para 1000 mL.

4.5. AMOSTRAS

4.5.1 VALIDAÇÃO

Para a validação foram empregados MRC de soja RR[®] nos níveis de concentração disponíveis comercialmente 0,1 %, 1,0 % e 10 % e amostra de soja 100 % convencional previamente moída (amostra comercial certificada previamente analisada). Alíquotas da amostra 100% convencional foram adicionadas dos MRC

para que fossem obtidas formulações de concentrações menores e diferentes das disponíveis comercialmente, ampliando-se a faixa de validação.

Nos estudos de seletividade foram utilizados MRC de milho Bt11 a 5 %, GA21 a 5 %, MON810 a 5 %, NK603 a 5 %, TC1507 a 10 %, Bt176 a 2 %. Foram elaboradas, ainda, formulações com alíquotas da amostra de soja 100% convencional adicionadas dos MRC de milho Bt11 e GA21 e com alíquotas da amostra de soja 100% convencional adicionadas dos MRC de soja RR[®] e de MRC de milho Bt11 e GA21, visando a obtenção de amostras brancas e RR[®] na presença de interferentes, respectivamente.

Os MRC foram mantidos refrigerados, conforme orientações do fabricante. A amostra de soja 100 % convencional foi mantida em embalagem plástica de primeiro uso, a temperatura ambiente. As formulações foram preparadas no momento das análises.

4.5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO

As amostras de soja em grão comerciais foram coletadas no comércio de Minas Gerais pela Vigilância Sanitária Estadual, na quantidade mínima de 1 kg. As amostras foram mantidas em suas embalagens originais, a temperatura ambiente, até o momento do processamento e análise.

4.6. MÉTODOS DE ENSAIO

Os métodos analíticos adotados foram baseados no protocolo do JRC (2005) para a etapa de extração de DNA, em SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS (1989) para a quantificação de DNA por gel de agarose e no protocolo de QUERCI, JERMINI & VAN DEN EEDE (2006) para a realização da *Nested PCR*. Para a quantificação de DNA por fluorimetria foi utilizado o Manual do Fabricante do *kit* Qubit[®] (INVITROGEN, 2010).

As análises foram conduzidas em cabines de proteção biológica, devidamente desinfetadas com solução de álcool etílico 81 °GL, por analistas devidamente treinados, paramentados e utilizando equipamentos de proteção individual adequados (jalecos e luvas descartáveis), visando evitar a contaminação das amostras.

4.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Alíquotas de 200 ± 2 mg das amostras (MRC, formulações ou amostras comerciais coletadas pela Vigilância preparadas como descrito em 4.9) foram pesadas em microtubos tipo *ependorf* de 1,5 mL devidamente identificados. Foram adicionados 300 μ L de água ultrapura e agitados em agitador de tubos sob rotação máxima (aproximadamente 3000 rpm) até hidratação. Foram adicionados aos microtubos 700 μ L do tampão de extração CTAB pré-aquecido a 63-67° C e, em seguida, homogeneizados em agitador de tubos, sob rotação máxima. Em cada bateria analítica foi preparado e analisado um controle negativo da extração com todos os reagentes analíticos e um controle positivo (MRC).

Foram adicionados 10 μ L da enzima RNase A (10 mg/mL) nos microtubos contendo as amostras, que foram homogeneizadas em agitador de tubos e incubadas por 30 min em banho termostático (63-67° C). Em seguida, 10 μ L da enzima Proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados, homogeneizados em agitador de tubos e incubados por 30 min em banho termostático (63-67° C). Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 xg.

Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos previamente identificados contendo 500 μ L de clorofórmio, homogeneizados e centrifugados por 15 min a 12000 xg. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos contendo 500 μ L de clorofórmio, homogeneizados e centrifugados por 5 min a 12000 xg. Os sobrenadantes (máximo de 500 μ L) foram transferidos para novos microtubos, anotando-se os volumes.

Para cada volume de amostra obtido, foram adicionadas duas vezes o volume do tampão de precipitação CTAB. Estes foram homogeneizados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 1 h dentro da cabine de proteção biológica. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 13000 xg e os sobrenadantes descartados.

Os precipitados obtidos foram dissolvidos em 350 µL de cloreto de sódio 1,2 mol/L; adicionado de 350 µL de clorofórmio e agitado por 30 s em agitador de tubos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 xg para a separação das fases. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e os volumes anotados.

Para cada volume de sobrenadante foram adicionados 0,6 vezes o volume de isopropanol refrigerado (2 a 10° C), os quais foram misturados lentamente por inversão, incubados à temperatura ambiente por 20 min e centrifugados por 10 min a 14000 xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado em 500 µL de álcool etílico a 70 %. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12000 xg, descartando-se o sobrenadante, cuidadosamente, para que o *pellet* (precipitado) não se desprendesse do microtubo. Os microtubos foram deixados à temperatura ambiente com a tampa aberta sobre papel absorvente para secagem dos *pellets*.

Os *pellets* foram ressuspensos em 50 µL de solução tampão TE (Tris HCl + EDTA) 10:1 previamente aquecido (63-67 °C) e incubados *overnight* sob refrigeração (2 a 10 °C).

4.6.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Quantificação por eletroforese em gel de agarose

A quantificação do DNA das amostras foi realizada em gel de agarose a 1 %. Foram aplicados 2 µL de cada amostra de DNA em tampão de amostra 1X para um volume final de 12 µL. O padrão lambda íntegro de DNA de bacteriófago foi aplicado como padrão de quantificação (20 ng/µL) para as concentrações de 50, 100 e 200 ng/µL.

A eletroforese foi realizada em 80 volts por 10 min e, após esse tempo, em 100 volts por 50 min. Foi feita uma inspeção visual da intensidade das bandas de DNA com as bandas do padrão de quantificação, estimando-se comparativamente a quantidade de DNA para cada amostra purificada em ng/ μ L.

Quantificação por fluorimetria (Fluorímetro Qubit® 2.0)

O *kit* de ensaio Qubit® dsDNA BR consiste de um reagente de ensaio concentrado (reagente Qubit® dsDNA BR), tampão de diluição (tampão Qubit® dsDNA BR) e padrões de DNA pré-diluídos (padrão #1 e #2 Qubit® dsDNA BR).

A solução de trabalho foi preparada em tubos tipo Falcon diluindo o reagente no tampão na proporção 1:200 para um volume final de 200 μ L por amostra. Para os padrões e amostras utilizou-se 190 μ L de solução de trabalho. Depois de acrescentados os padrões e o DNA das amostras, os tubos foram agitados em Vortex por 2 a 3 segundos, tomando-se o cuidado para não formar bolhas. Os tubos foram incubados por 2 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, colocados no fluorímetro Qubit® 2.0 para leitura das concentrações. Conforme orientações do fabricante do *kit*, o aparelho foi calibrado utilizando-se os padrões (#1 e #2) e, em seguida, realizou-se as leituras das amostras e cálculos para a expressão das concentrações em ng/ μ L.

Manutenção do DNA

Os tubos contendo DNA foram identificados univocamente, anotando-se a data e o valor estimado da concentração. O DNA foi armazenado sob refrigeração (2 a 10 °C) até o uso. Após os ensaios, estes foram armazenados sob congelamento (-18 a -26 °C). No dia da análise por *Nested PCR*, as amostras foram diluídas para 50 ng/ μ L.

4.6.3 ANÁLISE QUALITATIVA POR NESTED PCR

Preparo da solução de amplificação (mix) da primeira etapa da Nested PCR

O *mix* foi preparado em uma cabine de proteção biológica. Durante o preparo todos os reagentes permaneceram em recipiente contendo gelo. O volume total do *mix* foi determinado de acordo com o número de amostras a serem analisadas e os controles necessários, acrescentando o volume de mais um tubo como margem de segurança. A quantidade dos reagentes foi calculada para o volume de *mix* em função da concentração de DNA.

As concentrações de DNA das amostras e dos controles foram ajustadas para 50 ng/μL, sendo adicionado 1 μL do DNA à 24 μL do *mix* para a reação. Para as amostras que não apresentaram banda na análise visual por eletroforese em gel de agarose foi considerada uma concentração de DNA menor ou igual a 5 ng/μL. Nestes casos foram utilizados 10 μL de DNA e 15 μL do *mix* para a reação.

A solução de *mix* da primeira etapa foi preparada para a composição final descrita na **Tabela 8**.

Tabela 8. Reagentes utilizados na composição do mix e respectivas concentrações

Reagentes	Concentração final
Tampão Taq polimerase	1 X
Cloreto de Magnésio	1,5 mmol/L
dNTP	0,2 mmol/L
Iniciadores (GMO 9 e GMO 5)	0,24 μmol/L
Taq DNA polimerase	1,0 U

Em outra cabine de proteção biológica foram adicionados, nos respectivos tubos, o DNA das amostras em análise, o DNA controle positivo para soja RR[®]; 1 µL do controle negativo da solução de extração das referidas amostras e 1 µL de água ultrapura no controle negativo do *mix*.

As condições da reação de PCR e da amplificação do DNA das amostras foram previamente otimizadas em ensaios preliminares no LBM/DIVISA.

Condições de amplificação da primeira etapa da Nested PCR

As amostras foram colocadas em um termociclador sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 95 °C por 3 min, amplificação em 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 40 s e extensão final a 72 °C por 5 min, totalizando aproximadamente 1 h e 30 min.

Preparo da solução de amplificação (mix) da segunda etapa da Nested PCR

Após a amplificação, realizou-se a segunda etapa da *Nested PCR*. O *mix* da segunda etapa foi preparado nas mesmas condições da primeira etapa, sendo utilizado o segundo par de iniciadores listado na **Tabela 9** (GMO 7 e GMO 8). Foram distribuídos 24 µL do *mix* em cada microtubo. Em outra cabine de proteção biológica, adicionou-se aos microtubos 1,0 µL do produto de amplificação obtido na primeira etapa da PCR diluído 10 vezes, correspondente às amostras e aos controles.

Tabela 9. Iniciadores utilizados na reação da *Nested PCR*

1ª Etapa da reação		
GMO 9	Iniciador F	5' CATGAAGGACCGGTGGGAGAT 3'
GMO 5	Iniciador R	5' CCACTGACGTAAGGGATGACG 3'
2ª Etapa da reação		
GMO 7	Iniciador F	5' ATCCCACTATCCTTCGCAAGA 3'
GMO 8	Iniciador R	5' TGGGGTTTATGGAAATTGGAA 3'

F: forward; GMO: genetically modified organisms; R: reverse.

Fonte: QUERCI, JERMINI & VAN DEN EEDE (2006).

Condições de amplificação da segunda etapa da Nested PCR

As amostras foram colocadas em um termociclador sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 95 °C por 3 min, amplificação em 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 40 s e extensão final a 72 °C por 5 min, totalizando aproximadamente 2 h.

Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado a 2 % com brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL. O volume de 5 µL da solução tampão de amostra 6 X foi diluído em 25 µL do produto da segunda etapa da *Nested PCR* e homogeneizados. Foram aplicados ao gel 12,0 µL destas soluções, além de um marcador de peso molecular de 123 pb com concentração de 1,0 µg/µL. Para o marcador, foi feita uma solução com 9 µL de água ultrapura, 2 µL da solução tampão de amostra 6X e 1 µL do marcador. A corrida eletroforética foi efetuada a 80 volts por 10 min, e por mais 1 h e 40 min a 100 volts.

O gel foi retirado da cuba de eletroforese e transferido para o transluminador de luz UV, cujas imagens foram registradas pelo sistema de fotodocumentação digital para análise dos resultados.

Interpretação dos resultados para soja RR[®]

O fragmento amplificado esperado para o gene da RR[®] é de 169 pb e os critérios de aceitação e interpretação dos resultados para as amostras foram: i) as amostras que apresentaram resultado negativo, bem como os controles negativos, não deveriam apresentar amplicons; e ii) as amostras que apresentaram resultado positivo, bem como o controle positivo, deveriam apresentar um amplicon de 169 pb.

4.6.4 PESQUISA DO GENE ENDÓGENO (LECTINA DE SOJA) EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA SOJA RR[®]

Preparo da solução de amplificação para a pesquisa do gene endógeno

O *mix* foi preparado em uma cabine de proteção biológica. Durante o preparo do *mix* todos os reagentes permaneceram em recipiente contendo gelo. O volume do *mix* foi determinado de acordo com o número de amostras a serem analisadas e os controles necessários, acrescentando o volume de mais um tubo como margem de segurança. A quantidade dos reagentes foi calculada para o volume de *mix* em função da concentração de DNA.

As concentrações de DNA das amostras e dos controles foram ajustadas para 50 ng/μL, sendo adicionado 1 μL do DNA à 24 μL do *mix* para a reação. Para as amostras que não apresentaram banda na análise visual por eletroforese em gel de agarose foi considerada uma concentração de DNA menor ou igual a 5 ng/μL. Nestes casos foram utilizados 10 μL de DNA e 15 μL do *mix* para a reação.

O par de iniciadores descritos na **Tabela 10** foi utilizado para pesquisa do gene de lectina de soja.

Tabela 10. Iniciadores utilizados para a pesquisa do gene da lectina

GMO 3	Iniciador F	5' GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C 3'
GMO 4	Iniciador R	5' GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG 3'

F: forward; GMO: genetically modified organisms; R: reverse.

Fonte: QUERCI, JERMINI & VAN DEN EEDE (2006).

Em outra cabine de proteção biológica foram adicionados nos tubos previamente identificados: o DNA das amostras em análise, o DNA utilizado como controle positivo para a lectina de soja (o mesmo controle positivo usado na reação *Nested*), 1 µL do controle negativo da extração e 1 µL de água ultrapura no controle negativo do *mix*.

A solução de *mix* foi preparada para a composição final descrita na **Tabela 11**.

Tabela 11. Reagentes utilizados na composição do mix e respectivas concentrações

Reagente	Concentração final
Tampão Taq polimerase	1 X
Cloreto de Magnésio	1,5 mmol/L
dNTP	0,2 mmol/L
Iniciadores (GMO 3 e GMO 4)	0,24 µmol/L
Taq DNA polimerase	1,5 U

Condições de amplificação da PCR

As amostras foram colocadas em um termociclador sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação a 95 °C por 3 min, amplificação em 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 63 °C por 30 s e 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 3 min, totalizando aproximadamente 2 h e 30 min.

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 2 % e a eletroforese foi conduzida conforme descrito para a *Nested PCR*.

Interpretação dos resultados para o gene da lectina

O fragmento amplificado esperado para o gene da lectina é de 118 pb e os critérios de aceitação e interpretação dos resultados para as amostras foram: i) os controles negativos não deverão apresentar amplicons; e ii) o controle positivo deverá apresentar um amplicon de 118 pb.

4.7. VALIDAÇÃO

A validação foi conduzida nas quatro etapas descritas a seguir, conforme procedimento proposto por GONDIM (2012).

4.7.1 TESTES PRELIMINARES

Foi realizado um experimento preliminar no qual amostras de soja 100 % convencional foram adicionadas de amostra comprovadamente transgênica, ou seja, MRC RR[®] de 0,1 % e 1,0 %. Seis níveis de concentração foram investigados (0,001; 0,002; 0,003; 0,005; 0,010 e 0,030 %), mais o branco (amostra 100 % convencional), sendo 10 replicatas independentes por nível. As amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente, em duas baterias analíticas distintas, por dois analistas, sendo cinco replicatas por nível (**Figura 11**), simulando condições de repetitividade e de precisão intermediária, o que totalizou 70 ensaios.

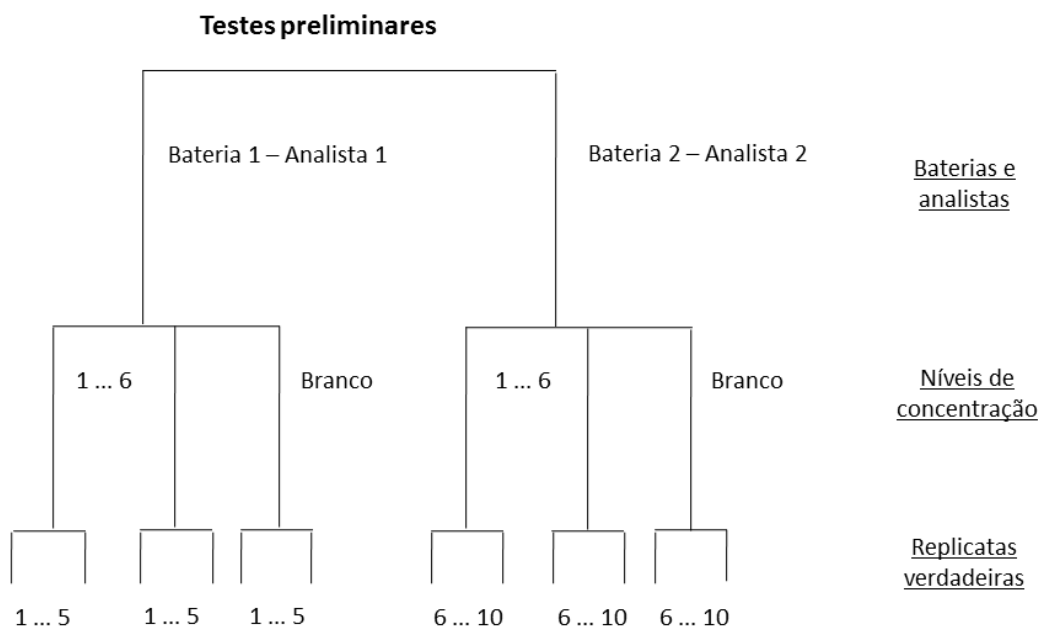


Figura 11. Representação esquemática do delineamento experimental dos testes preliminares.

Tabelas de contingência foram elaboradas para determinação das taxas de falsos resultados. Os resultados foram avaliados e, caso os valores das TFN não permitissem a estimativa da RPC (TFN entre 0 e 100 %), seria necessário alterar a faixa de concentração estudada.

4.7.2 AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE FALSOS RESULTADOS, DE SENSIBILIDADE, DE SELETIVIDADE, DE CONFIABILIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO, REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE, ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA

Amostras de soja 100 % convencional foram adicionadas de MRC RR[®] de 0,1 %, 1,0 % e 10,0 %. Nove níveis de concentração (0,001; 0,005; 0,01; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035 e 1,000 %) foram estudados, mais o branco (amostra 100 % convencional), sendo 30 replicatas independentes por nível (**Tabela 12**). As amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente, em três baterias analíticas distintas, por três analistas, sendo 10 replicatas por nível, simulando condições de

repetitividade e de precisão intermediária. As amostras foram cegas para os analistas.

Tabela 12. Níveis e concentrações das amostras formuladas e respectivas massas do material de referência certificado de soja RR[®] e de soja 100 % convencional

Nível	Concentração de soja RR [®] na amostra formulada (%)	Concentração do MRC de soja RR [®]	Massa do MRC de soja RR [®] (mg)	Massa de soja 100 % convencional (mg)
0	-	-	-	200
1	0,001	0,1	2	198
2	0,005	0,1	10	190
3	0,010	1	2	198
4	0,015	1	3	197
5	0,020	1	4	196
6	0,025	1	5	195
7	0,030	1	6	194
8	0,035	1	7	193
9	1,000	10	20	180

MRC: material de referência certificado; RR[®]: *Roundup Ready*[®]

Para escolha dos níveis foram considerados o limite estabelecido pela legislação brasileira para declaração no rótulo de produtos contendo OGM (1 %) e as respostas obtidas nos estudos preliminares, que sinalizaram para uma possível RPC entre os níveis 0 e 0,030 % de soja RR[®] (**Figura 12**).

Em cada bateria analítica, os extratos de DNA das amostras foram quantificados pelas técnicas de eletroforese e fluorimétrica. A partir desta etapa, foram realizadas duas *Nested* PCR, uma para cada replicata de amostra, totalizando 600 ensaios nesta etapa da validação.

Taxas, limites, região de perda de confiabilidade, acordância e concordância.

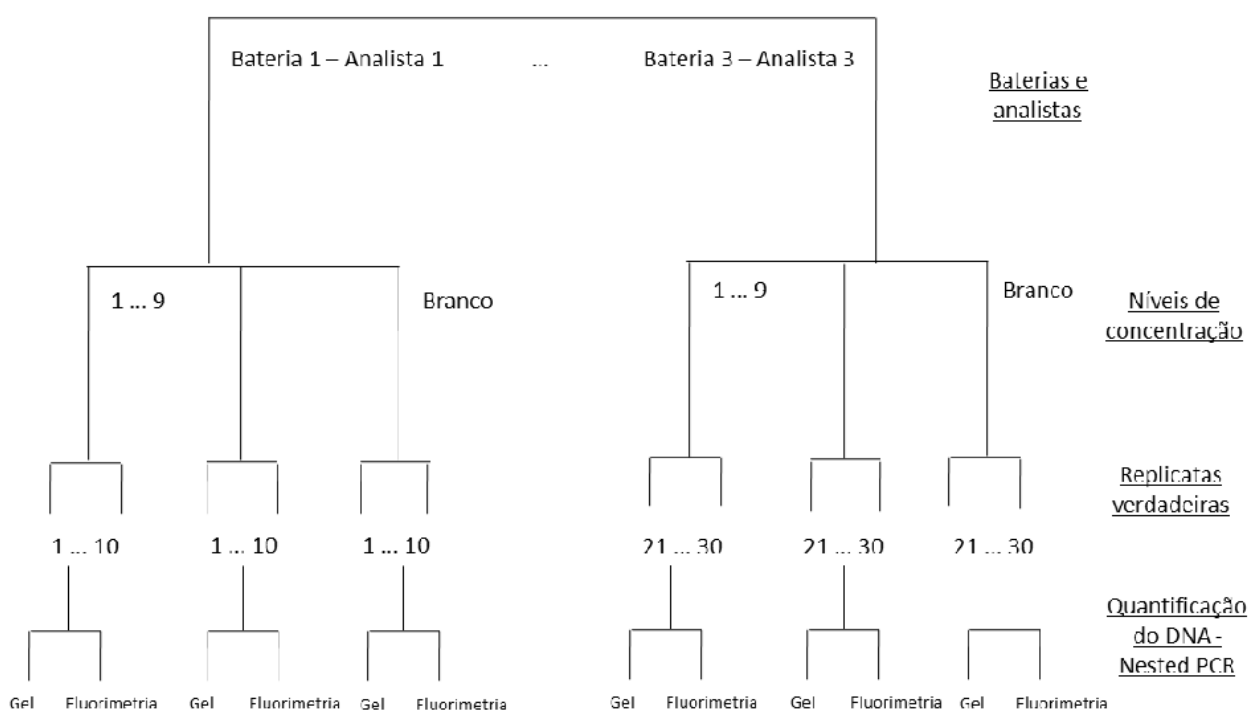


Figura 12. Representação esquemática do delineamento experimental proposto para avaliação das taxas, limite de detecção, região de perda de confiabilidade, acordância e concordância.

Para avaliação dos resultados foram propostos: i) tabelas de contingência para determinação das taxas de falsos resultados, TSB, TST e TCF; ii) curvas de probabilidades (ou curvas de desempenho) para estudo do LD e da RPC (ou incerteza do método); e iii) cálculos de probabilidade e análise combinatória para avaliação da ACO e CON.

4.7.3 AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA SELETIVIDADE

Foi realizado um experimento para investigação de potenciais eventos interferentes. Primeiramente, seis diferentes eventos de milho foram analisados para pesquisa do gene RR[®] utilizando a *Nested PCR*, sendo estes: Bt11 a 5 %, MON 810 a 5 %, GA21 a 5 %, NK603 a 5 %, TC1507 a 10 % e Bt176 a 2 % (as concentrações

diferiram devido às concentrações dos MRC disponíveis). Os fragmentos da construção gênica dos milhos GM estão listados na **Figura 13**.

Bt11

CaMV 35S	cry1A(b)	T-NOS	CaMV 35S	pat	T-NOS
----------	----------	-------	----------	-----	-------

MON810

CaMV 35S	hsp70	cry1A(b)
----------	-------	----------

GA21

r-actin1	OTP	mEPSPS	T-NOS
----------	-----	--------	-------

NK603

r-actin1	CTP2	CP4 EPSPS	T-NOS	CaMV 35S	CTP2	CP4 EPSPS	T-NOS	r-actin1
----------	------	-----------	-------	----------	------	-----------	-------	----------

TC1507

Cry1F	Região homóloga	ublZM	Cry1F	ORF25	CaMV 35S	pat	T35S	ORF25	Região homóloga	pat
-------	--------------------	-------	-------	-------	----------	-----	------	-------	--------------------	-----

Bt176

P-PEPC	cry1A(b)	PECP9	T35S
--------	----------	-------	------

Figura 13. Representações esquemáticas das construções genéticas presentes nos eventos de milho geneticamente modificados Bt11, MON810, GA21, NK603, TC1507 e Bt176.

Adaptado de YANG *et al.* (2007), DINON (2011) e GMDD (2013).

Os elementos em comum à soja RR® são: promotor e terminador para o milho Bt11, promotor para o milho MON810, terminador para o milho GA21, sequência CP4EPSPS e terminador para o milho NK603, promotor para o milho Tc1507 e promotor para o milho Bt176.

Para uma investigação mais aprofundada foram selecionados os milhos Bt11 e GA21. O efeito dos interferentes selecionados sobre a seletividade do método foi investigado por meio da análise de amostras formuladas de forma a se obter os interferentes, na presença e na ausência do evento alvo, conforme representado na **Figura 14**. A concentração de soja RR[®] selecionada correspondeu a 0,030 %, menor nível com 100 % de TCF na etapa anterior da validação. A concentração dos interferentes foi relevante para ocasionar alteração na identificação do analito, ou seja, 2,0 %, que foi definido em função da concentração dos MRC disponíveis e de suas quantidades. Os extratos de DNA das amostras foram quantificados pela técnicas de eletroforese e fluorimétrica e, a partir desta etapa, foram realizadas duas *Nested PCR*, uma para cada replicata de amostra, totalizando 80 ensaios.

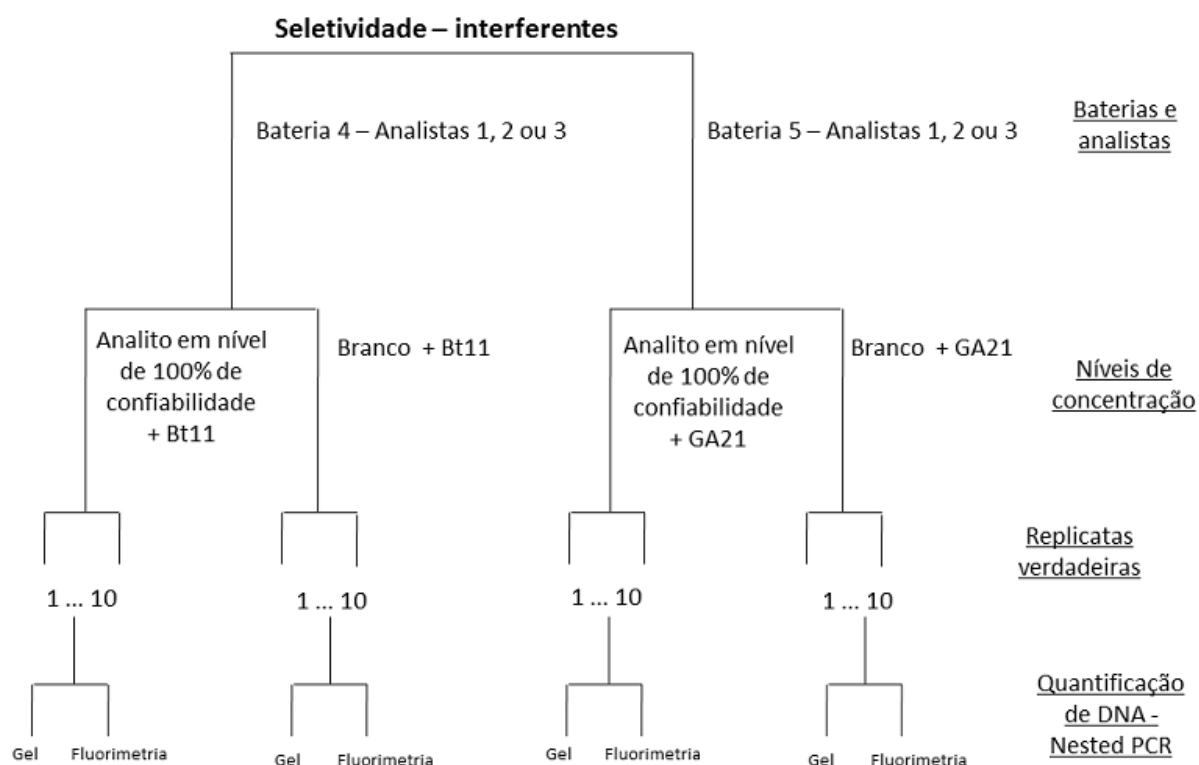


Figura 14. Representação esquemática do delineamento experimental proposto para avaliação complementar da seletividade (na presença de interferentes).

As amostras foram preparadas da seguinte forma: alíquotas de 80 mg de milho Bt11 (5 %) e 6 mg de soja RR[®] (1,0 %) foram adicionados de 114 mg de soja 100 % convencional, correspondendo a amostras contendo 0,030 % de soja RR[®] na presença de 2,0 % de milho Bt11. Nas amostras brancas, alíquotas de 80 mg de milho Bt11 (5 %) foram adicionadas de 120 mg de soja 100 % convencional, correspondendo a amostras contendo 2,0 % de milho Bt11. O mesmo procedimento foi adotado para o milho GA21 (**Tabela 13**).

Tabela 13. Concentrações das amostras formuladas e respectivas massas do material de referência certificado de milho geneticamente modificado, material de referência de soja *Roundup Ready*[®] e de soja 100 % convencional

Formulações	Concentração de milho GM na amostra (%)	Concentração de soja RR [®] na amostra (%)	Massa do MRC de milho GM 5 % (mg)	Massa de soja 100 % convencional (mg)	Massa do MRC de soja RR [®] 1 % (mg)
Milho Bt11 + Soja convencional	2,0	-	80	120	-
Milho Bt11 + Soja RR [®] + Soja convencional	2,0	0,03	80	114	6
Milho GA21 + Soja convencional	2,0	-	80	120	-
Milho GA21 + Soja RR [®] + Soja convencional	2,0	0,03	80	114	6

GM: geneticamente modificado; MRC: material de referência certificado; RR[®]: *Roundup Ready*[®]

As amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente, em uma única bateria analítica, sendo 10 replicatas por nível. As amostras foram cegas para o analista.

Na análise de dados, foi feita a avaliação da alteração na TCF do método devido à presença do interferente, ou seja, na alteração das taxas de falsos resultados, adotando-se como critério uma TCF mínima de 90 %.

4.7.4 AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

O delineamento experimental para o estudo da robustez foi o experimento fatorial completo. Neste caso, foram realizados ensaios com amostras formuladas na concentração de soja RR[®] de 0,030 %, menor nível com 100 % de TCF na etapa anterior da validação, sob diferentes condições experimentais, sendo um mínimo de 10 replicatas verdadeiras por condição. O esquema de um delineamento

experimental fatorial completo para dois fatores e três níveis está representado na **Figura 15**, totalizando 120 ensaios nestas etapa da validação.

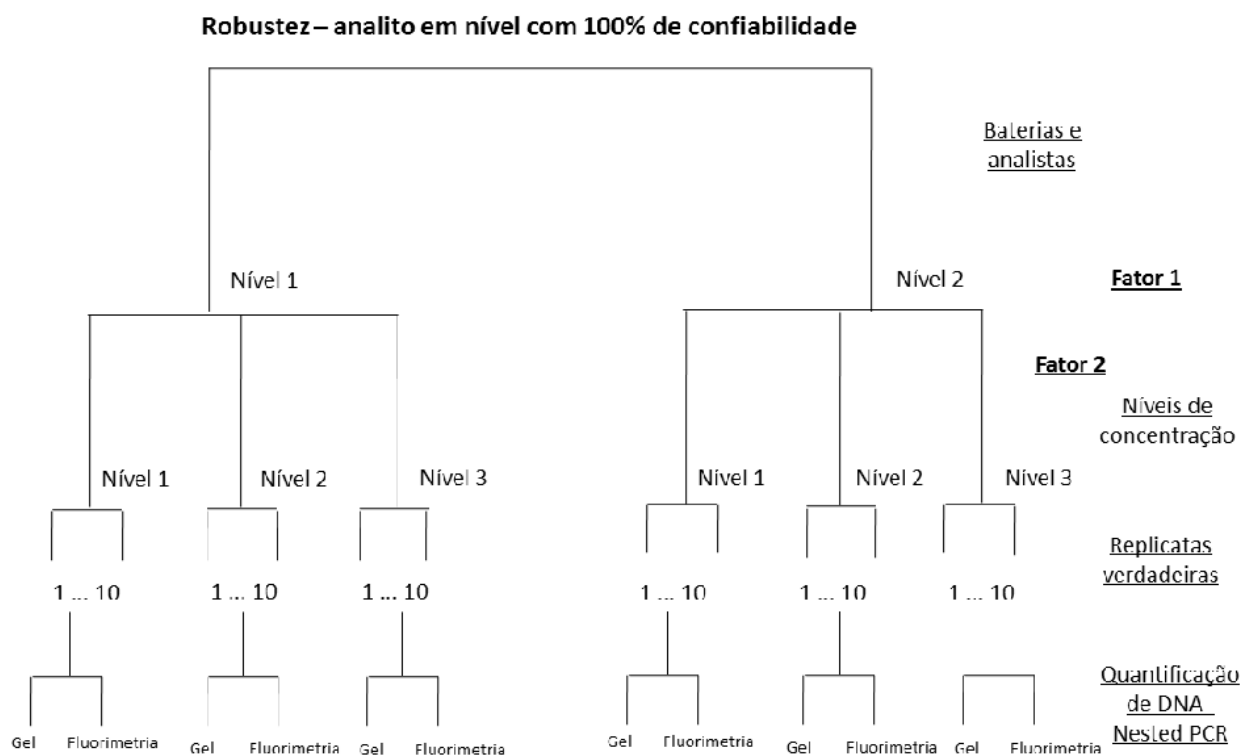


Figura 15. Representação esquemática de delineamento experimental fatorial 2x3 para avaliação da robustez, em um nível de concentração com 100% de confiabilidade.

Um dos fatores escolhidos para avaliar a robustez foi a marca da Taq DNA Polimerase. A Taq DNA polimerase é a catalisadora da extensão dos iniciadores. Ela é uma molécula termoestável e para muitos ensaios a quantidade ótima está entre 0,5 e 2,5 unidades. O aumento da concentração pode resultar na redução da seletividade (CURY, FURUSE & ARAÚJO, 2005). Assim, foram escolhidas duas marcas de Taq DNA Polimerase: A e B.

O outro fator escolhido foi a concentração de DNA alvo. A proporção iniciador/molde influencia significativamente a PCR e deve ser otimizada. Para uma PCR ótima é necessária uma baixa concentração de DNA. O excesso de molde

pode favorecer o anelamento das duas fitas do molde, mais do que seu anelamento com o par de iniciadores e irá também aumentar a chance de formação de produtos não-específicos. Entretanto, com pouca quantidade de molde, as sequências complementares poderão não se encontrar com os iniciadores (CURY, FURUSE & ARAÚJO, 2005). Assim, foram escolhidas três concentrações de DNA alvo: 25, 50 e 75 ng/ μ L.

As amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente, em uma única bateria analítica, sendo 10 replicatas por condição. As amostras foram cegas para o analista.

No caso de métodos sensoriais, como *kits* ou os de simples observação visual, o efeito dos fatores estudados é avaliado pela alteração na TCF. Na avaliação da robustez do método, considerou-se efeito significativo dos fatores estudados sobre o desempenho do método nos casos em que a TCF foi menor que 90 %.

4.8. COMPARAÇÃO DAS FORMAS DE LEITURA DOS RESULTADOS

Os resultados das quantificações foram tabulados para posterior análise estatística conforme estabelecido no procedimento delineado. A comparação entre as técnicas de quantificação por eletroforese em gel de agarose e por fluorimetria foi feita pela aplicação do teste de t emparelhado às TFN obtidas nos diferentes níveis de concentração, com um nível de significância de 5 %. As duas técnicas também foram comparadas em função do desempenho apresentado para os diferentes parâmetros da validação.

4.9. APLICAÇÃO DO MÉTODO

As etapas de preparo e processamento das amostras, bem como os procedimentos analíticos foram conduzidos em cabines de proteção biológica, devidamente desinfetadas com solução de álcool etílico 81 °GL, por analistas

devidamente treinados, paramentados e utilizando equipamentos de proteção individual adequados (jalecos e luvas descartáveis), visando evitar a contaminação das amostras.

O preparo e a trituração das amostras foram realizados no Serviço de Gerenciamento de Amostras da FUNED, sob rigorosas condições. A limpeza da embalagem da amostra foi realizada com auxílio de gaze embebida em álcool etílico a 70 %, deixando secar antes de abrir. Após abertura das amostras, estas foram transferidas para sacos plásticos de primeiro uso e homogeneizadas manualmente. Em moinho exclusivo para moagens de grãos, empregando peneira de 20/30 mesh e crivo circular, uma fração da amostra foi triturada e desprezada, visando ambientar o equipamento. Um saco plástico foi, então, amarrado e devidamente ajustado na saída do moinho. Pequenas quantidades da amostra foram trituradas e, ao final desse procedimento, novamente homogeneizadas. Todas as partes removíveis do moinho, bancadas, pincéis e espátulas foram lavadas com detergente neutro e água corrente, sendo borrifadas com álcool etílico a 70 % para a secagem completa das mesmas. As amostras foram enviadas, juntamente com a embalagem original, ao LBM/DIVISA para realização das análises.

As amostras foram analisadas em triplicata pelo método validado, sendo adotado o seguinte critério de interpretação dos resultados: i) para três replicatas positivas o resultado seria positivo, ii) para três replicatas negativas o resultado seria negativo, e iii) para uma ou duas replicatas positivas o resultado seria dado como indeterminado. Caso as amostras apresentassem resultado indeterminado, as análises seriam repetidas desde a extração. Caso o resultado permanecesse indeterminado, o resultado seria considerado como abaixo do LD.

Posteriormente, a quantificação das amostras positivas foi realizada pela técnica de PCR em Tempo Real TaqMan®, avaliando a conformidade com o limite estabelecido pela legislação. A análise foi realizada no equipamento termociclador Realplex utilizando o TaqMan GMO Soy 35S Detection Kit, que apresenta como alvos os genes da lectina e do promotor 35S em uma reação de PCR multiplex. As condições de amplificação e concentrações dos reagentes foram realizadas conforme recomendações do fabricante. O cálculo das concentrações de soja GM

nas amostras foi baseado na comparação da curva de amplificação da amostra analisada com a curva de calibração gerada com MRC de soja RR[®] nas concentrações de zero a 5 %.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VALIDAÇÃO

5.1.1 TESTES PRELIMINARES

Nos testes preliminares, as análises das amostras brancas resultaram em TST e TCF de 100,0 % e TFP nula, indicando que o método é seletivo para detecção de soja RR[®] em grãos de soja, com relação aos interferentes da matriz. TFN variou entre 0,0 e 80,0 %, resultando em TSB e TCF entre 100,0 e 20,0 %, os quais sinalizaram uma adequada sensibilidade do método para a detecção do evento na faixa de concentração investigada. Os valores obtidos para TFN, TSB e TCF, em cada nível estudado, estão apresentados na **Tabela 14**. Tais resultados sugeriram que não seria necessário alterar a faixa de concentração nas etapas subsequentes da validação.

Tabela 14. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração de soja *Roundup Ready*[®], nos testes preliminares

Nível de Soja RR [®] (%)	Parâmetro da Validação (%)		
	TFN	TSB	TCF
0,000	-	-	100,0
0,001	80,0	20,0	20,0
0,002	80,0	20,0	20,0
0,003	70,0	30,0	30,0
0,005	60,0	40,0	40,0
0,010	40,0	60,0	60,0
0,030	0,0	100,0	100,0

TFN = taxa de falso-negativos, TSB = taxa de sensibilidade, TCF = taxa de confiabilidade.

5.1.2 TAXAS, REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO, ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA

Os resultados obtidos para soja RR[®], por nível de concentração, em cada bateria analítica, considerando as duas formas de quantificação de DNA estudadas estão apresentados na **Tabela A.1** do **Apêndice**.

Na **Figura 16** encontra-se representado um resultado típico da *Nested PCR* encontrado no processo de validação.

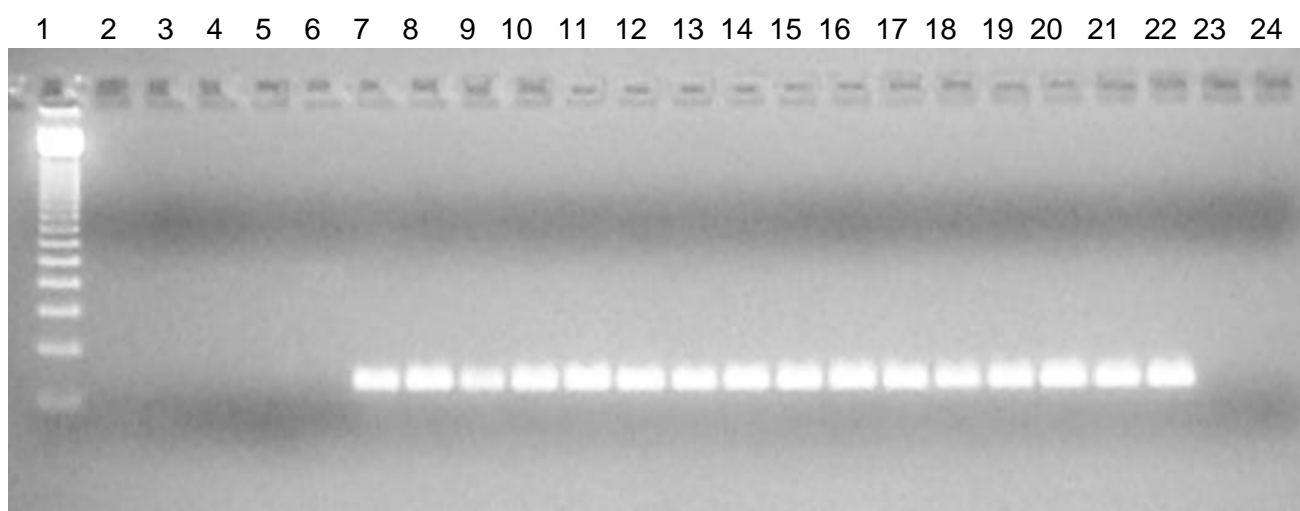


Figura 16. Resultado da *Nested PCR* para detecção do evento *Roundup Ready*[®] nas amostras cegas do processo de validação. Canaleta 1: padrão 123 pb (Invitrogen); canaleta 2 e 3: nível 0; canaleta 4 e 5: nível 1 (0,001 %); canaleta 6 e 7: nível 2 (0,005 %); canaleta 8 e 9: nível 3 (0,010 %); canaleta 10 e 11: nível 4 (0,015 %); canaleta 12 e 13: nível 5 (0,020 %); canaleta 14 e 15: nível 6 (0,025 %); canaleta 16 e 17: nível 7 (0,030 %); canaleta 18 e 19: nível 8 (0,035 %); canaleta 20 e 21: nível 9 (1,000 %); canaleta 22: controle positivo; canaleta 23: controle negativo da extração; canaleta 24: controle negativo da reação.

5.1.2.1 TAXAS

A análise das amostras brancas apresentou TFP nula e 100% de TST e TCF, para as duas formas de quantificação de DNA, indicando a seletividade do método e

ausência de interferência dos componentes da matriz soja na detecção do evento. Os valores de TFN, TSB e TCF, para as duas formas de quantificação de DNA investigadas são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Taxas falso-negativos, de sensibilidade e de confiabilidade obtidas, sob condições de precisão intermediária, em diferentes níveis de concentração de soja *Roundup Ready*[®]

Nível de Soja RR [®] (%)	Parâmetro da Validação (%)					
	Eletroforese em gel de agarose			Fluorimetria		
	TFN	TSB	TCF	TFN	TSB	TCF
0,000	-	-	100,0	-	-	100,0
0,001	76,7	23,3	23,3	70,0	30,0	30,0
0,005	26,7	73,3	73,3	16,7	83,3	83,3
0,010	20,0	80,0	80,0	10,0	90,0	90,0
0,015	6,7	93,3	93,3	3,3	96,7	96,7
0,020	6,7	93,3	93,3	3,3	96,7	96,7
0,025	6,7	93,3	93,3	6,7	93,3	93,3
0,030	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
0,035	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
1,000	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

TFN = taxa de falso-negativos, TSB = taxa de sensibilidade, TCF = taxa de confiabilidade.

Para a soja RR[®], entre os níveis 0,001 e 0,025 %, foram obtidos valores de TFN entre 76,7 e 6,7 % na quantificação por eletroforese em gel de agarose e entre 70,0 e 6,7 % na quantificação por fluorimetria. Assim, TSB e TCF variaram entre 23,3 e 93,3 % e entre 30,0 e 93,3 %, respectivamente. Em ambas as técnicas de quantificação de DNA, 100,0 % de resultados positivos foram obtidos para todos os níveis acima de 0,030%. Estes resultados indicaram sensibilidade para detecção do

evento alvo, mesmo em concentrações significativamente inferiores àquelas preconizadas pela legislação brasileira e internacional, com melhor desempenho da fluorimetria em relação a eletroforese.

LIPP *et al.* (1999) validaram, interlaboratorialmente, um método para detecção de soja e milho em pó GM. A soja RR[®] foi analisada por meio da presença de dois elementos - promotor CaMV 35S e terminador T-NOS. Quatro níveis (0,0; 0,1; 0,5 e 2,0 %) foram avaliados, em quadruplicata, por 25 laboratórios. TST de 100% foi obtida para T-NOS e de 97,9 % para CaMV 35S, sendo os casos de falso-positivos atribuídos pelos autores à prováveis contaminações. TSB variou entre 92,8 e 100 % para T-NOS e entre 94,9 e 100% para CaMV 35S.

Em estudo posterior, LIPP *et al.* (2001) validaram, também em processo interlaboratorial, um método para detecção de OGM em várias matrizes alimentícias. As amostras foram preparadas com 0, 2, 10 e 100 % de soja RR[®] e milho Bt 176. A soja RR[®] foi analisada em relação à presença do promotor CaMV 35S e do terminador T-NOS. 23 laboratórios participaram do estudo. TST entre 96,3 e 100 % para T-NOS e entre 93,3 e 96,9 % para CaMV 35S. As TSB obtidas para T-NOS variaram de 96,4 a 100 % e para CaMV 35S de 96,7 a 100 %.

LEIMANIS *et al.* (2008) validaram um método de triagem para detecção e identificação de OGM baseado na PCR multiplex acoplada a um microensaio de hibridização direta dos amplicons. O estudo foi realizado com 12 laboratórios, sendo analisadas 36 amostras, representando 6 níveis de material GM (0,045; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 %) e cinco variedades de DNA (milho Bt 176, milho MON810, milho Bt11, soja RR[®] e uma espécie não GM), sendo que a soja RR[®] foi avaliada nos níveis 0,045; 0,1; 0,5 e 1,0 %, além do branco. As sequências alvo analisadas para a soja RR[®] foram o promotor CaMV 35S, terminador T-NOS e a sequência específica EPSPS. Para todas as sequências e todas as concentrações avaliadas foi obtida TCF de 100 %.

Dois estudos de validação qualitativa interlaboratorial para detecção de soja RR[®] em biscoitos de soja, compreendidos no compêndio do JRC (2011), avaliaram três níveis de concentração (0, 2 e 10 %), em duplicata, sendo um estudo para a presença do promotor CaMV 35S e outro do terminador T-NOS. As TST obtidas

foram de 93 % para CaMV 35S e 100 % para T-NOS, sendo que a TSB variou entre 97 e 100 %.

Outros três estudos de validação colaborativa do compêndio do JRC (2011) avaliaram duas concentrações de soja RR[®] (0 e 100 %) em soja, em quintuplicata. A presença do promotor CaMV 35S, do terminador T-NOS e a junção entre promotor e a sequência CTP foram analisadas separadamente em cada estudo. As TST e TSB obtidas nos três estudos foram iguais a 100 %.

A detecção da junção entre o promotor CaMV 35S e a sequência CTP em farinha de soja também foi validada em estudo do compêndio do JRC (2011), sendo quatro concentrações diferentes (0; 0,1; 0,5 e 2 %), em duplicata. Foram obtidas TST de 100 % e TSB de 100 % para todas as concentrações avaliadas. O número de laboratórios participantes não foi informado para nenhum dos estudos, não sendo possível estimar o número de replicatas analisadas em cada nível de concentração investigado.

KODAMA *et al.* (2012) validaram, interlaboratorialmente, um método qualitativo para detecção de soja RR[®]. 14 laboratórios participantes analisaram dois níveis de concentração (0,05 e 0,1 %) de soja RR[®], mais o branco, em sextuplicata. Foi obtida TST igual a 100% e TSB entre 94% e 97,6%.

Nas validações interlaboratoriais abordadas, menos níveis de concentração foram investigados em relação ao presente trabalho, possivelmente pelas limitações na organização de validações por processos colaborativos, como o preparo e avaliação de cada material quanto a homogeneidade e estabilidade. Também, os níveis de concentração selecionados foram superiores ou concentraram-se no extremo superior da faixa coberta neste estudo, o que justifica uma menor variação na TSB. Destaca-se, contudo, o melhor desempenho do método validado no presente trabalho, visto que acima de 0,030 % a TSB foi de 100,0 %, além do fato de não ter ocorrido nenhum caso de resultado falso-positivo.

Desempenho similar ao obtido no presente trabalho foi alcançado por SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008), que estudaram, em processo

intralaboratorial, um único nível de concentração (0,1 % de soja RR[®]), com 20 replicatas, apresentando TFN igual a 0 %.

Alguns estudos de validação intralaboratorial de método qualitativo para detecção de soja RR[®] em alimentos discutem sobre sensibilidade e seletividade, mas não apresentam estimativas das taxas (MEYER & JACCAUD, 1997; MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS, 2008; BAHRDT *et al.*, 2010; MANO *et al.*, 2012).

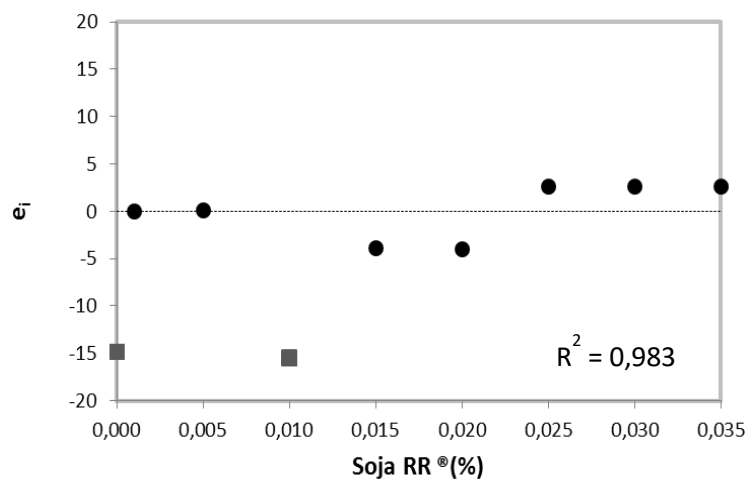
O número de análises indicado na validação qualitativa varia entre os autores, havendo consenso de que um número significativo de ensaios aleatórios é necessário para avaliar os parâmetros de desempenho do método. Nos documentos do EURACHEM (1998), PULIDO *et al.* (2003) e RÍOS *et al.* (2003) sugere-se analisar cinco níveis, sendo 10 replicatas por nível. SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL (2004) indicam selecionar níveis levemente abaixo do limite de corte ou *threshold* selecionado, com um total de 30 replicatas por nível. CÁRDENAS & VALCÁRCEL (2005) sugerem análise aleatória de um grande número de amostras ($n > 30$) conhecidas (MRC ou amostras brancas contendo o analito em diferentes níveis de concentração).

5.1.2.2 REGIÃO DE PERDA DE CONFIABILIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO

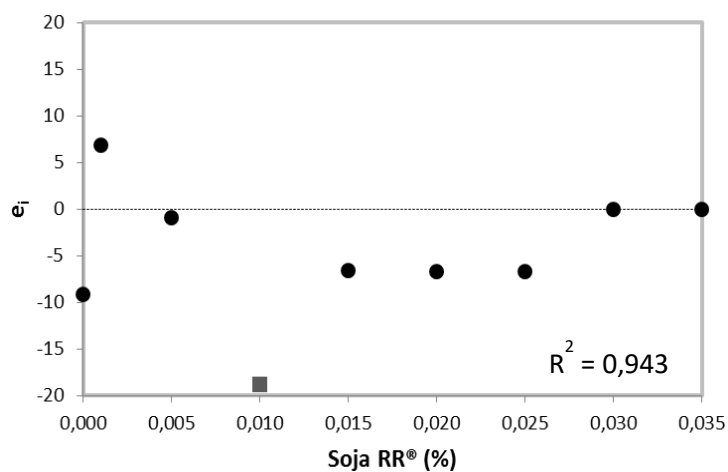
Na regressão logística, níveis correspondentes aos intervalos de probabilidade de 0,01 a 0,20 e de 0,80 a 0,99, onde há inflexão da curva, exercem maior influência na constituição da mesma (ELLISON & FEARN, 2005). Assim, para construção das curvas de desempenho e estimativa da RPC e LD foram considerados somente os níveis igualmente espaçados dentre os estudados, ou seja, de 0,000 a 0,035 % de soja RR[®].

Foram testadas as funções de regressão não linear Logito, Probit e Gompertz. Melhor ajuste, após tratamento de *outliers* pelo teste do resíduo padronizado *Jackknife*, foi obtido para a regressão de Gompertz, para as duas formas de quantificação. Os critérios adotados para escolha do melhor ajuste foram: i) maiores coeficientes de determinação (R^2), e ii) perfis não tendenciosos dos gráficos de resíduos.

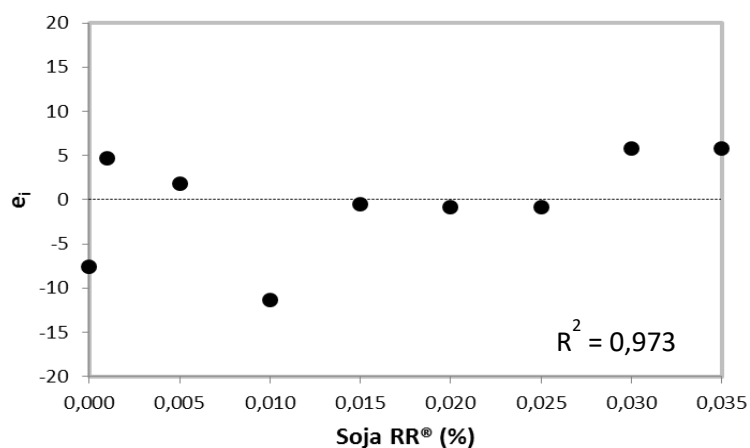
Observou-se que os valores de R^2 foram próximos para todas as funções, em ambas as formas de quantificação. Contudo, para Logito houve tratamento de dois *outliers* na eletroforese e de um na fluorimetria. Para a função Probit, houve detecção de um *outlier* na eletroforese e de dois na fluorimetria, com indicação de um terceiro *outlier*, que não pôde ser retirado devido à restrição de remoção máxima de 22 % dos dados (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Considerando o modelo de Gompertz, não houve indicação de *outliers* para nenhuma forma de quantificação. Além disto, pela inspeção visual dos gráficos de resíduos, observou-se um perfil menos tendencioso desta função em relação as demais (**Figuras 17 e 18**).



(a)

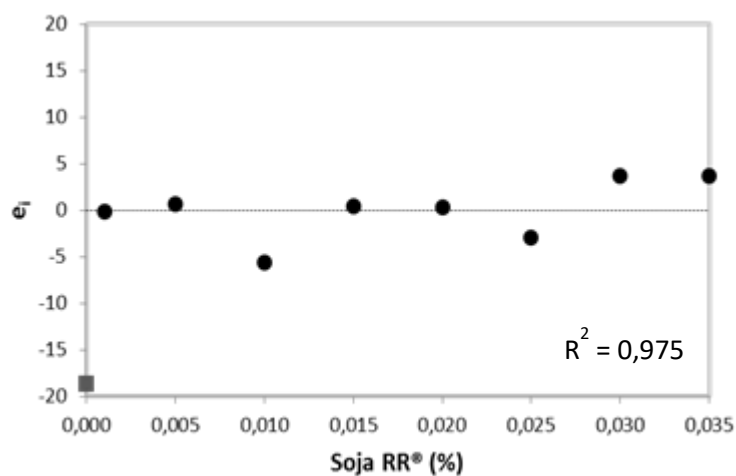


(b)

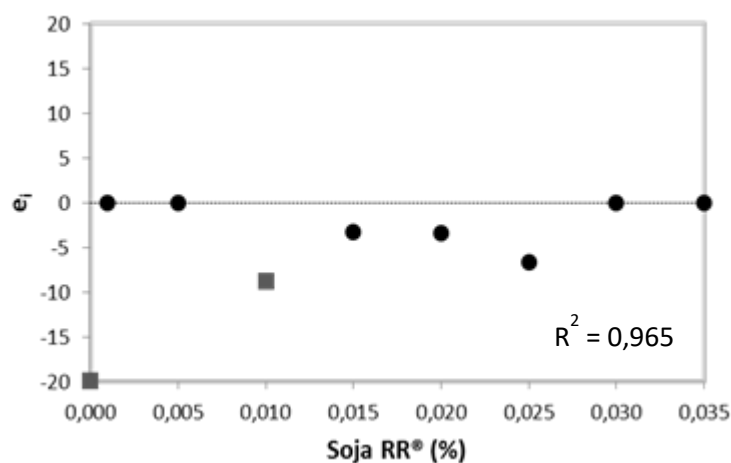


(c)

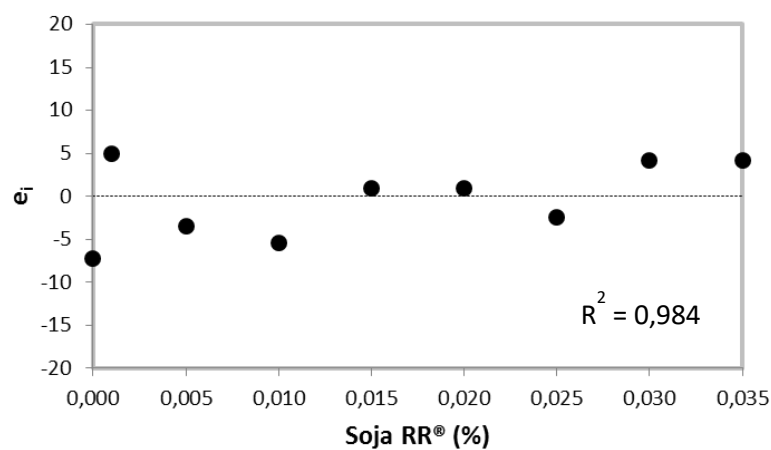
Figura 17. Gráficos exploratórios dos resíduos (e_i) dos ajustes polinomiais obtidos pelas funções de Logito (a), Probit (b) e Gompertz (c) para soja RR[®] na quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose, incluindo os respectivos coeficientes de determinação (R^2) e *outliers* diagnosticados (■).



(a)



(b)



(c)

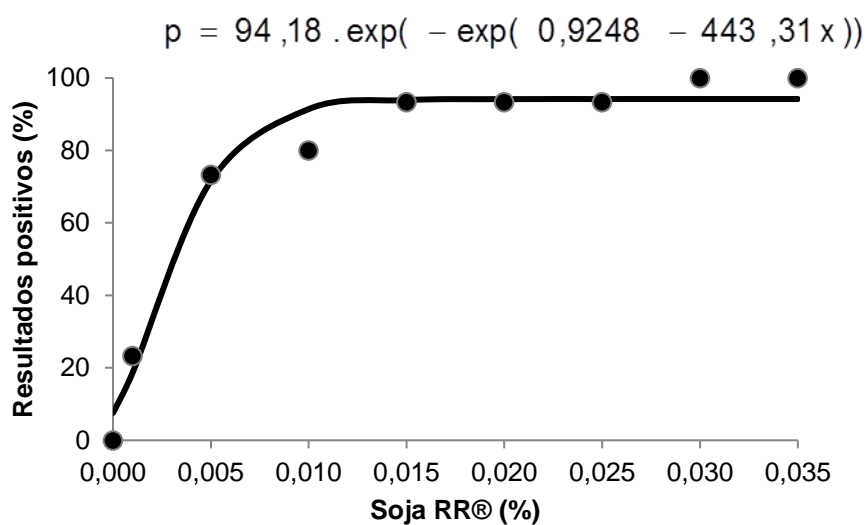
Figura 18. Gráficos exploratórios dos resíduos (e_i) dos ajustes polinomiais obtidos pelas funções de Logito (a), Probit (b) e Gompertz (c) para soja RR® na quantificação de DNA por fluorimetria, incluindo os respectivos coeficientes de determinação (R^2) e *outliers* diagnosticados (■).

As curvas de desempenho, respectivas equações, RPC e LD obtidos para as duas formas de quantificação de DNA pesquisadas, encontram-se ilustradas na **Figura 19**. Conforme ilustrado na **Figura 19 a**, para estimativa da RPC relativa à quantificação por eletroforese em gel de agarose, foram obtidos valores 0,94; 0,92 e 443,32 para os parâmetros da regressão a, b e c da **Equação 8**, respectivamente. A RPC foi estimada entre os níveis de concentração -0,0004 e 0,0070 % de soja RR®, considerando-se porcentagens de resultados positivos de 5 e 95 %, respectivamente. O valor negativo obtido para o limite inferior da RPC, indica que este não difere de zero. O LD foi estimado em 0,007 %, coincidente com o limite superior da RPC (GONDIM, 2012).

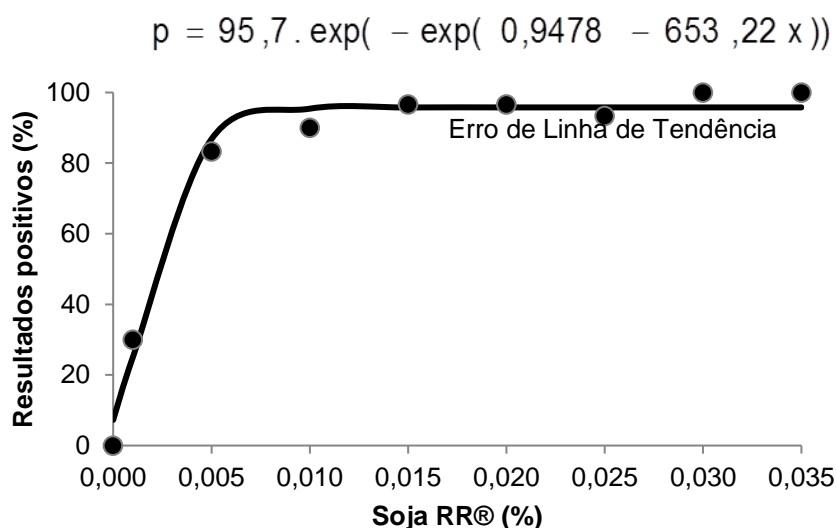
Pela curva de desempenho da quantificação fluorimétrica, ilustrada na **Figura 19 b**, foram estimados os valores para os parâmetros a, b e c da **Equação 8**, respectivamente, 0,96; 0,95 e 653,22. Considerou-se também as porcentagens de 5 e 95 % de resultados positivos, estimando-se a RPC entre os níveis de concentração -0,0002 e 0,0050 % de soja RR®, sendo este último correspondente ao LD.

Desta forma, os valores dos LD obtidos em ambas as formas de quantificação foram inferiores aos limites preconizados na legislação brasileira. Cumpre destacar que tais limites encontraram-se abaixo até mesmo dos limites mais rigorosos como o regulamentado pela Suíça (0,1 %).

Os valores de LD estimados por regressão não-linear não coincidiram com os níveis correspondentes às taxas da sensibilidade e confiabilidade reportados na tabela de contingência (**Tabela 15**), próximos a 95 %. Isto porque, neste caso, a estimativa do limite baseada na análise das taxas de sensibilidade na referida tabela foi influenciada por um valor disperso. O ponto correspondente ao nível de 0,010 % de soja RR® foi indicado como *outlier* nos modelos alternativos de Probit e Logito, para ambas as formas de quantificação. Apesar deste ponto não ter sido indicado como *outlier* no modelo de Gompertz, observou-se que o mesmo não se apresentou bem ajustado ao modelo. Assim, considerou-se como mais apropriada a estimativa dos LD pelo modelo, o qual compila todas as observações experimentais e não somente a inspeção de pontos específicos da tabela, os quais podem ser dispersos.



(a)



(b)

Figura 19. Resultados experimentais (●) e curvas de desempenho (—), com respectivas equações obtidos por regressão não linear de Gompertz nas quantificações de DNA por eletroforese em gel de agarose (a) e fluorimetria (b).

Não há evidência na literatura de nenhum trabalho de validação de método qualitativo de escopo similar, com a abordagem atualizada de estimativa de incerteza de medição pela RPC, conforme apresentado no presente estudo. Os trabalhos de validação de métodos qualitativos desenvolvidos por MEYER & JACCAUD (1997), LIPP *et al.* (1999), LIPP *et al.* (2001), TAVERNIERS *et al.* (2001),

LEIMANIS *et al.* (2008), MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS (2008), SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008), BAHRDT *et al.* (2010), JRC (2011), KODAMA *et al.* (2012) e MANO *et al.* (2012) não incluíram o estudo da RPC.

No estudo de MEYER & JACCAUD (1997) um método para detecção de soja RR[®] em alimentos derivados de soja através da *Nested* PCR foi validado. A quantificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose. O LD de 0,0001 % de soja RR[®] foi determinado por diluições seriadas de um isolado proteico com 10 % de soja RR[®] em isolado proteico de soja convencional. Contudo, não foram apresentados dados do delineamento experimental, como o número de replicatas estudadas para cada nível de diluição.

LIPP *et al.* (1999) definiram como LD o menor nível de concentração para o qual foi obtida TSB próxima de 100 %, correspondente a 0,5 % de soja RR[®].

TAVERNIERS *et al.* (2001) realizaram duas diluições seriadas a partir de um extrato de DNA de soja RR[®] 5 %. O critério escolhido foi a menor concentração que apresentasse resultado positivo. O resultado foi expresso em número de cópias do gene RR[®]. Para os dois sistemas evento-específicos estudados, cinco cópias do gene RR[®] foram detectadas em 100 pg de DNA da soja, o que equivaleria a um LD de 0,06 %.

LEIMANIS *et al.* (2008) determinaram o LD em um estudo que envolveu 4 níveis de concentração de soja RR[®], mais o branco, com 33 replicatas por nível, analisadas por 5 laboratórios. O LD foi estabelecido como a menor concentração que forneceu uma TCF acima de 95 %. Assim, foram obtidos LD de 0,045 % para o promotor CaMV 35S e terminador T-NOS e de 0,5 % para a sequência EPSPS.

No trabalho de MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS (2008) foram utilizadas duas concentrações de RR[®] (0,5 e 5 %). Os extratos obtidos foram diluídos para 1000; 500; 200; 100; 10; 0,1 e 0,01 ng e analisados em duplicata. O LD foi considerado como a menor concentração de DNA que amplificasse o fragmento de tamanho esperado no gel de agarose nas duas repetições. Nas amostras contendo 0,5 % de soja RR[®] considerou-se como LD 10, 500 e 500 ng e nas

amostras contendo 5 % os LD foram 1, 100 e 100 ng para a sequência CP4 EPSPS, promotor CaMV 35S e terminador T-NOS, respectivamente.

SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008) determinaram o LD, em triplicata, analisando 50, 20 e 10 cópias de DNA alvo, por reação. Os LD obtidos para o promotor CaMV 35S, terminador T-NOS e gene de construção específica RR[®] foi de 10 cópias, correspondendo a 0,03 % de soja RR[®]. Contudo, não foi informado o critério de aceitação para nenhum dos parâmetros avaliados.

BAHRDT *et al.* (2010) obtiveram um LD menor do que 10 cópias de DNA alvo no ensaio hexaplex.

KODAMA *et al.* (2012) avaliaram dois níveis de concentração de soja RR[®] (0,05 e 0,1 %), mais o branco, em sextuplicata. Foi utilizado o critério que define o LD como sendo o menor nível de analito em que se observou TFN menor que 5 %, com desvio padrão da reprodutibilidade (CON) menor ou igual a 33 %. O LD estimado foi de 0,1 %

MANO *et al.* (2012) estudaram as concentração de soja RR[®] de 0,05 e 0,1 %, em triplicata, sendo que os extratos foram submetidos a 7 análises de PCR, correspondendo a um total de 21 resultados por amostra. O critério utilizado foi o mesmo reportado por KODAMA *et al.* (2012), obtendo-se um LD de 0,05 %.

Apenas um dos estudos relacionados apresentou LD menor que o obtido no presente trabalho e todos os demais reportaram valores de LD superiores. Contudo, não foi possível estabelecer um parâmetro para comparação, visto que diferentes números de replicatas, delineamentos experimentais e critérios foram utilizados. O critério adotado por LEIMANIS *et al.* (2008), KODAMA *et al.* (2012) e MANO *et al.* (2012) foi similar ao adotado no presente estudo – LD correspondente a uma TCF e TSB de 95 %, ou seja, a uma TFN de 5 %. Porém, a forma de estimar o LD pelos referidos autores não foi a mesma. A estimativa do LD adotada representa a atual tendência na validação de provas qualitativas, a qual permite a obtenção deste parâmetro a partir de um modelo de regressão, que é estimado com um número significativo de determinações, 270 neste caso.

Nos trabalhos de LIPP *et al.* (2001) e nos estudos de validação do compêndio do JRC (2011) não foi abordada a determinação do LD.

5.1.2.3 ACORDÂNCIA E CONCORDÂNCIA

No nível de 1% de soja RR[®] foram obtidas ACO e CON satisfatórias para ambas as formas de quantificação dos resultados positivos.

Na **Figura 20** encontram-se representações gráficas dos valores de ACO obtidos nas quantificações por eletroforese em gel de agarose e fluorimetria dos resultados em função da concentração de soja RR[®]. Os níveis estudados externos à RPC, para quantificação por gel de agarose (**Figura 20 a**), foram 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035 %, nos quais a ACO variou entre 0,53 e 1,0. Valores de ACO maiores ou iguais a 0,95, ou seja, dentro dos critérios de aceitabilidade, foram obtidos nos níveis 0,0; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035 %, para a bateria analítica 3. Para as baterias analíticas 1 e 2, somente foram aceitáveis os valores de ACO calculados a partir do nível 0,030 %, além do nível 0 %. Assim, CON adequada (maior ou igual a 0,95) somente foi alcançada nos níveis 0,0; 0,030 e 0,035 % (**Figura 21 a**).

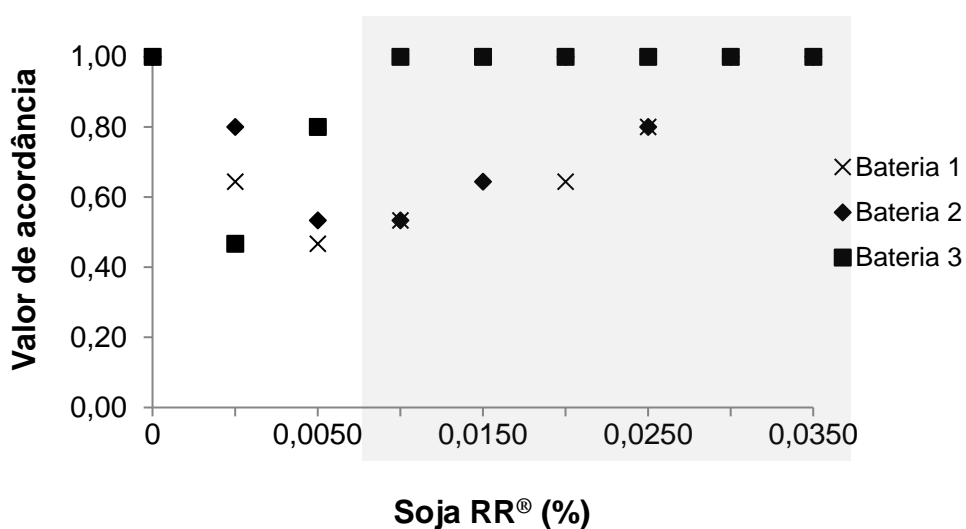
Considerando a quantificação fluorimétrica, os níveis estudados externos à RPC foram 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035 %, que apresentaram ACO entre 0,64 e 1,0 (**Figura 20 b**). A partir do nível 0,015 %, foram obtidos valores de ACO iguais a 1,0 para a bateria analítica 3. Para a bateria analítica 2, valores de ACO iguais a 1,0 foram obtidos a partir do nível 0,020 % e para a bateria analítica 1, a partir do nível 0,030 %. Assim, CON maior ou igual a 0,95 somente foi alcançada nos níveis 0,0; 0,030 e 0,035 % (**Figura 21 b**).

De modo geral, para ambas as formas de quantificação, o comportamento da ACO e CON do método foi influenciado pela concentração dos analitos, conforme previsto por ELLISON & FEARN (2005). Além disso, foi observado o comportamento esperado para ACO numa mesma bateria analítica de declínio dos valores até um valor intermediário da RPC e, a partir desse ponto, aumento nos valores de ACO até

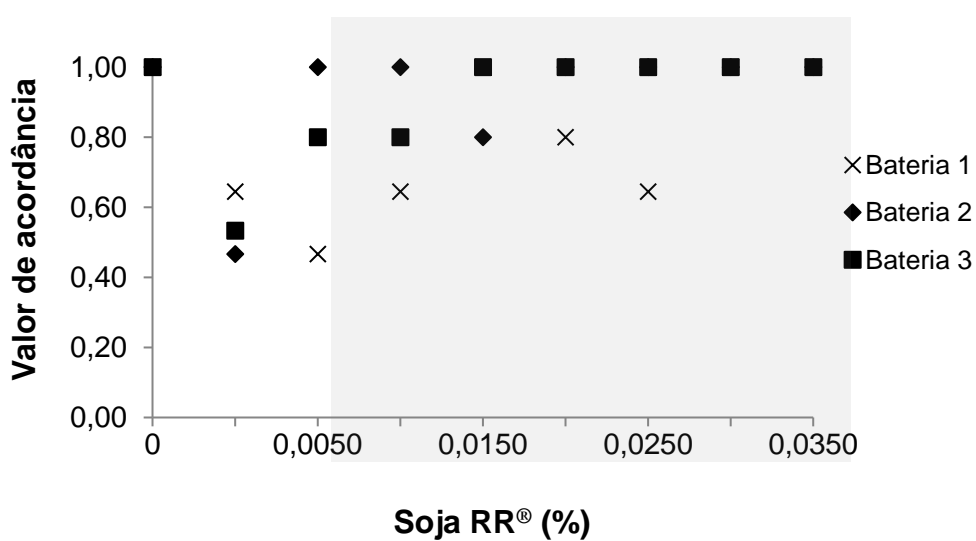
o valor máximo de 1,0. Tais parâmetros indicam se o método utilizado é suficientemente “padronizado” (LANGTONN *et al.*, 2002).

O único trabalho da literatura de escopo similar que envolveu estudos de ACO e CON foi o de KODAMA *et al.* (2012). Os valores de ACO e CON obtidos para 0,05 % de soja RR[®] foram 0,88 e 0,89 e para 0,1 % de soja RR[®] 0,96 e 0,95, respectivamente. No presente trabalho, ACO e CON de 1,0 foram obtidas em níveis inferiores de concentração, caracterizando melhor precisão. Uma justificativa para os menores valores de CON obtidos no estudo de KODAMA *et al.* (2012) é o fato deste ter sido estruturado em um estudo colaborativo, para o qual se espera maior variabilidade.

Estudos de MEYER & JACCAUD (1997), LIPP *et al.* (1999), LIPP *et al.* (2001), TAVERNIERS *et al.* (2001), LEIMANIS *et al.* (2008), MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS (2008), SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008), BAHRDT *et al.* (2010), JRC (2011) e MANO *et al.* (2012) não envolveram o estudo de precisão – ACO e CON – aplicável às provas qualitativas.

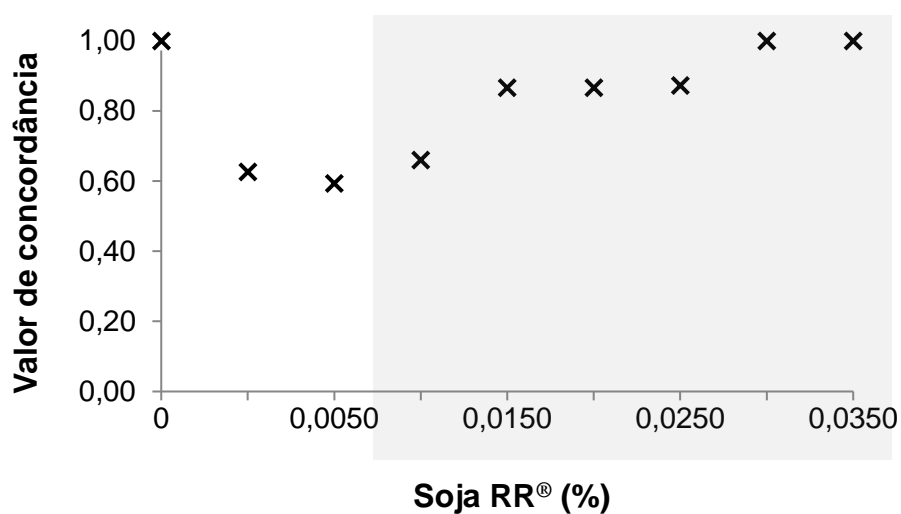


(a)

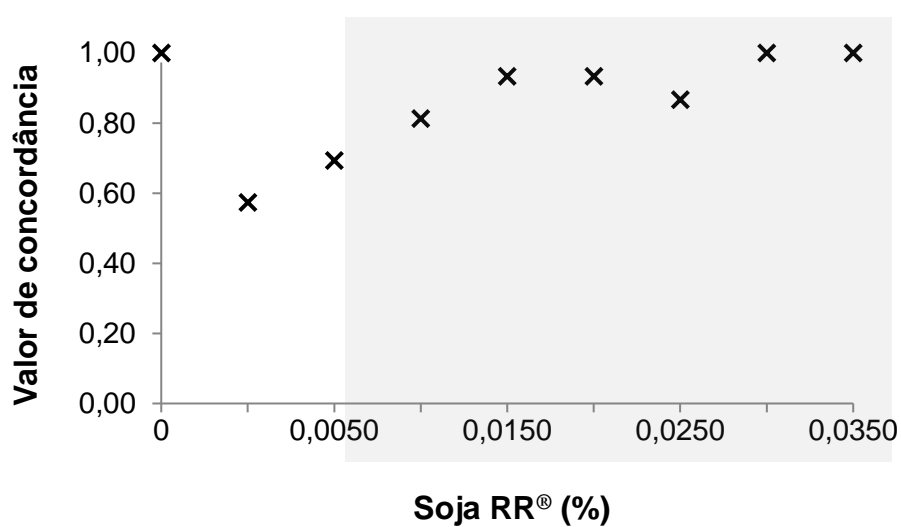


(b)

Figura 20. Valores de acórdância em função das concentrações estudadas de soja RR®, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) – quantificação por eletroforese em gel de agarose (a) e fluorimetria (b).



(a)



(b)

Figura 21. Valores de concordância em função das concentrações estudadas de soja RR®, com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade (área sombreada) - quantificação por eletroforese em gel de agarose (a) e fluorimetria (b).

5.1.2.4 RASTREABILIDADE METROLÓGICA

Tanto na validação de métodos quanto na estruturação de procedimentos de controle de qualidade analítico são necessários elementos de referência que assegurem a rastreabilidade das grandezas básicas relevantes.

Neste estudo, a rastreabilidade metrológica foi assegurada pelo emprego de equipamentos calibrados por laboratórios acreditados e pelo uso de MRC. A mesma conduta foi adotada nas pesquisas de LIPP *et al.* (1999), TAVERNIERS *et al.* (2001), LEIMANIS *et al.* (2008), MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS (2008), SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008), BAHRDT *et al.* (2010) e em quatro das seis validações do compêndio do JRC (2011). No entanto, tais materiais não foram utilizados em diversos trabalhos de validação de escopo similar ao do presente trabalho, como MEYER & JACCAUD (1997), LIPP *et al.* (2001), duas das seis validações do compêndio JRC (2011), KODAMA *et al.* (2012) e MANO *et al.* (2012).

5.1.3 AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA SELETIVIDADE

Os resultados da investigação inicial com os seis eventos de milho foram todos negativos, como mostrado na **Figura 22**.

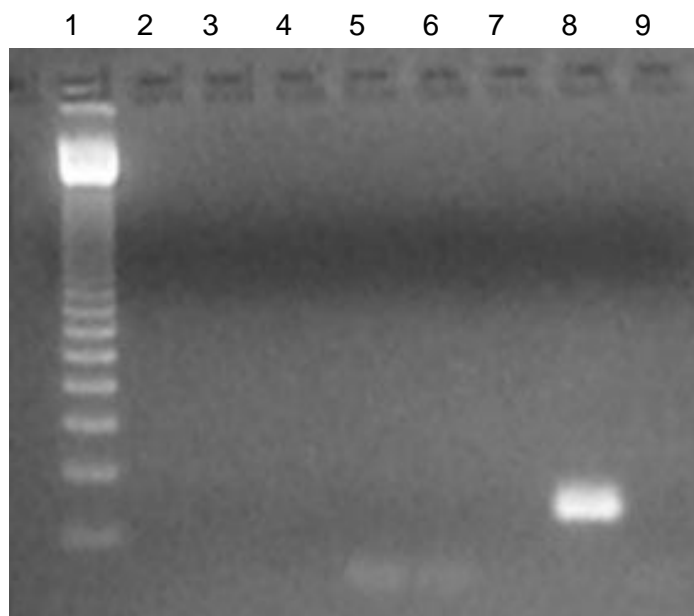


Figura 22. Detecção de milho por *Nested* PCR. Canaleta 1: padrão 123 pb (Invitrogen); canaleta 2: milho Bt 11(5 %); canaleta 3: milho MON 810 (5 %); canaleta 4: milho GA21 (5 %); canaleta 5: milho NK603 (5 %); canaleta 6: milho TC1507 (10 %); canaleta 7: milho Bt176 (2 %); canaleta 8: controle positivo (soja RR[®] 5 %); e canaleta 9: controle negativo da reação.

Os resultados obtidos na avaliação da seletividade com os milhos selecionados Bt11 e GA21 indicaram que não houve efeito supressor nem potencializador destes na detecção de soja RR[®], considerando as duas formas de quantificação de DNA avaliadas. Isto porque não foi observada variação maior que 5 % nas TCF (GONDIM, 2012). Assim, não houve alteração na TFP para as amostras brancas e na TFN para amostras adicionadas de soja, quando as mesmas estavam na presença dos dois tipos de milho. Conseqüentemente, não houve variação nas TCF, que permaneceram em 100 %, em todos os casos. Desse modo, concluiu-se pela seletividade do método para detecção de soja RR[®] em relação aos potenciais interferentes milho Bt11 e GA21 (**Tabela 16**).

Tabela 16. Taxas de falso-positivos, de falso-negativos e de confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de soja *Roundup Ready*[®], em nível com 100 % de confiabilidade, na presença de milho Bt11 e GA21

Concentração	Eletroforese em gel de agarose			Fluorimetria		
	TFP	TFN	TCF	TFP	TFN	TCF
Milho Bt11 (2,0%)	0	-	100	0	-	100
Milho Bt11 (2,0 %) e soja RR [®] (0,03%)	-	0	100	-	0	100
Milho GA21 (2,0 %)	0	-	100	0	-	100
Milho GA21 (2,0 %) e soja RR [®] (0,03 %)	-	0	100	-	0	100

TFP = taxa de falso-positivos, TFN = taxa de falso-negativos, TCF = taxa de confiabilidade.

TAVERNIERS *et al.* (2001) e MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS (2008) não incluíram nenhum estudo de seletividade nos seus processos de validação.

Nos trabalhos de MEYER & JACCAUD (1997), LIPP *et al.* (1999), LIPP *et al.* (2001), SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008), estudos do compêndio JRC (2011), KODAMA *et al.* (2012) e MANO *et al.* (2012) não foram contemplados os estudos de seletividade frente a interferentes.

LEIMANIS *et al.* (2008) e BAHRDT *et al.* (2010) realizaram ensaios de PCR multiplex. Neste tipo de análise foram testados diferentes eventos de diferentes matrizes em proporções distintas frente a outros eventos, verificando a inibição de algum evento ou a presença de efeitos competitivos.

LEIMANIS *et al.* (2008) concluíram que não houve interação entre os amplicons na etapa de hibridização e BAHRDT *et al.* (2010) comprovaram a seletividade de uma cópia de DNA alvo, para todos os sistemas, na presença de 64 cópias de outro OGM.

5.1.4 AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

Pela análise da **Tabela 17**, observou-se que houve alteração na TCF para quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose, utilizando a Taq DNA polimerase marca B e concentração de DNA de 25 ng/ μ L. Ao fazer a quantificação do DNA pela análise visual do gel de uma das amostras, lhe foi conferido o valor de 200 ng/ μ L. Na quantificação fluorimétrica o valor calculado para a mesma condição foi de 98 ng/ μ L. Assim, ao diluir o DNA para concentração final de 25 ng/ μ L, o DNA proveniente da eletroforese foi diluído oito vezes e o do fluorímetro quatro. Provavelmente, devido à maior diluição do DNA proveniente da eletroforese, foi obtido um resultado falso-negativo para a amostra. Considerando-se esta hipótese, o falso resultado não seria relacionado com a marca da enzima Taq DNA polimerase, mas sim com a combinação dos fatores concentração e técnica de quantificação de DNA. A eletroforese em gel de agarose tem a limitação da análise visual das bandas, que é subjetiva.

Houve variação na TCF, embora tenha sido menor que 10 %, para o experimento que empregou eletroforese em gel de agarose, Taq DNA polimerase marca B e concentração de 25 ng/ μ L de DNA. Assim, tanto na quantificação por eletroforese quanto na fluorimétrica, robustez foi observada para todas as condições avaliadas.

Tabela 17. Avaliação da robustez frente aos fatores concentração de DNA (ng/μL) e marca da Taq DNA polimerase para soja *Roundup Ready*[®] – quantificação por gel de agarose e fluorimetria.

Taq DNA polimerase	Concentração de DNA (ng/μL)	Eletroforese em gel de agarose		Fluorimetria	
		Soja RR [®]			
		TCF	Resultado*	TCF	Resultado*
A	25	100	Robusto	100	Robusto
B	25	90	Robusto	100	Robusto
A	50	100	Robusto	100	Robusto
B	50	100	Robusto	100	Robusto
A	75	100	Robusto	100	Robusto
B	75	100	Robusto	100	Robusto

* Critério para estabelecimento do resultado: taxa de confiabilidade (TCF) ≥ 90 %

SIERADZKI, MAZUR & KWIATEK (2008) verificaram a robustez da PCR utilizando três lotes de reagentes da PCR. Não foram observadas diferenças significativas nas reações de PCR em relação a sensibilidade, seletividade e LD.

Os estudos de MEYER & JACCAUD (1997), LIPP *et al.* (1999), LIPP *et al.* (2001), TAVERNIERS *et al.* (2001), LEIMANIS *et al.* (2008), MARCELINO, GUIMARÃES & DE-BARROS (2008), BAHRDT *et al.* (2010), JRC (2011), KODAMA *et al.* (2012) e MANO *et al.* (2012) não avaliaram a robustez.

5.2. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO

Na **Figura 23** estão representados os dados experimentais, em porcentagem de resultados positivos, das quantificações por eletroforese em gel de agarose (em preto) e por fluorimetria (cinza) das análises para detecção de soja RR[®]. A análise visual do perfil desses gráficos sinaliza que a técnica por fluorimetria se mostrou mais eficiente na detecção de resultados positivos, o que foi confirmado pelo

emprego do teste de t emparelhado, o qual indicou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de quantificação na detecção de soja RR[®]. O valor da estatística t obtido foi $t_{GL=9} = 2,54$ ($p = 0,032$). Porém, observou-se que nas concentrações de 0; 0,025; 0,030; 0,035 e 1,0 %, os resultados para ambas as técnicas foram coincidentes e satisfatórios.

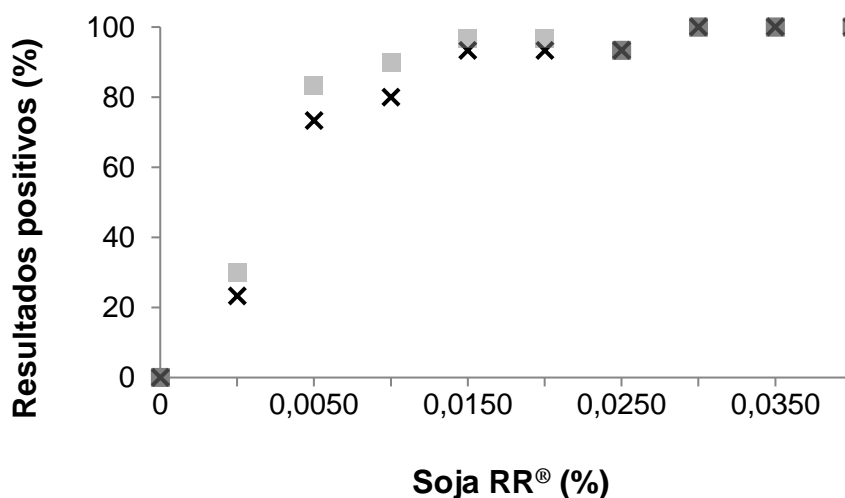
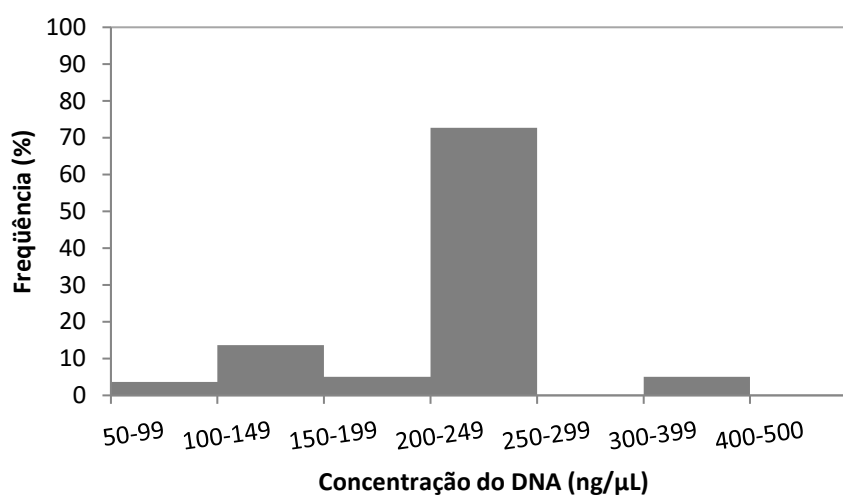


Figura 23. Resultados experimentais das formas de quantificação por eletroforese em gel de agarose (x) e por fluorimetria (■) para soja *Roundup Ready*[®].

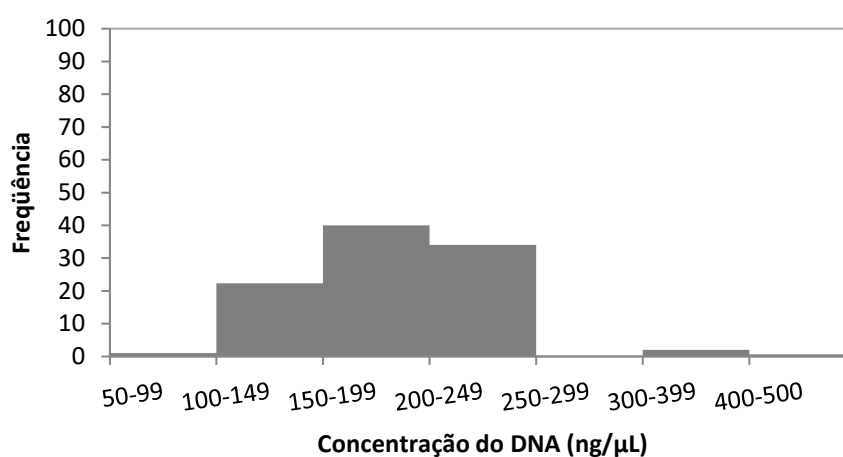
Comparando-se as duas formas de quantificação, pelos parâmetros da validação, percebeu-se que, assim como houve diferença significativa nas proporções de resultados positivos e, conseqüentemente, nas taxas (TFN, TSB e TCF), houve também diferença nos demais parâmetros avaliados no segundo experimento da validação (RPC, LD, ACO e CON). Os resultados da avaliação da seletividade (efeito de interferentes) não divergiram nas duas técnicas. Já na robustez, observou-se a limitação do gel quanto à quantidade real de DNA presente na amostra, podendo levar a resultados falso-negativos e comprometendo a confiabilidade do resultado.

O resultado da comparação entre as técnicas era esperado, uma vez que a quantificação por eletroforese em gel de agarose é subjetiva e, por isso, mais sujeita a erros.

Na **Figura 24** estão ilustrados os histogramas das frequências das concentrações de DNA obtidas através da eletroforese em gel de agarose (**Figura 24 a**) e fluorimetria (**Figura 24 b**). Em relação às quantificações realizadas no gel, das 300 amostras analisadas, 218 (72 %) apresentaram DNA na faixa de 200-249 ng/ μ L. E em relação às quantificações obtidas no fluorímetro, estas variaram nas faixas de 100-149 (22 %), 150-199 (40 %) e 200-249 ng/ μ L (34 %).



(a)



(b)

Figura 24. Histograma das concentrações de DNA das amostras cegas do processo de validação determinadas por eletroforese em gel de agarose (a) e por fluorimetria (b).

Assim, pode-se confirmar que a técnica de quantificação do DNA por eletroforese em gel de agarose estaria superestimando os teores do DNA, podendo gerar resultados falso-negativos, uma vez que este DNA será mais diluído do que o proveniente da quantificação fluorimétrica.

Na **Figura 25** está representado o resultado típico da eletroforese em gel de agarose para a quantificação do DNA.

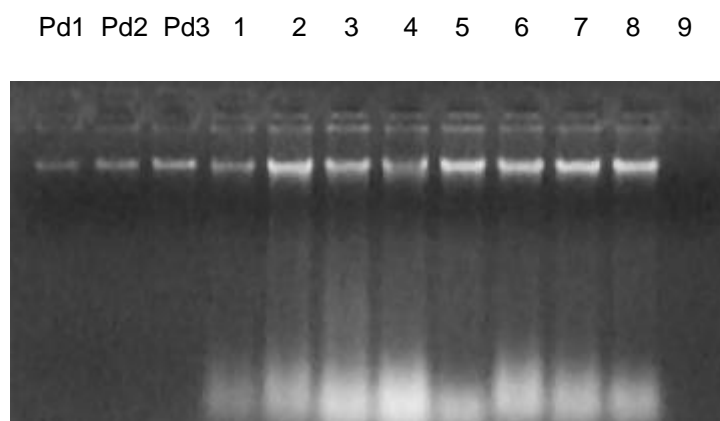


Figura 25. Resultado típico da eletroforese em gel de agarose para determinação visual da concentração de DNA das amostras cegas do processo de validação. Padrão DNA íntegro de bacteriófago lambda (Pd1, Pd2 e Pd3 correspondentes às concentrações de 50, 100 e 200 ng/ μ L); canaleta 1: 100 ng/ μ L; canaleta 2: 200 ng/ μ L; canaleta 3: 150 ng/ μ L; canaleta 4: 100 ng/ μ L; canaletas 5-8: 200 ng/ μ L e canaleta 9: controle negativo da extração.

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Foram analisadas, em 2012, 17 amostras de soja em grão coletadas pela Vigilância Sanitária do Estado de Minas Gerais, empregando o método validado.

Após a análise qualitativa, foram conferidos resultados positivos para 11 amostras, além de um resultado indeterminado e cinco resultados negativos. As 11 amostras positivas foram analisadas por método quantitativo para determinar a porcentagem de soja RR[®]. Todas as amostras positivas apresentaram teor menor que 1 % na confirmação.

Das amostras analisadas, uma continha informação no rótulo indicando que era livre de transgênicos. Nas demais amostras esta informação não estava presente. A amostra que informava a ausência de transgênicos, apresentou resultado negativo, confirmando a adequação do rótulo à legislação brasileira.

Assim, 100 % das amostras de grãos de soja coletadas pela Vigilância Sanitária estadual no ano de 2012 estavam em conformidade com a legislação brasileira.

6 CONCLUSÕES

- A validação do método qualitativo para detecção de soja RR[®] em grãos de soja por *Nested PCR* indicou sua adequação aos propósitos de uso, pela avaliação dos parâmetros de desempenho característicos de ensaios qualitativos (taxas de falsos resultados, TSB, TST, TCF, RPC, LD, ACO, CON e robustez).
- TFN, TSB e TCF obtidas sinalizaram adequada sensibilidade do método na detecção de soja RR[®] em grãos de soja, o que foi confirmado pela estimativa de LD significativamente abaixo dos limites regulamentados.
- TFP nula e a ausência de interferência dos milhos Bt11 e GA21 na detecção de soja RR[®] demonstraram a seletividade do método.
- Estudos de ACO e CON indicaram padronização adequada da metodologia acima de 0,030 % de RR[®].
- Tanto na quantificação por eletroforese quanto na fluorimétrica, robustez foi evidenciada para diferentes marcas de enzima Taq DNA polimerase e concentrações de DNA.
- O resultado da comparação entre as técnicas de quantificação de DNA indicou melhor desempenho da fluorimetria, embora a técnica de eletroforese em gel de agarose também tenha apresentado resultados confiáveis para o escopo da validação.
- As amostras de grãos de soja coletadas pela Vigilância Sanitária do estado de Minas Gerais apresentaram conformidade em relação a legislação brasileira.
- O levantamento de estudos de validação qualitativa para análise de soja RR[®] em grãos e derivados de soja demonstrou que, mesmo após a publicação do guia do *Codex Alimentarius*, importantes parâmetros de desempenho não têm sido abordados nos estudos de validação de métodos para OGM que fornecem respostas binárias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, Othon Silva. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados**: produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP. 2008. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (Brasil). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou saúde**. Alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/alimentos>>. Acesso em: 31 ago. 2011.

AGUILERA, E. *et al.* Robustness in qualitative analysis: a practical approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 621-627, 2006.

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnol.**, Greenville, v. 20, p. 215-223, 2002.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Challenges women to take the Go Red For Women Heart CheckUp**. Dallas. 2006. Disponível em: <http://www.goredforwomen.org/press_release.aspx?release_id=926>. Acesso em 12 set. 2011.

ANKLAM, E. *et al.* Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **Eur. Food Res. Technol.**, Heidelberg, v. 214, n. 1, p. 3-26, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT NBR ISO 9000:2005. **Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário**. Rio de Janeiro, 2005. 35p. (b)

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT NBR ISO 9001:2008. **Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos**. Rio de Janeiro, 2008. 28p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005. 31p. (a)

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, Nova York, v. 71, p. 441-451, 1981.

BAHRDT, C. *et al.* Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2103-2112, 2010.

BELLOCCHI, G. *et al.* Testing the interaction between analytical modules: an example with Roundup Ready® soybean line GTS 40-3-2. **BMC Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 1-14, 2010.

BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans**. Rome, Italy: FAO, 1992. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e00.htm>>. Acesso em: 23 ago. 2011.

BERTHEAU, Y. *et al.* Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 85, n. 3, p. 801-808, 2002.

BIOSAFETY CLEARING-HOUSE. **The Cartagena Protocol**. Parties to the Protocol and signatories to the Supplementary Protocol. 2011. Disponível em: <<http://bch.cbd.int/protocol/parties/>>. Acesso em: 04 set. 2011.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1987. 61p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 21).

BRANQUINHO, M. R. **Estudo da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos pela técnica da reação em cadeia pela polimerase em tempo real: desenvolvimento de método evento específico**. 2010, 140f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2010

BRASIL. **Decreto número 3.871**, de 18 de julho de 2001. Disciplina a rotulagem de alimentos embalados que contenham ou sejam produzidos com organismo geneticamente modificados, e dá outras providências. 2001. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2001/D3871.htm> Acesso em: 4 set. 2011.

BRASIL. **Decreto número 4.680**, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 abr. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4680_03.htm> Acesso em: 4 set 2011. (a)

BRASIL. **Decreto número 5.705**, de 16 de fevereiro de 2006. Promulga o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica.

BRASIL. **Lei número 10.688**, de 13 de junho de 2003. Estabelece normas para a comercialização da produção de soja da safra de 2003 e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jun 2003, Seção 1, p. 1. (b)

BRASIL. **Lei número 10.814**, de 15 de dezembro de 2003. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2004, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 dez. 2003, Seção 1, p. 1. (c)

BRASIL. **Lei número 11.092**, de 12 de janeiro de 2005. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2005, altera a Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 jan. 2005, Seção 1, p. 10. (b)

BRASIL. **Lei número 11.105** de 24 de março de 2005. Estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 mar. 2005. (a)

BRASIL. **Lei número 8.078**, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 set. 1990.

BRASIL. **Lei número 8.974**, de 5 de janeiro de 1995. Regulamenta os incisos II e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados, autoriza o Poder Executivo a criar, no âmbito da Presidência da República, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 jan. 1995.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Aprovações comerciais**. 2013. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em 23 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Comunicado número 54**. Solicita da CTNBio liberação comercial de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida Roundup Ready. Diário Oficial da União nº 188, Brasília, DF, 01 out. 1998, Seção 3, p. 56. (a)

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Instrução Normativa CTNBio número 18**, de 15.12.98. Dispõe sobre a liberação planejada no meio ambiente e comercial da soja Roundup Ready. 1998. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11980.html>> Acesso em: 4 set. 2011. (b)

BRASIL. **Portaria número 2658**, de 22 de dezembro de 2003. Define o símbolo de que trata o art.2º, § 1º, do Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 22 dez. 2003. (d)

BRASIL. **Portaria número 795**, de 15 de dezembro de 1993. Aprova as Normas de Identidade, Qualidade, Embalagem, Marcação e Apresentação do Óleo e do Farelo de Soja.

BRETT, G. M. *et al.* Design and development of immunoassays for detection of proteins. **Food Control**, Norwich, v. 10, n. 6, p. 401-406, 1999.

BROD, Fábio Cristiano Angonesi. **Detecção por PCR e quantificação por PCR em tempo real de Soja Roundup Ready™ em proteína texturizada de soja, extrato**

de soja e ingredientes alimentares. 2006. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

BRUM, A. L. **A economia mundial da soja:** impactos na cadeia produtiva da oleaginosa no Rio Grande do Sul 1970-2000. Ijuí: Unijui, 2002, 176 p.

CABRAL, L. C.; MODESTA, R. D. **A soja na alimentação humana.** Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA, 1981. p.17-20.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative Analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 477-487, 2005.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Soja:** potencial de uso na dieta brasileira. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. (EMBRAPA-CNPSo. Documento, 113).

CÉLERES. **Relatorio de biotecnologia.** 2011. Disponível em: http://dl.dropbox.com/u/19133716/RelBiotecBrasil_1102.pdf Acesso em: 20.08.2011.

CODEX ALIMENTARIUS. **ALINORM 10/33/23.** Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Thirty-third Session, Geneva, 5-9 July 2010. Report of the thirty-fist session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling. Budapeste. 2010. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/report/738/al33_23e.pdf> Acesso em: 30 ago. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira:** grãos safra 2012/2013. Quarto levantamento Janeiro 2013. Brasília: Conab. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf> Acesso em 10 jan. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Estudos de prospecção de mercado.** Safra 2012/2013. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_11_16_41_03_prospecao_12_13.pdf> Acesso em 10 jan. 2013.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.

CONTRI, Daniela Gazoto. **Detecção de resíduos de DNA em alimentos: Avaliação da qualidade, da quantidade e da capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de matérias-primas e produtos acabados para fins de análise de transgenia.** 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2006.

CORBISIER, P. *et al.* Quantitative determination of Roundup Ready soybean (Glycine max) extracted from highly processed flour. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 282-290, 2005.

COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: I. Mânica. 1996. 233 p.

CRESPO, M. T. B. *et al.* Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, v. 69, p. 33-37, 2001.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 1699-1723, 1995.

CURY, P. R.; FURUSE, C.; ARAÚJO, N. S. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. **Rev. Odontol.** Araçatuba; v. 26, n. 2, p. 34-39, 2005.

DAVIDSON COLLEGE. Department of Biology. **Western Blot Procedure**. 2011. Disponível em: <<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/Westernblot.html>>. Acesso em: 30 set. 2011.

DINON, Andréia Zilio. **Desenvolvimento de iniciadores e sondas para detecção de cry1A.105 e cry2Ab2 e aplicação de PCR e PCR em tempo real para detecção de OGM em alimentos**. 2011. 129p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DINON, Andréia Zilio. **Detecção por PCR de milho geneticamente modificado (MON810) em farinha de milho, fubá, biju e polenta**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ELLISON, S. R. L. Uncertainties in qualitative testing and analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 5, p. 346-348, 2000.

ELLISON, S. L. R; FEARN, T. Characterising the desempenho of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 468-476, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). EMBRAPA Soja. **Soja: história**. 2011. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=8&op_page=112> Acesso em: 23 ago. 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro**. 2010. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc319_2ED.pdf> Acesso em: 20 ago. 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Soja: cronologia do embargo judicial**. 2003. Disponível em:

<http://www.cnpso.embrapa.br/download/cronologia_sojarr.pdf> Acesso em: 04 set. 2011.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr.**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Community reference laboratories residues**. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). 2010. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf> Acesso em: 12 set. 2011.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL). **Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing**. Version 13-10-2008. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf> Acesso em: 10 ago. 2012.

FEDERIZZI, L. C. **A soja como fator de competitividade no mercosul**: histórico, produção e perspectivas futuras. Porto Alegre: Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios - CEPAN/UFRGS, 2005. 16 p.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **J. AOAC Int.**, v. 85. 2002. 25 p.

FERREIRA, Renata Trotta Barroso. **Determinação de soja Roundup Ready em alimentos**. 2006. 86 f. (Dissertação, Mestrado em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2006.

FITZHUGH, H. A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 4, p.1036-1051, 1976.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food labeling guide**. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodLabelingNutrition/FoodLabelingGuide/default.htm>> Acesso em: 31 ago. 2011.

FUNDAÇÃO INSTITUTO DE PESQUISAS ECONÔMICAS (FIPE). **Agricultura: O Agronegócio da Soja: Produção Nacional e Mercado Global**. 2012. Disponível em:

<http://www.fipe.org.br/publicacoes/downloads/bif/2012/8_3-6-agr.pdf> . Acesso em: 10 jan. 2013.

GARCÍA-CANAS, V.; CIFUENTES, A.; GONZÁLEZ, R. Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescence. **Analytical Chemistry**, v.76, p. 2306-2313, 2004.

GMO DETECTION METHOD DATABASE (GMDD). **Method Database**. 2013. Disponível em: <http://gmdd.shgmo.org> Acesso em: 1 fev. 2013.

GMO TESTING. **Immuno-analysis**. 2013. Disponível Em: <<http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Immuno-analysis.aspx>>. Acesso em: 1 fev. 2013.

GONDIM, Carina de Souza. **Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru**. 2012.156 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GONDIM, C. S.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Tendências em validação de métodos de ensaio qualitativos com aplicação em análise de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 70, n. 4, p. 433-447, 2011.

GOWIK, P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 13, p. 8051-8058, 2009.

GREINER, R. Methods for identification and quantification of genetically modified material in agricultural crops, processed food and animal feed in relation to regulatory requirements. **Journal of International Biotechnology Law**, v. 1, p. 81-85, 2005.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR, G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

HEATHERLY, L. G. **Sustainability of U.S. soybean production: organic, traditional, and transgenic production systems**. Special Publication 30. 2009. Disponível em: <http://unitedsoybean.org/images/uploads/multimedia/Portuguese_LO_pt%5B1%5D.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2011.

HOLST-JENSEN, A. *et al.* PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 985-993, 2003.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331-343, 1995.

HÜBNER, P.; BURGENER, M.; LÜTHY, J. Application of molecular biology for the identification of fish. In R. Amado, R. Battaglia (Eds.), **Proceedings of the ninth**

europaean conference on food chemistry, Authenticity and adulteration of food: the analytical approach, Interlaken, v. 1, p. 49-54, 1997.

HÜBNER, P. *et al.* Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 6, p. 1855-1864, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE. **Estatística da produção agrícola**. Outubro de 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201210.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008**. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Establishment of guidelines for the validation of qualitative and semi-quantitative (screening) methods by collaborative trial**: a harmonized protocol. Disponível em: <http://www.iupac.org/web/ins/2005-024-2-600>. Acesso em: 06 jun. 2012.

INVITROGEN. **Qubit® 2.0 Fluorometer**. User manual. 2010. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/Qubit-all-file-types.Par.0519.File.dat/Qubit-2-Fluorometer-User-Manual.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2013.

JAMES, C. **Preview**: global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. ISAAA Briefs N°. 42. Ithaca, NY: ISAAA, 2011.

JOINT RESEARCH CENTER (JRC). **Event-specific method for the quantification of maize line NK603 using real-time PCR**. Protocol. 2005. Disponível em: <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603-WEB-Protocol%20Validation.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2011.

JOINT RESEARCH CENTER (JRC). **Reference reports. Compendium of reference methods for GMO analysis**. 2011. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/pcr/GMO-JRC_Reference%20Report_2011.pdf>. Acesso em: 27 set. 2011.

KODAMA, T. *et al.* Qualitative PCR method for Roundup Ready soybean: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 94, p. 224-231, 2011.

KOK, E. J. *et al.* DNA methods: critical review of innovative approaches. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 797- 800, 2002.

LAJOLO, F. M.; NUTTI, M. R. **Transgênicos**: bases científicas da sua segurança. São Paulo: SBAN, 2003. 112 p.

LANGTONN, S. D. *et al.* Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. **Int. J. Food Microbiol.** v. 75, p. 175-181, 2002.

LEIMANIS, S. *et al.* Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 1621-1632, 2008.

LIPP, M. *et al.* IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 4, p. 923-928, 1999.

LIPP, M. *et al.* Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. **European Food Research Technology**, v. 212, p. 497-504, 2001.

LIPTON, C. R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. **Food Agricultural and Immunology**, v. 12, p. 153-164, 2000.

LÜTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control**, v. 10, p. 359-361, 1999.

MAGIN, K. *et al.* **Methods for detection of GMO grain in commerce**. 2000. Disponível em: <<http://www.massey.ac.nz/~ychisti/GrainRpt.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2011.

MANO, J. *et al.* Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 2, p. 508-516, 2012.

MARCELINO, F. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; DE-BARROS, E. G. Detection and quantification of Roundup Ready® soybean residues in sausage samples by conventional and real-time PCR. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p. 38-45, 2008.

MARCELINO, Francismar Corrêa. **Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. 2006. 132 f. Tese (Pós graduação em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARKOULATOS, P. *et al.* Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. **Food Reviews International**, v. 20, n. 3, p. 275-296, 2004.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of OGMs in food. **Food Control**, v. 10, p. 391-399, 1999.

MEYER, R.; CANDRIAN, U.; LÜTHY, J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 617-622, 1994.

MEYER, R. *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food. Detection of soya in processed meat products. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A.**, v. 203, p. 339-344, 1996.

MEYER, R. *et al.* Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 1542-1551, 1995.

MEYER, R.; JACCAUD, E. Detection of genetically modified in processed food production: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate tolerant soybeans. **Proceedings of the ninth European conference on food chemistry**, v. 1, Interlaken, Switzerland, p. 23-28, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Projeções do Agronegócio** – Brasil 2009/10 a 2019/20, Brasília – DF, Junho de 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Proje%C3%A7%C3%B5es%20Agroneg%C3%B3cio%202009-2010%20a%202019-2020.pdf> Acesso em: 20 dez. 2012.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC). **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet**, ALICE-Web, da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX). 2012. Disponível em: <<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2012. Ca

MIRAGLIA, M. *et al.* Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157-1180, 2004.

MORAES, R. M. A. *et al.* Avaliação de ensaio de valor de cultivo e uso de cultivares de soja para alimentação no Rio Grande do Sul, safra 2005/06. In: XXXIV Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul. **Ata e Resumos...** Pelotas: EMBRAPA. 2006.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 15, n. 2, p. 306-315, 2000.

NASCIMENTO, A. P. B. *et al.* Impacto da transgenia na biodiversidade e segurança alimentar. In: **IV ENCONTRO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO** – Universidade do Vale do Paraíba. p. 1229-1232, 2004. Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2004/trabalhos/epg/pdf/EPG2-10Rcerto.pdf>. Acesso e: 12 set. 2011.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 7, p. 481-491, 2000.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar. **Rev Nutr.**, v. 16, p. 105-116, 2003.

O'NEILL, M. *et al.* Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. **Journal of Physics: Conference Series**. v.307, 2011.

PADGETTE, S. R. *et al.* Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PADGETTE, S. R. *et al.* The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 702-716, 1996.

PAN, T. Current status and detection of genetically modified organism. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 229-241, 2002.

PEANO, C. *et al.* Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6962-6968, 2004.

PENHA, L. A. O. *et al.* A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim do CEPPA**, v. 25, n. 1, p. 91-102, 2007.

PETIT, L. *et al.* Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 83-89, 2003.

PULIDO, A. *et al.* Uncertainty of results in routine qualitative analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 647-654, 2003.

QUERCI, M.; JERMINI, G.; VAN DEN EEDE, G. **Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**: user manual. Brussels, European Commission, Joint Research Centre, World Health Organization, 239p., 2006.

QUERCI, M.; MAZZARA, M. Session 7: Characteristics of Roundup Ready Soybean, MON810 Maize and Bt-176 Maize. In: **Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**. User manual. Brussels, European Commission, Joint Research Centre, World Health Organization, 239p., 2006.

REIS, G. N. *et al.* Avaliação do desenvolvimento da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) sob diferentes sistemas de preparo. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 228-235, 2007.

RÍOS, A. *et al.* Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN'. **Accred. Qual. Assur.**, v. 8, p. 68-77. 2003.

RÍOS, A.; TÉLLEZ, H. Reliability of binary analytical responses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 509-515, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2^a ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SCHREIBER, G. A. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. **Food Control**, v. 10, p. 351-352, 1999.

SIERADZKI, Z.; MAZUR, M.; KWIATEK, K. Validation of procedures based on pcr reactions for detection and identification of genetically modified maize and soybean. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 611-614, 2008.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 1, :p. 3-9, 2000.

SILVA, M. S. *et al.* Composição química e valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao grão de Soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SIMONET, B. M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Unreliability of screening methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 516, p. 67-74, 2004.

SOCIETY OF COMMERCIAL SEED TECHNOLOGISTS (SCST). **Lateral Flow Strip Function and Utility.** 2006. Disponível em: <<http://www.seedtechnology.net/docs/IAWG%20Lateral%20Flow%20Strip%20Function%20and%20Utility%201.10.08.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2011.

SOMMA M. Extraction and purification of DNA. Session 4. In: QUERCI M., M. JERMINI, G. VAN DEN EEDE. **Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms:** user manual. Brussels: European Commission. Joint Research Centre. World Health Organization. , 239p., 2006.

SONG, R.; SCHLECHT, P.; ASHLEY, K. Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 83, p. 29–39, 2001.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25–35, 2005.

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos.** 2007. 297f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

STAVE, J. W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs. **Food Control**, v. 10, p. 361-374, 1999.

STAVE, J. W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations and practical considerations. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 780-786, 2002.

STEINER, C. *et al.* Isoflavones and the prevention of breast and prostate cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 78-108, 2008.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). **NEPA/UNICAMP**. T113. V.II. 2 ed. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2006. 113 p.

TAVERNIERS, I. *et al.* Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 6, p. 417-424, 2001.

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

THOMSON, J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. **Trends in Food Science and Technology**, n.14, p. 210-228, 2003.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2004.

TRULLOLS, E. *et al.* Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 516-524, 2005.

UNIÃO EUROPEIA. Glossário. **Princípio da precaução**. 2013. Disponível em: <http://europa.eu/legislation_summaries/glossary/precautionary_principle_pt.htm#> Acesso em: 12 jan. 2013.

UNIÃO EUROPEIA. **Rastreabilidade e rotulagem dos organismos geneticamente modificados (OGM)**. 2003. Disponível em: <http://europa.eu/legislation_summaries/environment/nature_and_biodiversity/l21170_pt.htm>. Acesso em: 20 ago. 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **National Nutrient Database for Standard Reference**. 2011. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: 31 ago. 2011. (a)

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Production, Supply and Distribuiton Online**. 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 31 ago. 2011. (b)

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S. Modern qualitative analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 24, n. 6, p. 467, 2005.

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 11, 1999.

VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Is traceability an exclusive property of analytical results? An extended approach to traceability in chemical analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 359, p. 473-475, 1997.

VAN DER VOET, H. *et al.* Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 159-171, 1999.

VAN DUIJN, G. J. *et al.* Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, v. 10, p. 375-378, 1999.

VENCATO, A. Z. *et al.* **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, 2010, 144 p. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/a%20cultura%20da%20soja.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2011.

VESSMAN, J. *et al.* Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1381-1386, 2001.

YAMAGUCHI, H. *et al.* Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v. 14, p. 201-206, 2003.

YANG, L. *et al.* Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 10, n. 55, p. 15-24, 2007.

YATES, K. **Detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms**. 1999. Disponível em: <<http://www.ilsa.com>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

8 CONSIDERAÇÕES

As referências das publicações deste trabalho encontram-se descritas a seguir:

Resumos em eventos

MIAW, C.S.W.; AMÂNCIO, G.C.S.; ROCHA, V.N.; GONDIM, C.S.; MADEIRA, J.E.G.C.; SOUZA, S.V.C. Validação intralaboratorial de método qualitativo para detecção de soja RR® em grãos de soja por *Nested* PCR: ensaios preliminares. VI Congresso Brasileiro de Soja. *Resumo...* Cuiabá, 2012.

MIAW, C.S.W; AMÂNCIO, G.C.G; GONDIM, C.S; MADEIRA, J.E.G.C; SOUZA, S.V.C. Validation of quantitative and qualitative methods for determination of genetically modified organisms in foods: a critical analysis of The Codex Guideline. 16th World Congress of Food Science and Technology. *Resumo...* Foz do Iguaçu, 2012.

Artigos em periódicos

MIAW, C.S.W; AMÂNCIO, G.C.G; MADEIRA, J.E.G.C; SOUZA, S.V.C. Métodos para detecção de soja *Roundup Ready*® em grãos e produtos de soja por reação em cadeia de polimerase: revisão e análise crítica das práticas para validação (submetido para publicação).

MIAW, C.S.W; AMÂNCIO, G.C.G; ROCHA, V.N.; GONDIM, C.S; JUNQUEIRA, R.G.; MADEIRA, J.E.G.C; SOUZA, S.V.C. In-house validation of a qualitative method for detection of Roundup Ready® soy in soybeans by *Nested* PCR (em elaboração para submissão).

9 APENDICE

Tabela A.1 Resultados para detecção de soja RR[®], quantificação por eletroforese em gel de agarose e fluorimetria, nas três baterias analíticas realizadas na etapa de avaliação das taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Concentração (%)	Quantificação por eletroforese em gel de agarose				Quantificação por fluorimetria			
	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Total
0,0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0010	2	1	4	7	2	4	3	9
0,0050	6	7	9	22	6	10	9	25
0,0100	7	7	10	24	8	10	9	27
0,0150	10	8	10	28	10	9	10	29
0,0200	8	10	10	28	9	10	10	29
0,0250	9	9	10	28	8	10	10	28
0,0300	10	10	10	30	10	10	10	30
0,0350	10	10	10	30	10	10	10	30
1,0000	10	10	10	30	10	10	10	30

ERRATA

MIAW, C. S. W. **Validação de método qualitativo para detecção de soja Roundup Ready® em grãos de soja por Nested PCR (reação em cadeia da polimerase)**. 2013. 156 f. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
58	9	que métodos normalizados...devem ser validados.	“que métodos normalizados...devem ser validados” (GONDIM, 2012).
58	15	(ABNT, 2005 a).	(ABNT, 2005 a; GONDIM, 2012).
58	20	(SOUZA, 2007).	(SOUZA, 2007; GONDIM, 2012).
58	28	(THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).	(THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; GONDIM, 2012).
59	6	Validações ... tempo justificado (EC, 2002).	“Validações ... tempo justificado” (EC, 2002; GONDIM, 2012).
59	12	As validações ... novos métodos (VAN DER VOET et al., 1999).	“As validações ... novos métodos” (VAN DER VOET et al., 1999; GONDIM, 2012).
63	3	(GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011).	(GONDIM, JUNQUEIRA & SOUZA, 2011; GONDIM, 2012).
64	5	Métodos quantitativos ... medida apropriada (EC, 2002; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).	“Métodos quantitativos ... medida apropriada” (EC, 2002; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; GONDIM, 2012).
64	15	(EC, 2002; PULIDO et al., 2003).	(EC, 2002; PULIDO et al., 2003; GONDIM, 2012).
65	15	(ELLISON, 2000).	(ELLISON, 2000; GONDIM, 2012).
65	16	Para avaliar a robustez é indica-se	Para avaliar a robustez indica-se
66	9	(... TRULLOLS,	(... TRULLOLS,

		RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).	RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; GONDIM, 2012).
66	22	...independentes.	...independentes (GONDIM, 2012).
67	10	(... ELLISON & FEARN, 2005).	(... ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM, 2012).
67	12	(PULIDO et al., 2003).	(PULIDO et al., 2003; GONDIM, 2012).
67	16	(... ELLISON & FEARN, 2005).	(... ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM, 2012).
67	18	(PULIDO et al., 2003).	(PULIDO et al., 2003; GONDIM, 2012).
68	8	(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).	(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; GONDIM, 2012).
69	2	(PULIDO et al., 2003).	(PULIDO et al., 2003; GONDIM, 2012).
69	11	(PULIDO et al., 2003).	(PULIDO et al., 2003; GONDIM, 2012).
69	18	(... RÍOS & TELLEZ, 2005).	(... RÍOS & TELLEZ, 2005; GONDIM, 2012).
69	25	(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).	(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; GONDIM, 2012).
70	1	O LD ... erro α e β .	"O LD ... erro α e β " (GONDIM, 2012).
70	18	(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004).	(TRULLOLS, RUISÁNCHEZ & RIUS, 2004; GONDIM, 2012).
71	2	(CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).	(CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; GONDIM, 2012).
71	16	(SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).	(SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; GONDIM, 2012).
71	22	(SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).	(SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; GONDIM, 2012).
72	1	(... TRULLOLS, RUISÁNCHEZ &	(... TRULLOLS, RUISÁNCHEZ &

		RIUS, 2004).	RIUS, 2004; GONDIM, 2012).
72	6	(SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004).	(SIMONET, RÍOS & VALCÁRCEL, 2004; GONDIM, 2012).
72	12	... práctico.	... práctico (GONDIM, 2012).
73	3	(PULIDO et al., 2003).	(PULIDO et al., 2003; GONDIM, 2012).
73	Tabela 6	Tabela 6	Fonte: GONDIM (2012).
74	6	... analito.	... analito (GONDIM, 2012).
77	14	(CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005).	(CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; GONDIM, 2012).
77	20	(ELLISON & FEARN, 2005).	(ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM, 2012).
147	14	156 f.	155 f.