

Métodos para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em grãos e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase: revisão e análise crítica das práticas de validação

Methods for detecting the *Roundup Ready*[®] soy in soybeans and soy products by polymerase chain reaction: a review and critical analysis of current practices of validation

RIALA6/1585

Carolina Sheng Whei MIAW¹, Gláucia Celeste de Souza AMÂNCIO², Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz MADEIRA², Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Bromatologia, Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA), Departamento de Alimentos (ALM), Faculdade de Farmácia (FAFAR), Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Campus da UFMG, Pampulha, CEP 31.270-010. Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: scheilla@bromatologiaufmg.com.br.

²Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA), Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Belo Horizonte, MG, Brasil.

Recebido: 16.05.2013 - Aceito para publicação: 06.03.2014

RESUMO

A informação sobre a origem transgênica de alimentos é muito relevante. Conforme a legislação brasileira e de outros países, o consumidor deve ser informado da natureza transgênica dos alimentos ou ingredientes que contenham ou que sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados (OGM), com presença acima de um limite estabelecido. A necessidade de monitorar a presença e determinar o percentual de OGM em alimentos tem gerado uma constante demanda pelo desenvolvimento de metodologias capazes de detectar, identificar e quantificar o DNA exógeno. Entretanto, esses métodos necessitam ser validados para garantir confiabilidade aos resultados. No presente trabalho, a validação de métodos para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em grãos e produtos de soja por reação em cadeia de polimerase foi contextualizada. Considerando-se atuais tendências em validação de métodos, os guias para validação de métodos específicos para OGM não contemplam todos os parâmetros necessários para avaliar a adequação aos propósitos de uso dos métodos, principalmente no caso de métodos qualitativos. Os parâmetros de desempenho mais frequentemente citados na literatura foram precisão (repetitividade), sensibilidade, linearidade e veracidade para metodologias quantitativas e taxas de sensibilidade e seletividade para qualitativas. Contudo, importantes parâmetros têm sido negligenciados nos processos de validação de métodos deste escopo analítico.

Palavras-chave. validação de métodos, reação em cadeia da polimerase, organismos geneticamente modificados, soja, *Roundup Ready*[®].

ABSTRACT

Information on the origin of transgenic foods is quite relevant. According to the Brazilian and other countries legislations, the consumer must be informed about the nature of transgenic foods and ingredients, which contain or being produced from genetically modified organisms (GMOs), in amount above the established limit. Thus, there is a growing need for evaluating the occurrence of GMOs, and to determine the percentage of them in food. This need has generated a demand for developing methods to detect, identify and quantify the exogenous DNA. However, these methods need to be validated to ensure reliability of the results. This review paper evaluated the validation of methodologies for detecting the *Roundup Ready*[®] soybean in grain and soybean products by polymerase chain reaction. Considering the current trends in method validation, the specific guides for validating GMOs do not include all of the parameters required to assess the fitness for its purpose, especially in the case of qualitative methods. The most frequent parameters reported in the literature were accuracy, precision (repeatability), linearity and sensitivity for quantitative methods, and rates of sensitivity and selectivity for qualitative methods. However, important parameters have been neglected in the validation procedures of this analytical scope.

Keywords. method validation, polymerase chain reaction, genetically modified organisms, soy, *Roundup Ready*[®].

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é um dos produtos agrícolas mais importantes nacional e mundialmente. A safra 2013/2014 de soja no mundo está estimada em 285,30 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor desta oleaginosa com a produção de 85 milhões de toneladas¹. Sob o ponto de vista nutricional, a soja é uma importante fonte proteica, além de possuir funcionalidade reconhecida por órgãos regulamentadores nacionais e internacionais².

Vários países (Estados Unidos, Canadá, Japão, Brasil, Argentina, Comunidade Europeia, entre outros) aprovam a produção e/ou a comercialização de alimentos geneticamente modificados (GM). As principais culturas de organismos geneticamente modificados (OGM) 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 pragas³.

No Brasil, estão aprovados para comercialização 37 produtos agrícolas transgênicos, sendo 19 de milho, 5 de soja, 12 de algodão e 1 de feijão⁴. De acordo com o Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, o consumidor deve ser informado da natureza transgênica dos alimentos ou ingredientes alimentares que estiverem sendo comercializados e que contenham ou que sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima do limite de 1 % do produto⁵.

Nos países da União Europeia, a rotulagem obrigatória é prevista em produtos que apresentam 0,9 % ou mais de OGM nos ingredientes individuais que entraram no seu preparo. Na Suíça, o limite é de 0,1 % e na Rússia e Japão de 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 comercializado⁶.

Desta forma, é fundamental que os laboratórios governamentais e do setor produtivo estejam interessados em desenvolver, padronizar e validar métodos para uma eficaz detecção e quantificação de OGM em alimentos, visando garantir conformidade com requisitos regulamentares e adequada informação ao consumidor^{6,7}.

Métodos baseados na detecção do ácido

desoxirribonucleico (DNA), especialmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recomendados por órgãos internacionais de regulamentação, pesquisa, comércio e certificação para detecção e quantificação de OGM em matérias-primas e alimentos⁸. Isto se deve à maior estabilidade destas moléculas quando comparadas às proteínas. Contudo, os métodos necessitam ser validados para que os resultados obtidos sejam considerados confiáveis. A validação de métodos constitui o estudo dos parâmetros de desempenho de métodos quantitativos e qualitativos, visando à avaliação de sua adequação ao propósito de uso (*fitness for purpose*). Trata-se de um requisito fundamental em sistemas de gestão da qualidade e em processos de acreditação de laboratórios⁹. No entanto, apesar da publicação de alguns documentos orientativos relacionados especificamente à validação de métodos para análise de OGM em alimentos^{10,11}, a estruturação de procedimentos de validação ainda constitui um gargalo para a conformidade de sistemas de gestão da qualidade dos laboratórios da área.

OBJETIVOS

No presente trabalho é apresentada uma discussão sobre as principais técnicas para detecção de soja *Roundup Ready*[®] (RR[®]) em grãos e produtos de soja por PCR, incluindo uma análise crítica dos documentos orientativos relacionados à validação de métodos para detecção de OGM e dos trabalhos de validação publicados na literatura, frente às atuais abordagens sobre o tema.

Análise de OGM em alimentos

A detecção de OGM é baseada na sequência de DNA exógeno ou na proteína transgênica. As etapas analíticas envolvidas na determinação de OGM em alimento são: i) detecção (triagem) de OGM; ii) identificação do OGM, para revelar quais eventos estão presentes e se são autorizados; e iii) quantificação do OGM, para checar a necessidade de declaração na rotulagem ou não, conforme a legislação¹².

Como o DNA é uma molécula estável, alimentos processados são geralmente analisados por métodos baseados na pesquisa desta molécula. Assim, a detecção de DNA recombinante em alimentos é possível por PCR, técnica que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA. Esta técnica

é considerada sensível, seletiva, segura, capaz de detectar uma ampla variedade de eventos e de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, mas expressam a mesma proteína¹³.

Independentemente da variedade de métodos utilizados para análise de DNA, a PCR, nos seus diferentes formatos, tem sido a técnica recomendada pelos órgãos reguladores internacionais e amplamente aplicada na detecção e quantificação de OGM em alimentos e rações, bem como aceita para fins de avaliação da conformidade com propósitos regulamentares¹².

Quantidades significativas de DNA amplificável são, geralmente, difíceis de serem obtidas a partir de alimentos processados uma vez que o DNA pode ser degradado durante o processamento do alimento. 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 (polissacarídeos, lipídeos e polifenóis) ou químicas utilizados durante o procedimento de extração do DNA. Tais componentes são conhecidos por causarem problemas na análise de PCR, pois podem interagir irreversivelmente com as proteínas e ácidos nucleicos, inibindo a PCR¹³.

Devido a estes efeitos, a detecção e quantificação de OGM, estabelecidas durante a validação, devem ser específicas 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-negativos¹⁴.

Segundo Holst-Jensen et al¹⁵, 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 apresenta vários elementos genéticos como o promotor *CaMV P-35S*, o terminador *CaMV T-35S*, ambos do vírus do mosaico da couve-flor, ou o terminador *T-NOS* derivado do gene da nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens*. Os vetores de clonagem mais comumente utilizados são plasmídeo *pBR322* e seus

derivados que contêm 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 possui um ou mais destes elementos. Além disso, estes ocorrem naturalmente em algumas plantas e micro-organismos do solo, 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. Métodos baseados na pesquisa do gene de interesse são mais específicos 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, sendo esse local característico de cada evento de transformação. 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 será indistinguível dos organismos genitores em uma análise de PCR. Este fenômeno é conhecido como estaqueamento (*gene stacking*).

Além da categorização, novas estratégias para análise de OGM em alimentos e rações vêm sendo desenvolvidas como a adotada por laboratórios da *European Network of GMO Laboratories* (ENGL), baseada na matriz de triagem de OGM. A primeira etapa desta abordagem consiste em escolher testes de triagem que permitem a análise de uma ampla diversidade de OGM. Ao comparar os resultados obtidos com dados tabelados, que descrevem a presença/ausência de sequências específicas em eventos individuais, o analista avalia quais

possíveis eventos podem estar presentes na amostra. A identificação/confirmação do OGM é realizada em uma segunda etapa por meio de métodos evento-específicos. Quando um resultado não indica a presença de nenhum OGM registrado, esta amostra é considerada como não conhecida e testes adicionais são necessários para elucidar a origem dos sinais positivos na triagem¹⁶⁻¹⁸.

Com intuito de preencher lacunas obtidas quando se aplica a matriz de triagem de OGM obtendo-se um resultado inconclusivo da amostra, Block et al¹⁹ construíram um banco de dados de OGM e de seus elementos genéticos no projeto intitulado GMOseek. A matriz GMOseek é composta por dados de 328 eventos com 247 elementos diferentes presentes em suas respectivas construções. Possui eficácia para a recuperação de dados em um formato flexível, o qual permite adaptação para ser utilizada em países que possuem diferentes legislações para OGM. A matriz proporciona uma visão geral, de forma rápida e fácil, de todos os elementos genéticos e sua presença ou ausência em inúmeros OGM encontrados no mercado global.

Os métodos baseados na PCR, que levam em conta o conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos dos elementos genéticos integrados no genoma, são normalmente utilizados. OGM com modificações genéticas insuficientemente caracterizadas representam um desafio na análise de alimentos contendo tais sequências. Assim, novas estratégias para a caracterização e identificação molecular estão sendo desenvolvidas, como, por exemplo, o sequenciamento de nova geração ou *Next Generation Sequencing* (NGS)²⁰.

O NGS é uma técnica de alto rendimento para o sequenciamento de genomas inteiros, embora seu elevado custo seja, ainda, impedimento para análises de rotina. Durante o NGS, uma amostra de DNA genômico é cortada em pequenos fragmentos que são sequenciados em milhões de reações paralelas. As cadeias de bases identificadas, chamadas *reads*, são alinhadas e comparadas com um genoma de referência (ressequenciamento). Quando não se tem o genoma de referência do organismo estudado é preciso gerar ou montar esse genoma pela primeira vez. O conjunto completo de *reads* alinhados ou montados revela a sequência completa do genoma da amostra de DNA²⁰.

PCR

A PCR, desenvolvida em 1983 por Kary Banks Mullis, é uma técnica que permite a amplificação de

segmentos de DNA *in vitro*. Neste processo, o DNA pode ser multiplicado artificialmente através de ciclos repetidos de duplicação, sendo a reação catalisada pela enzima Taq DNA polimerase. A técnica é baseada na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de um conjunto de células, correspondendo a um mecanismo de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA²¹.

Essa técnica é utilizada para detectar uma ou mais sequências alvo (PCR multiplex), nas diferentes categorias (triagem, gene-específico, construção-específica ou evento específico). Em uma análise de PCR qualitativa o objetivo é detectar a presença ou ausência de uma determinada sequência alvo, por meio de respostas binárias. A PCR quantitativa permite a medição do produto da PCR e o monitoramento da reação em um sistema fechado, por meio da medição da intensidade de fluorescência em cada ciclo de amplificação. Para a quantificação, podem ser utilizadas curvas padrão (absoluta ou relativa) ou métodos comparativos para análise de dados²².

Tipos de PCR

PCR convencional

Na PCR convencional, aplicada às análises qualitativas, o DNA deve ser extraído e purificado. Os *primers* se destacam dentre os componentes deste tipo de PCR como aqueles que muito influenciam na seletividade. Esta é uma técnica rápida, barata, segura e não requer muito espaço em laboratório. Em termos de equipamento requer termociclador, sistema de eletroforese, transluminador e equipamento para fotodocumentação. Entretanto, esta técnica apresenta alguns fatores limitantes como: i) a necessidade de conhecer antecipadamente a sequência de DNA a ser amplificada para a síntese de *primers* específicos; ii) a possibilidade de contaminação da amostra por DNA estranho (alta sensibilidade da técnica); iii) a dificuldade em aplicar a PCR para sequências maiores que 5000 pb; e iv) a incorporação errada de bases durante a replicação²¹.

Em testes de triagem de OGM, 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 provável presença de uma modificação genética, porém não é possível identificar o tipo de modificação ou organismo que foi modificado¹⁵.

PCR Multiplex

A PCR multiplex, aplicada em análises qualitativas e quantitativas, é uma técnica robusta, rápida e confiável que permite a detecção de várias sequências de DNA simultaneamente. Por meio da combinação de diversos pares de iniciadores em uma mesma reação é possível obter um grande número de informações em pouco tempo e com economia de reagentes em relação à PCR convencional²³.

Trata-se de 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 multiplex²³.

Nested PCR

Na *Nested PCR*, técnica qualitativa, sequências específicas de DNA são amplificadas 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 reduzida²³.

PCR em Tempo Real

A PCR em Tempo Real pode ser utilizada tanto em análises qualitativas quanto em quantitativas.

A PCR em Tempo Real é utilizada e recomendada pelo *Joint Research Center* (JRC) para detecção e quantificação de OGM em alimentos e rações. A reação é monitorada 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 marcadas 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* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA alvo^{14,23,24}.

Em análises qualitativas o elemento alvo é detectado baseado na presença ou ausência do mesmo utilizando valores de Ct ou na fluorescência ao final da reação (*endpoint*). Não é necessária a construção de uma curva de calibração padrão, mas é indicado incluir controles positivos e negativos, além de amostras sabidamente negativas que mimetizem o preparo da amostra. Quando a amostra controle positivo apresentar uma mudança significativa na fluorescência, pode ser um indicativo que os resultados negativos das amostras desconhecidas são negativos reais, e não apenas o resultado de uma falha da reação de PCR, que poderia ser causada por problemas com os *primers*, sondas, tampão ou polimerase²².

A PCR em Tempo Real oferece muitas vantagens técnicas como a reduzida probabilidade de contaminação, processamento automatizado, monitoramento em tempo real e não necessidade de análise pós-reação. Porém, apresenta desvantagens como o elevado custo do equipamento e as elevadas exigências técnicas e científicas requeridas para o correto manuseio e manutenção do equipamento²².

Validação de métodos

A validação compreende a confirmação da

adequação de determinado método para o propósito de uso, podendo ser estruturada em processos intra ou interlaboratoriais. A validação se faz necessária para métodos não normalizados (métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório). Para métodos normalizados, validados em estudos interlaboratoriais, o laboratório deve confirmar que tem condições de operar adequadamente o método antes de implantá-lo em sua rotina²⁵.

Os estudos interlaboratoriais ou colaborativos 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 reprodutibilidade²⁶. 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 justificado²⁵.

Análise crítica dos documentos orientativos

Diversos documentos genéricos são adotados como referências para a validação intralaboratorial de métodos, como o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)²⁷, o guia publicado pelo EURACHEM²⁸ 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)⁹. Ainda não existe um guia harmonizado para a validação de métodos qualitativos, apesar de haver uma iniciativa da IUPAC no desenvolvimento de um modelo²⁹, além de publicações sobre o tema³⁰⁻³⁴.

Em relação à validação de métodos de análise de OGM em alimentos, em 2008, Zel et al³⁵ publicaram um trabalho considerando a legislação Europeia vigente. Neste documento foram apontados dois importantes aspectos da validação na área: i) a possibilidade de validação modular; e ii) a necessidade da flexibilidade no escopo de acreditação dos laboratórios da área; ambos

em detrimento do constante aumento de novos OGM no mercado.

Atualmente, existem dois guias específicos publicados para a validação de métodos de análise de OGM.

O documento *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO* criado pelo *European Network of Genetically Modified Organism Laboratories* (ENGL)¹⁰ e acolhido pelo *Joint Research Center* (JRC) inclui recomendações para validação de métodos para análise de OGM pelo *European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed*, as quais fornecem o embasamento científico necessário para implementar a legislação de OGM no mercado europeu.

O guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹ *Guidelines on criteria for methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology* trata sobre os procedimentos necessários à validação de 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 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Neste documento também é citada a validação modular, a qual define um método como a combinação de todas as etapas experimentais necessárias para estimar o mensurando em uma matriz particular, que podem incluir as etapas de extração de DNA, de quantificação ou de determinação da presença/ausência do analito. Na abordagem modular, é possível usar a mesma preparação da amostra em combinação com o mesmo DNA extraído para diversas análises subsequentes, contanto que o processo do método validado permaneça o mesmo. Seria inapropriado, contudo, substituir um processo de extração de DNA diferente, em um método validado, sem a realização de estudos adicionais para demonstrar que a substituição não afeta o desempenho do método.

Nas Tabelas 1 e 2 estão elencados os parâmetros de desempenho descritos nos principais guias, documentos orientativos e referências sobre validação de métodos

Tabela 1. Parâmetros de desempenho propostos na literatura para validação de métodos quantitativos

Parâmetro	EURACHEM ²⁸	THOMPSON et al ⁹	ENGL ¹⁰	INMETRO ²⁷			CODEX ALIMENTARIUS ¹¹
				Elementos menores ou traços	Propriedades físicas	Elementos em maior teor	
Adequação ao uso (<i>fitness for purpose</i>)	-	Sim	-	-	-	-	-
Aplicabilidade	-	Sim	Sim	-	-	-	Sim ^{XI}
Eficiência	-	-	Sim ^V	-	-	-	Sim ^{XI}
Extração e purificação do DNA ^I	-	-	'Sim	-	-	-	-
Faixa de trabalho	Sim	Sim	Sim ^{VI}	Sim	Sim	Sim	Sim ^{XII}
Incerteza de medição	Sim	Sim	-	-	-	-	-
Limite de detecção	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	Sim
Limite de quantificação	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	Sim
Linearidade	Sim ^{II}	Sim ^{IV}	Sim ^{VII}	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim ^{XII}
Praticabilidade	-	-	Sim	-	-	-	Sim
Precisão	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Recuperação	Sim	Sim	-	Sim ^X	Sim ^X	Sim ^X	-
Repetitividade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Reprodutibilidade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Seletividade	Sim ^{III}	Sim	Sim ^{VIII}	Sim	Sim	Sim	Sim
Sensibilidade	Sim	Sim	-	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim
Variação de matriz	-	Sim	-	-	-	-	-
Veracidade (<i>trueness</i>)	Sim	Sim	Sim	Sim ^X	Sim ^X	Sim ^X	Sim

I Concentração, estado de fragmentação e pureza do extrato no documento ENGL¹⁰

II Faixa linear e de trabalho no guia do EURACHEM²⁸

III Confirmação de identidade e seletividade no guia do EURACHEM²⁸

IV Calibração e linearidade, incluindo efeitos de matriz, no documento harmonizado AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON et al.9)

V Eficiência da amplificação no documento ENGL¹⁰

VI Faixa dinâmica no documento ENGL¹⁰

VII Coeficiente R² no documento ENGL¹⁰

VIII Especificidade no documento ENGL¹⁰

IX Sensibilidade e linearidade no documento do INMETRO²⁷

X Tendência e recuperação no documento do INMETRO²⁷

XI Eficiência considerada no guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹ junto ao parâmetro aplicabilidade

XII Faixa dinâmica ou de quantificação, incluindo linearidade, no guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹

Tabela 2. Parâmetros de desempenho propostos na literatura para validação de métodos qualitativos

Parâmetro	EURACHEM ²⁸	THOMPSON et al ⁹	TRULLOLS, et al ³⁰	CARDENAS e VALCÁRCEL ³¹	ELLISON e FEARN ³²	INMETRO ²⁷ Propriedades físicas	CODEX ALIMENTARIUS ¹¹
Acordância e concordância	-	-	-	-	Sim	-	-
Adequação ao uso (fitness for purpose)	-	Sim	-	-	-	-	-
Confiabilidade ^I	-	-	-	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 ^V	Sim	-	Sim
Taxa de falso-positivo	Sim	-	Sim	Sim ^V	Sim	-	Sim
Taxa de seletividade (especificidade)	Sim ^{II}	Sim ^{III}	Sim ^{IV}	Sim ^V	Sim ^{VI}	Sim ^{III}	-
Taxa de sensibilidade	-	-	Sim	Sim ^V	Sim ^{VI}	-	-

I Taxa de confiabilidade, eficiência, índice de Youden e taxa de verossimilhança em CARDENAS e VALCÁRCEL³¹ e ELLISON e FEARN³²

II Confirmação de identidade e seletividade/especificidade no guia do EURACHEM²⁸

III Seletividade no documento do INMETRO³¹ e AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON et al.⁹)

IV Taxa de especificidade em TRULLOLS et al.³⁰

V Falso-negativo, falso positivo, especificidade e sensibilidade em CARDENAS e VALCÁRCEL³¹

VI Especificidade e sensibilidade em ELLISON e FEARN³²

quantitativos e qualitativos, respectivamente.

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 se apresenta 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 analítica³⁶. 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 o são³⁶.

Hübner et al³⁷ apresentam uma abordagem diferente, tratando especificidade como a capacidade de um método detectar uma substância ou uma classe de substâncias, sem interferência de outros componentes presentes na amostra e seletividade como a capacidade de um método detectar componentes diferentes, em paralelo, sem interferência recíproca.

Considerando-se que os métodos para detecção de OGM em alimentos determinam: i) partes ou junções de um determinado evento, as quais também podem estar presentes em eventos distintos daquele sob investigação; ou ii) um evento

específico, o qual pode ser estaqueado (*gene stacked*), optou-se por seguir a recomendação da IUPAC no presente trabalho.

Para métodos quantitativos (Tabela 1), em todas as referências são tratados os parâmetros clássicos de um processo de validação, que correspondem a faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, linearidade, precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade, robustez, seletividade e veracidade (*trueness*).

Os parâmetros não considerados no documento do ENGL¹⁰ são adequação ao uso, incerteza de medição, recuperação, sensibilidade e variação de matriz. No guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹ não são abordados adequação ao uso, extração e purificação do DNA, incerteza de medição, recuperação e variação de matriz.

A adequação para uso é a propriedade dos dados produzidos por um processo de medição habilitar seus usuários a tomarem decisões tecnicamente corretas para o propósito estabelecido, o que envolve resultados da validação, da estimativa da incerteza, entre outros requisitos²⁵. Thompson et al⁹ incluem a incerteza de medição e adequação ao uso como parâmetros de desempenho quantitativos.

A estimativa da incerteza é um indicador chave tanto da adequação para uso de um método quanto da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em um laboratório. Este parâmetro cobre todas as fontes de erros do processo analítico, além daquelas obtidas nos processos de validação de métodos. Na prática, embora os dados provenientes de validações intralaboratoriais de métodos e de estudos colaborativos constituam a base da estimativa da incerteza, estes dados representam somente uma parte desta, sugerindo que a estimativa da incerteza seja considerada como mais do que simplesmente um parâmetro de desempenho de validação de métodos²⁵.

Assim, apesar da relação estrita dos processos de validação de métodos com a estimativa da incerteza de medição, visto que dados obtidos em estudos de validação intra ou interlaboratoriais podem ser utilizados para composição da incerteza,

em uma abordagem “*top-down*”, a estimativa da incerteza é, muitas vezes, tratada em documentos orientativos específicos. No *Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories* do JRC são estabelecidas formas de estimar a incerteza da medição para métodos quantitativos de análises de OGM por PCR em Tempo Real. No referido documento é citado ainda que, apesar do reconhecimento da importância da estimativa da incerteza de medição em análises qualitativas, os trabalhos sobre esta questão ainda estão em fase de desenvolvimento³⁸.

Muitas vezes, a recuperação também não é abordada como parâmetro de desempenho em processos de validação, mas sim como uma ferramenta para avaliação dos parâmetros veracidade e precisão^{9,27}.

A sensibilidade não é tratada como parâmetro fundamental da validação por algumas referências, por ser um parâmetro arbitrário que depende de ajustes no instrumento de medição⁹.

Thompson et al⁹ incluem o estudo da variação de matriz como parte do processo de validação, porém não existe consenso sobre a inclusão deste parâmetro na validação de métodos. A incerteza gerada pela variação de matriz deve ser quantificada separadamente, pois ela não é levada em consideração em outra etapa do processo de validação. Se não houver conhecimento detalhado de todos os componentes da matriz, haverá uma incerteza extra nos resultados devido ao efeito de matriz variável.

O parâmetro extração e purificação do DNA descrito no documento do ENGL¹⁰ considera que o DNA extraído deve ser de qualidade adequada e que esta depende da concentração, integridade estrutural e pureza do DNA extraído. Este parâmetro não é considerado no protocolo de validação quantitativa do CODEX¹¹.

A praticabilidade, abordada nos documentos específicos para análise de OGM^{10,11}, considera a quantidade de amostras que podem ser processadas dentro de um determinado tempo, os custos fixos para implementar o método e o custo aproximado

por amostra, dificuldades de ordem prática sobre o uso diário ou em condições especiais, bem como outros fatores que podem ser de grande importância para os operadores.

Desta forma, os parâmetros quantitativos tratados nos documentos orientativos específicos para validação de métodos para detecção de OGM por PCR cumprem com os parâmetros considerados fundamentais para tais processos de validação.

Para métodos qualitativos, nos documentos do INMETRO²⁷ e EURACHEM²⁸ são considerados os parâmetros seletividade e limite de detecção. Estudos de robustez são tratados no documento do INMETRO²⁷, mas não no guia EURACHEM²⁸. Nesse guia são mencionados estudos das taxas de falsos resultados para validação de métodos qualitativos²⁸.

No guia harmonizado pela AOAC/ISO/IUPAC⁹ 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 limite de detecção e robustez estão implícitos nas definições apresentadas.

Para validação de métodos qualitativos (Tabela 2), no guia do CODEX¹¹ são tratados os parâmetros limite de detecção, taxa de falso-positivos, taxa de falso-negativos 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: confiabilidade – relacionada à exatidão, taxa de sensibilidade (sensibilidade), taxa de seletividade (seletividade), região de perda de confiabilidade – associada à incerteza, concordância e concordância – correspondentes à precisão, representatividade e rastreabilidade³⁰⁻³⁴.

O estudo da confiabilidade, 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 região de perda de confiabilidade. Já sensibilidade, seletividade, precisão e robustez são associadas ao processo analítico e considerados parâmetros base para os anteriores³¹.

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 validação³⁹.

Vale destacar que parâmetros como falsos resultados e limite de detecção são tratados de forma particular pelo JRC no caso de análise de eventos não autorizados¹⁷.

Portanto, em relação aos métodos qualitativos, mais do que para os quantitativos, existe a necessidade de adequação do guia específico para validação de métodos para detecção de OGM em alimentos, publicado pelo CODEX ALIMENTARIUS¹¹, no sentido de inclusão de estudos de parâmetros específicos e fundamentais para uma avaliação segura da adequação ao uso de provas binárias. No caso do documento do ENGL¹⁰ 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.

Validações de métodos para o evento RR[®] em soja e produtos de soja

Em 2011, o JRC publicou um compêndio de métodos de referência qualitativos e quantitativos validados para análise de OGM⁸. Nesta publicação foram definidos os principais parâmetros de desempenho de validação, tendo como referências os documentos do ENGL¹⁰ e do CODEX ALIMENTARIUS¹¹, além do documento da IUPAC²⁶ para validações interlaboratoriais. Na Tabela 3 estão relacionadas publicações sobre validação de métodos quantitativos e qualitativos para a determinação de soja RR[®] em soja e produtos de soja, incluindo aquelas relacionadas no

Tabela 3. Estudos de validação de métodos quantitativos e 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	Tipo de método	Técnica analítica	Parâmetros de desempenho avaliados	Uso de MRC	Referência
Derivados de soja	Promotor <i>CaMV</i> 35S, gene CTP e gene <i>CP4EPSPS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional e Nested PCR	Especificidade, limite de detecção e sensibilidade	NÃO	40
Grãos de soja	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, limite de detecção, sensibilidade e taxas de falsos resultados	SIM (IRMM)	41
Misturas e alimentos processados contendo ingredientes derivados de soja (soja acidificada, fórmula infantil e biscoito)	Junção 3'do evento específico RR [®] (<i>T-NOS</i>)/gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Eficiência, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM)	42
Misturas e alimentos processados contendo ingredientes derivados de soja (soja acidificada, fórmula infantil e biscoito)	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i>	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Taxas de falso-resultado e sensibilidade	NÃO	43
Farinha de soja e alimentos disponíveis no comércio	Gene de construção específica RR [®] e promotor <i>CaMV</i> 35S/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR competitiva e PCR em Tempo Real (TaqMan [®] e FRET)	Eficiência, especificidade, faixa de quantificação (trabalho), limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), robustez, seletividade ¹ , sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM)	37
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 <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Limite de detecção e sensibilidade	SIM (IRMM)	44
	Promotor <i>CaMV</i> 35S/gene da lectina		Quantitativo	PCR em Tempo Real (Light Cycler)	Linearidade e sensibilidade		

Cont. Tabela 3

Sementes de soja RR®	Gene de construção específica RR®, promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i>	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real	Limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), veracidade	SIM (NFRI).	45
Biscoitos e bolos de ameixa com soja 0 e 100 % RR®	Sequência da construção sintética <i>CP4EPSPS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Multiplex (TaqMan®)	Aplicabilidade, eficiência, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) e sensibilidade	SIM (IRMM)	46
Sementes de soja RR® e não GM	Fragmento de 84 pb da região recombinante inserida no genoma da planta/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan®)	Eficiência, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	NÃO	47
Soja RR® e não GM	Promotor <i>CaMV</i> 35S e gene <i>CP4EPSPS</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR em Tempo Real Multiplex acoplado a microensaio de hibridização direta dos amplicons (DualChip® GMO)	Especificidade, limite de detecção, representatividade, robustez, sensibilidade, taxas de falso-resultado	SIM (IRMM)	48
Soja em pó, grãos de soja e salsicha	Promotor <i>CaMV</i> 35S, gene <i>CP4EPSPS</i> e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Limite de detecção e sensibilidade	SIM (Fluka)	14
			Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan® GMO Soy 35S Detection Kit)	Limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade		
Soja e farelo de soja	Promotor <i>CaMV</i> 35S, terminador <i>T-NOS</i> e gene de construção específica RR®/gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Aplicabilidade, especificidade, limite de detecção, robustez, seletividade ¹ e sensibilidade	SIM	49
Sementes e grãos de soja RR® e não GM	Fragmento de 84 pb da região recombinante inserida no genoma da planta/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan®)	Especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	NÃO	50

Continua

Cont. Tabela 3

Alimentos, rações, sementes e DNA	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i>	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR em Tempo Real Hexaplex (TaqMan [®])	Efeitos competitivos ^{II} , especificidade, estabilidade, limite de detecção, confiabilidade, robustez e sensibilidade	SIM (IRMM)	39
Soja em pó, ração adquirida no comércio e biscoito preparado com farinha de soja 100 % RR [®] e não GM	Fragmento de 84 pb da região recombinante inserida no genoma da planta /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (Pico Green [®])	Eficiência, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM ERM BF410d)	51
Soja em pó, soja, bebida de soja, leite de soja em pó, fórmulas infantis, proteína texturizada de soja, farinha de soja, farelo de soja, fibra de soja, sopa desidratada, produtos cárneos, comida vegetariana, massas, cookies e ração	Promotor <i>CaMV</i> 35S/gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Duplex (TaqMan [®])	Eficiência, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM 410S)	24
Tecidos de folha de soja RR [®]	Plasmídeo pJANUS [™] -02-001 (formado pela junção de uma parte específica do evento RR [®] e uma parte da construção específica da gene da lectina)	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real	Eficiência, faixa dinâmica (faixa de trabalho), linearidade, limite de detecção, praticabilidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), veracidade	NÃO	52
Farinha de soja e biscoitos preparado com farinha de soja RR [®] e não GM	Junção entre <i>CP4EPSPS</i> e <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Duplex (TaqMan [®] MGB-NFQ)	Eficiência, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM)	53
Soja	Gene de construção específica RR [®] , promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (Qiagen [®] Plant Mini Kit)	Eficiência, limite de detecção, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM and GeMMA Proficiency test material)	54
Farinha de soja	Junção entre CTP e <i>CP4EPSPS</i> / gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Exatidão e precisão (repetitividade e reprodutibilidade)	NÃO	8
Farinha de soja	Junção entre CTP e <i>CP4EPSPS</i> / gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Duplex (TaqMan [®])	Especificidade e precisão (repetitividade e reprodutibilidade)	SIM (IRMM 410)	8

Continua

Cont. Tabela 3

Farinha de soja	Junção entre <i>CaMV 35S</i> e <i>CTP</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Precisão (repetitividade e reprodutibilidade)	SIM (IRMM 410)	8
DNA	Integração da região da borda 5' entre o inserto do evento RR [®] e o gene da soja/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Eficiência, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	NÃO	8
Biscoito de soja	Promotor <i>CaMV 35S</i>	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	NÃO	8
Grãos de soja	Promotor <i>CaMV 35S</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	SIM (IRMM 410)	8
Soja	Terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso- resultados	SIM (IRMM 410)	8
Biscoitos de soja e milho	Terminador <i>T-NOS</i>	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	NÃO	8
Soja	Junção entre <i>CaMV 35S</i> e <i>CTP</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	SIM (IRMM 410)	8
Farinha de soja	Junção entre <i>CaMV 35S</i> e <i>CTP</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	SIM (Fluka)	8
Sementes de soja	Gene de construção específica RR [®] /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Acordância, concordância, especificidade, limite de detecção, sensibilidade, taxas de falso-resultados	NÃO	55
Farinha de soja	Promotor <i>CaMV 35S</i> , terminador <i>T-NOS</i> e gene <i>CP4 EPSPS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR em Tempo Real	Especificidade, extração e purificação do DNA, limite de detecção e sensibilidade	NÃO	56
Sementes de soja	Gene de construção específica RR [®] , gene da lectina e promotor <i>CaMV 35S</i>	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Limite de detecção, precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e veracidade	NÃO	57

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; *CP4EPSPS*: CP4 5-enol-piruvato-chiquimato-3-fosfato sintase; *CTP*: peptídeo de trânsito para o cloroplasto; DNA: ácido desoxirribonucléico; FRET: *fluorescence resonance energy transfer*; GM: geneticamente modificado; IRMM: *Institute for Reference Materials and Measurements*; MGB-NFQ: *minor groove binder-non-fluorescent quencher*; MRC: material de referência certificado; NFRI: *National Food Research Institute*; PCR: reação em cadeia da polimerase; RR[®]: *Roundup Ready*[®]; *T-NOS*: terminador do gene nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens*.

I Parâmetros seletividade e especificidade tratados separadamente.

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

compêndio do JRC.

Em relação aos métodos quantitativos, os parâmetros precisão sob condições de repetitividade, veracidade, linearidade, reprodutibilidade e sensibilidade e foram os mais investigados, presentes em 94, 78, 72, 72 e 67 % das publicações, respectivamente. Apesar de fundamentais, os parâmetros eficiência, limite de detecção e quantificação e seletividade estavam presentes em 56, 56, 44 e 28 % dos estudos, respectivamente.

Faixa de trabalho (11 %), aplicabilidade, robustez e praticabilidade (6 %) foram os parâmetros de desempenho menos frequentes nos estudos de validação de métodos para determinação de soja RR[®] em alimentos por PCR. Os parâmetros não avaliados em nenhuma das publicações consideradas neste levantamento foram: adequação ao uso, extração e purificação do DNA, incerteza, recuperação e variação de matriz.

Como discutido anteriormente, os parâmetros evidenciados como menos frequentes não estão previstos nos documentos específicos do ENGL¹⁰ e CODEX ALIMENTARIUS¹¹ e muitos destes são tratados na literatura como complementares à validação e não como parte de tais processos. Provavelmente, seja este o motivo de não terem sido contemplados nos estudos relacionados.

Considerando as validações intralaboratoriais os parâmetros mais estudados foram sensibilidade, linearidade, repetitividade, exatidão e eficiência (100, 100, 88, 75 e 75 %, respectivamente). Os limites de quantificação e de detecção foram estudados em 63 % das publicações, enquanto reprodutibilidade, seletividade e aplicabilidade foram os menos estudados (38, 25 e 13 %, respectivamente).

Em relação aos estudos interlaboratoriais os parâmetros mais frequentes foram repetitividade e reprodutibilidade (100 % de frequência nas publicações), característicos deste tipo de validação. Exatidão, linearidade, limite de detecção, sensibilidade e eficiência também foram estudadas em 80, 50, 50, 40 e 40 % das publicações. Os parâmetros menos estudados foram seletividade, limite de quantificação (30 %), faixa de trabalho (20 %), robustez e praticabilidade (10 %).

Para métodos qualitativos, os parâmetros mais frequentemente avaliados foram taxa de sensibilidade e de seletividade, que foram considerados, respectivamente, em 100 e 81 % dos trabalhos elencados neste levantamento. As taxas de falsos resultados, rastreabilidade e limite de detecção foram investigados, 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 %), confiabilidade (6 %) e acordância e concordância (6 %) e representatividade (6 %). Cumpre considerar que foram considerados representativos os trabalhos que atenderam as recomendações relativas à validação de métodos qualitativos, as quais indicam 30 replicatas por nível como um mínimo necessário²⁶. Além disso, o parâmetro que representa a incerteza de medição em métodos qualitativos, região de perda de confiabilidade, não foi estimado nos trabalhos relacionados.

Considerando as validações intralaboratoriais os parâmetros mais estudados foram taxa de sensibilidade e limite de detecção (100 % dos estudos), seguidos de taxa de seletividade e rastreabilidade (67 e 50 %). Os menos estudados foram robustez, confiabilidade e taxas de falsos resultados (33, 17 e 0 %).

Dentre os trabalhos de validação interlaboratorial os parâmetros mais frequentes foram taxa de sensibilidade e taxa de falsos-resultados (100 %), seguida de taxa de seletividade (90 %) e rastreabilidade (60 %). Os parâmetros menos frequentes foram limite de detecção (30 %), acordância, concordância, robustez e representatividade (10 %).

Considerando-se os trabalhos publicados a partir de 2009, ou seja, posteriores à publicação do documento do ENGL¹⁰, observou-se que os parâmetros de desempenho recomendados neste guia não foram totalmente incorporados às práticas de validação da área. Para métodos quantitativos, parâmetros como eficiência, limite de quantificação, seletividade, faixa de trabalho, praticabilidade, extração/purificação do DNA, robustez e aplicabilidade foram abordados em menos de 50 % dos trabalhos. Para métodos qualitativos, os parâmetros limite de detecção e robustez foram reportados em apenas 33 e 11 % dos estudos.

CONCLUSÃO

A PCR é recomendada por órgãos internacionais de regulamentação, pesquisa, comércio e certificação para realização de análises de detecção e quantificação de OGM em matérias-primas e alimentos. Pela análise comparativa dos documentos orientativos para validação de métodos foi detectada a necessidade de inclusão de parâmetros críticos para uma adequada avaliação de desempenho de métodos qualitativos nos

documentos orientativos específicos como taxas de confiabilidade, de sensibilidade, de seletividade, região de perda de confiabilidade, acordância, concordância, representatividade e rastreabilidade. Considerando-se a revisão da literatura sobre o tema, observou-se que as orientações dos guias específicos da área de OGM não tem sido totalmente incorporadas às práticas de validação, sendo importante o incentivo à implementação de processos adequados de validação para análises de OGM em alimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. United States Department of Agriculture - USDA. Production, supply and distribution Online [acesso 2014 Jan 07]. Disponível em: [http://www.fas.usda.gov].
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou saúde. Alegações de propriedade funcional aprovadas. [acesso 2011 Ago 31]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/].
3. James C. Preview: global status of commercialized biotech/GM crops - 2011. ISAAA Briefs No. 42. Ithaca, NY: ISAAA, 2011.
4. Brasil. CTNBio. Aprovações comerciais. [acesso 2014 Jan 07] Disponível em: [http://www.ctnbio.gov.br].
5. 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.
6. Thomson J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. *Trends Food Sci Tech*.2003;14:210-28.
7. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol*.2002;20(5):215-23.
8. Joint Research Center - JRC. Compendium of reference methods for GMO analysis. Reference reports. 2011 [acesso 2011 Set 27]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/pcr/GMO-JRC_Reference%20Report_2011.pdf].
9. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74(5):835-55.
10. European Network of GMO Laboratories - ENGL. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Version 13-10-2008. [acesso 2013 Ago 30]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf].
11. 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-first session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling. Budapeste. 2010.
12. Petit L, Baraige F, Balois AM, Bertheau Y, Fachel P. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *Eur Food Res Technol*.2003;217:83-9.
13. Greiner R. Methods for identification and quantification of genetically modified material in agricultural crops, processed food and animal feed in relation to regulatory requirements. *JBL*.2004;1(2):81-5.
14. Marcelino FC, Guimarães MFM, De-Barros EG. Detection and quantification of Roundup Ready[®] soybean residues in sausage samples by conventional and real-time PCR. *Ciênc Tecnol Aliment*.2008;28:38-45.
15. Holst-Jensen A, Rønning SB, Lövseth A, Berdal KG. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*.2003;375(8):985-93.
16. Waiblinger HU, Grohmann L, Mankertz J, Engelbert D, Pietsch K. A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. *Anal Bioanal Chem*.2010;396:2065-72.
17. Joint Research Center - JRC. Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials. 2011 [acesso 2014 Jan 15]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/2011-12-12%20ENGL%20UGM%20WG%20Publication.pdf]
18. Holst-Jensen A, Bertheau Y, De Loose M, Grohmann L, Hamels S, Hougs L, et al. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnol Adv*.2012;30:1318-35.
19. Block A, Debode F, Grohmann L, Hulin J, Taverniers I, Kluga L, et al. The GMOseek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants. *BMC Bioinformatics*.2013;14:256.
20. Wahler D, Schauer L, Bendiek J, Grohmann L. Next-Generation Sequencing as a Tool for Detailed Molecular Characterisation of Genomic Insertions and Flanking Regions in Genetically Modified Plants: a Pilot Study Using a Rice Event Unauthorised in the EU. *Food Anal Method*.2013;6(6):1718-27.
21. Oliveira TMS. PCR em tempo real: métodos e aplicações [dissertação de mestrado]. Aveiro:Universidade de Aveiro; 2010.
22. Stratagene. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Application Guide. 2007. [acesso 2014 Jan 13]. Disponível em: [http://qcb.ca/wiki/_media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf]
23. Conceição FR, Moreira AN, Binsfeld PC. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciênc Rural*.2006;36(1):315-24.
24. Branquinho MR, Ferreira RTB, Cardarelli-Leite P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. *J Food Compos Anal*.2010;23(3):220-5.
25. Souza SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

26. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl Chem*.1995;67:331-43.
27. 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. 35p.
28. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC; 1998. 61 p.
29. 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 [acesso 2013 Jun 06]. Disponível em: [http://www.iupac.org/web/ins/2005-024-2-600].
30. Trullols E, Ruisánchez I, Rius FX. Validation of qualitative analytical methods. *Trend Anal Chem*.2004;23(2):137-45.
31. Cárdenas S, Valcárcel M. Analytical features in qualitative analysis. *Trend Anal Chem*.2005;24(6):477-87.
32. Ellison SLR, Fearn T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *Trend Anal Chem*.2005;24(6):468-76.
33. Gondim CS, Junqueira RG, Souza SVC. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2011;70(4):433-47.
34. Gondim, CS. Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
35. Žel J, Mazzara M, Savini C, Cordeil S, Camloh M, Štebih D, et al. Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: an example of laboratories testing for genetically modified organisms. *Food Anal Method*.2008;1;61-72.
36. Vessman J, Stefan RI, van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Burns DT, et al. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl Chem*.2001;73(8):1381-6.
37. Hübner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*.2001;84(6):1855-64.
38. Trapmann S, Burns M, Broll H, MacArthur R, Wood R, Zel J. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. European Commission. Report: EUR 22756 EN/2 – 2009.
39. Bahrdt C, Krech AB, Wurz A, Wulff D. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Anal Bioanal Chem*.2010;396(6):2103-12
40. Meyer R, Jaccoud E. Detection of genetically modified in processed food production: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate tolerant soybeans. In: Ninth European Conference on Food Chemistry, Proceedings... Interlaken, Switzerland. 1997;1:23-28.
41. Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E, Borchers T, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J AOAC Int*.1999;82(4):923-8.
42. Berdal KG, Holst-Jensen A. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur Food Res Technol*.2001;213(6):432-8.
43. Lipp M, Bluth A, Eyquem F, Kruse L, Schimmel H, Van den Eede G, et al. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur Food Res Technol*.2001;212(4):497-504.
44. Taverniers I, Windels P, Bockstaele EV, De Loose M. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur Food Res Technol*.2001;213(6):417-24.
45. Shindo Y, Kuribara H, Matsuoka T, Futo S, Sawada C, Shono J, et al. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. *J AOAC Int*.2002;85(5):1119-26.
46. Foti N, Onori R, Donnarumma E, Santis B, Miraglia M. Real-time PCR multiplex method for the quantification of Roundup Ready soybean in raw material and processed food. *Eur Food Res Technol*.2006;222:209-16.
47. Joint Research Center - JRC. Event specific method for the quantification of soybean line 40-3-2 using real-time PCR. Validation report. 2007 [acesso 2013 Set 27]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/40-3-2_val_report.pdf].
48. Leimanis S, Hamels S, Nazé F, Sneyers M, Mbella GM, Hochegger R. Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. *Eur Food Res Technol*.2008;227:1621-32.
49. Sieradzki Z, Mazur M, Kwiatek K. Validation of procedures based on PCR reactions for detection and identification of genetically modified maize and soybean. *Bull Vet Inst Pulawy*.2008;52:611-4.
50. Joint Research Center - JRC. Report on the validation of a DNA extraction method for soybean seeds. 2009 [acesso 2013 Set 27]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/356043-5_DNAExtr_report.pdf].
51. Bellocchi G, De Giacomo M, Foti N, Mazzara M, Palmaccio E, Savini C, et al. Testing the interaction between analytical modules: an example with Roundup Ready[®] soybean line GTS 40-3-2. *BMC Biotechnol*.2010;5;10-55.
52. Lievens A, Bellocchi G, De Bernardi D, Moens W, Savini C, Mazzara M, et al. Use of pJANUS™-02-001 as a calibrator plasmid for Roundup Ready soybean event GTS-40-3-2 detection: an interlaboratory trial assessment. *Anal Bioanal Chem*.2010;396(6):2165-73.
53. Samson MC, Gulli M, Marmiroli N. Quantitative detection method for Roundup Ready soybean in food using duplex real-time PCR MGB chemistry. *J Sci Food Agric*.2010;90(9):1437-44.
54. Scholtens IM, Kok EJ, Hougs L, Molenaar B, Thissen JT, Van der Voet H. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. *Anal Bioanal Chem*.2010;396(6):2213-27.
55. Kodama T, Kasahara M, Minegishi Y, Futo S, Sawada C, Watai M, et al. Qualitative PCR method for Roundup Ready soybean: interlaboratory study. *J AOAC Int*.2011;94(1):224-31.
56. Mano J, Harada M, Takabatake R, Furui S, Kitta K, Nakamura K, et al. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation. *J AOAC Int*.2012;95(2):508-16.
57. Takabatake R, Onishi M, Koiwa T, Futo S, Minegishi Y, Akiyama H, et al. Development and interlaboratory validation of quantitative polymerase chain reaction method for screening analysis of genetically modified soybeans. *Biol Pharm Bull*.2013;36(1):131-4.