

UTILIZAÇÃO DO GRÁFICO DE SHEWHART COMO FERRAMENTA ANALÍTICA NO CONTROLE DA QUANTIFICAÇÃO DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA EM ALIMENTOS POR PCR EM TEMPO REAL

RESUMO

O Brasil regulamentou o plantio e a comercialização de soja geneticamente modificada pelo Decreto n° 4680 que estabelece o limite de 1% para a informação no rótulo dos produtos alimentares que contenham ou sejam constituídos por OGM. O INCQS é o laboratório oficial no Brasil que atua no controle pós-comercialização de soja transgênica nos alimentos. O gráfico de controle é uma representação de dados desenvolvido por Shewhart para verificar se o processo analítico está sob controle estatístico e que o mesmo permanece sob controle ao longo do tempo. Este gráfico foi utilizado com os resultados da análise quantitativa de soja geneticamente modificada em alimentos e seu uso como instrumento analítico foi avaliado.

Palavras-chave: PCR em Tempo Real, Gráfico Controle de Shewhart, Soja Geneticamente Modificada

SUMMARY

Brazil regulates the planting and marketing of GM soya by Decree No. 4680 that establishes the limit of 1% for information on the label of food products containing or consisting of GMO. The INCQS became the official laboratory acting in the post-marketing control of GM soya in food. The Control Chart is a representation of data developed by Shewhart to verify if the analytical process is under statistical control and that it remains under control over the time. This chart was used with the results of quantitative analysis of GMsoya in food and their use as analytical tool was evaluated.

Keywords: Real time PCR, Shewhart Control Chart, Genetically Modified Soybean

INTRODUÇÃO

Muitas sementes geneticamente modificadas (GM) vêm sendo comercializadas em todo o mundo desde 1994, sendo as principais o milho, soja, canola, e algodão. De acordo com James (2008) a maior parte das plantações se encontra nos Estados Unidos, seguida da Argentina e do Brasil (1).

Em 2003, o Brasil regulamentou o plantio e a comercialização da soja geneticamente modificada

(GM) estabeleceu, através do Decreto n° 4680, de 24 de abril de 2003, o limite de 1% para a informação no rótulo de produtos alimentícios que contenham, ou seja, constituídos por OGM (2) e criou o símbolo que deve constar nas embalagens dos produtos que se encontram nesta situação, conforme a Portaria n° 2658, de 22 de dezembro de 2003 (3). Criou-se, portanto, uma nova situação para o Brasil e o Instituto

Paola Cardarelli-Leite;
Renata Trotta Barroso Ferreira e
Maria Regina Branquinho*

*Autora para correspondência:
Depto. de Microbiologia,
Setor de Biologia Molecular
INCQS / Fiocruz
Av. Brasil, 4.365
Manguinhos
CEP: 21045-900
Rio de Janeiro. RJ
E-mail: paola.cardarelli@incqs.
fiocruz.br



Qualidade e Inovação Contínua

- Frota nova e própria equipada com baús refrigerados/isotérmicos;
- Avançado sistema de segurança, rastreabilidade e controle de temperatura;
- Novos Centros de Distribuições;
- Reconhecimento da qualidade em serviços através de premiações dadas por clientes.

Prêmio



Bristol-Myers Squibb

Top em Transporte 2009



www.shuttle.com.br

Avenida Tamboré, 1.180
Alphaville - Barueri SP - CEP: 06460-000
Fone: (11) 3883 0200

Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) se tornou o laboratório oficial do Ministério da Saúde atuando na verificação do cumprimento da legislação de rotulagem, no rastreamento e no controle pós-comercialização de soja geneticamente modificada em alimentos.

Nas análises de OGM são necessários métodos analíticos robustos, específicos, de alta sensibilidade e aplicáveis a diferentes matrizes de alimentos. Numerosos métodos têm sido descritos, sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizada tanto nas análises presuntivas como nas de identificação e a PCR em Tempo Real na quantificação de OGMs em diferentes produtos alimentícios (4).

Na PCR em Tempo-Real a quantidade do produto sintetizado é medida pela detecção do sinal fluorescente produzido como resultado da amplificação. Vários sistemas químicos são utilizados, sendo as sondas de degradação (princípio TaqMan®) as de maior aplicação na quantificação de OGMs em alimentos.

A partir de 2004, o INCQS adotou como método de análises a PCR em Tempo Real, sendo o Kit TaqMan® GMO 35S Soy Detection utilizado no sistema de detecção ABI PRISM® 7500 da Applied Biosystems.

A confiabilidade da análise quantitativa depende de vários fatores entre eles os relativos às propriedades inerentes da amostra, à homogeneização, ao método de extração, ao material de referência e à influência da reação de PCR em Tempo Real (5).

A Carta de Controle é uma técnica de representação de dados baseada na teoria do controle estatístico do processo, desenvolvida por Shewhart em meados de 1920 (6). Também conhecida como Gráfico de Controle, tem como objetivo principal verificar se o processo (analítico) está sob controle estatístico e se este permanece sob controle em relação ao tempo.

Através do Gráfico de Controle podemos observar de forma organizada as variações que ocorrem durante um determinado processo e distinguir as variações devidas às causas aleatórias daquelas variações devidas a causas externas. Desta forma, o Gráfico de Controle nos permite avaliar o comportamento de um determinado processo e fundamentar as ações preventivas e/ou corretivas, quando necessário.

Neste trabalho, o Gráfico de Controle de Shewhart foi utilizado como ferramenta analítica no controle dos resultados das análises realizadas no INCQS como parte do estudo de validação do método da PCR em Tempo Real para a quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Material de referência

Foi utilizado o Material de Referência Certificado (MRC) produzido pelo "Institute of Reference Materials and Measurements" (IRMM, Belgium) composto de farinha de soja com diferentes concentrações de soja RR® (lote 410R): 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5%.

Equipamento

A reação de duplex PCR foi realizada no equipamento Real Time PCR System, modelo 7500, fabricado pela Applied Biosystems.

Metodologia

Método de extração de DNA

Foi utilizado o método de extração com CTAB (Brometo de cetil trimetil amônio) modificado de acordo com Cardarelli *et al*, 2005 (4).

Reação duplex de PCR em Tempo Real

A reação de duplex PCR foi realizada com o reagente "TaqMan GMO® Soy 35S detection Kit" (Applied Biosystems), específico para a amplificação simultânea dos alvos p35S e o gene *le* da soja, contendo os componentes do coquetel da reação MgCl₂, dNTPs, tampão, AmpliTaq Gold polymerase, UNG, iniciadores e sondas para ambos os alvos. A sonda para o alvo p35S é marcada na extremidade 5' com o corante fluorescente FAM e para o alvo *le* a sonda é marcada com o corante VIC. Ambas as sondas são marcadas com o corante TAMRA (quencher) na extremidade 3'. Detalhes sobre as sequências dos iniciadores e das sondas não são fornecidos pelo fabricante.

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada em placas de 96 orifícios em um volume total de 25µL, com 22µL do coquetel, 0,5µL de AmpliTaq Gold e 2,5µL de DNA. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A termociclagem utilizada foi de 1 ciclo de 94°C durante 10 minutos para ativação da polimerase e 45 ciclos de 94° por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os dados gerados na amplificação foram analisados pelo programa ABI Prism 7500 SDS e os percentuais foram calculados pelo programa GMO Analysis Macro® v.1.7.2.

As curvas analíticas foram construídas com os valores de ΔCt (delta *cycle threshold*) dos genes alvo e controle ($Ct_{35S} - Ct_{le}$) versus o logaritmo das concentrações dos materiais de referência certificados.

Os resultados são expressos em termos percentuais do OGM presente na amostra analisada.

Elaboração do gráfico de controle

O resultado da quantificação do material de referência certificado contendo 1% de soja GM foi utilizado para elaboração do Gráfico de Controle de Shewhart que foi desenhado utilizando-se o software SPC EXPLORER RT, a partir dos seguintes parâmetros:

- Utilização de 44 medições referentes à quantificação do MRC a 1%;
- Cálculo dos valores da média e os limites inferior (LIA) e superior (LSA) de alerta correspondentes a, mais ou menos, dois desvios padrão e os limites inferior (LIC) e superior (LSC) de confiança correspondentes a mais ou menos três desvios padrão.

Interpretação do gráfico

Os resultados foram avaliados segundo os critérios descritos abaixo de acordo com procedimento do INCQS (7) e devem ser tomadas as seguintes ações:

Regra 1: Quando uma única medição excede os limites de confiança superior ou inferior (LIC ou LSC), deve-se rejeitar a corrida;

Regra 2: Quando duas medições consecutivas excederem os limites superior ou inferior de alerta (LIA ou LSA), deve-se aumentar a supervisão de todo o processo;

Regra 3: Quando nove medições consecutivas estiverem no mesmo lado em relação à média, deve-se aumentar a supervisão de todo o processo;

Regra 4: Quando se observa tendência de seis medições no mesmo sentido (ficando progressivamente maior ou menor), deve-se aumentar a supervisão de todo o processo.

A regra 1 é indicativa de erro aleatório e caso seja infringida, todas as análises devem ser repetidas. As regras 2, 3 e 4 são indicativas de erros sistemáticos e caso sejam infringidas, as análises devem ser interrompidas e o processo analítico deve ser verificado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, poucos trabalhos já foram publicados com avaliações da presença e percentual de OGMs em alimentos comercializados. Cardarelli *et al.* (2005) demonstraram a presença de soja RR® em vários tipos de alimentos processados como leite de soja, massas, salsichas, sopas desidratadas; em grãos de soja e em ração animal (4). Greiner *et al.* (2008) também detectaram soja RR® em produtos com farinha

de soja, produtos de padaria, comida vegetariana, sobremesas industrializadas, alimentos com tofu, sopas instantâneas sendo que de 11 a 36% das amostras continham percentual acima de 1% e em nenhum produto havia a informação obrigatória no rótulo. Também foram encontradas amostras de produtos de padaria, farinha de milho, polenta e tortilhas com milho Bt 176 e milho MON 810 (8). Brod *et al.* (2007) detectaram soja RR em amostras de farinha de soja, extrato e leite de soja coletadas em Florianópolis (9). Esses dados reforçam a necessidade de contínua investigação da presença e quantificação de OGMs presentes em alimentos processados.

No Brasil, o avanço da pesquisa e desenvolvimento de novos alimentos geneticamente modificados vai demandar, dos órgãos reguladores entre eles o INCQS, um conhecimento cada vez maior de metodologias para controle desses produtos para verificar o cumprimento da legislação de rotulagem como também para o monitoramento do uso desses produtos a fim de possibilitar a detecção antecipada de possíveis efeitos adversos.

Neste trabalho, o gráfico de Shewhart foi utilizado como ferramenta analítica no controle dos resultados das análises realizadas no INCQS como parte do estudo de validação do método da PCR em Tempo Real utilizando o TaqMan GMO Soy 35S detection kit na quantificação de soja GM em alimentos. O gráfico foi elaborado com 44 medições retrospectivas do material de referência de soja GM 1% analisado no período (Tabela 1). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, por dois analistas, no período de um ano.

A Figura 1 apresenta o Gráfico de Shewhart obtido. Foi observado que as 44 medições obedeciam a uma distribuição normal dos dados, indicando que o padrão de distribuição das médias e desvios-padrões são conhecidos e que houve a ocorrência de nove pontos consecutivos (nº de análise 26 a 34) situados entre a média e o LIA, indicando um possível erro sistemático, tornando necessária uma revisão criteriosa de todo o processo analítico.

Neste tipo de análise, algumas possíveis causas responsáveis pela ocorrência dessa tendência podem ser o uso de reagentes de extração deteriorados, uso de kit de quantificação com reagentes inativos, equipamento mal calibrado, material de referência certificado deteriorado ou instável.

Após uma revisão criteriosa desses parâmetros, decidiu-se pela substituição do kit de quantificação. As análises foram então reiniciadas e os valores obtidos deste ponto em diante indicaram que as análises estavam novamente sob controle.

Avaliar os resultados das ações, com o objetivo de verificar se os mesmos estão em conformidade com as expectativas, faz parte da natureza do homem. Assim, no sentido *Lato*, pode-se dizer que o controle da qualidade remonta aos primórdios da civilização humana (10).

A preocupação com a qualidade, no sentido mais amplo da palavra, começou com W.A. Shewhart, estatístico norte-americano que, já na década de 20, tinha um grande questionamento com a qualidade e com a variabilidade encontrada na produção de bens e servi-

Tabela 1. Valores encontrados em porcentagem de soja GM no padrão de referência analisado durante a quantificação de soja GM em alimentos

Medição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GM%	0,87	0,85	0,95	0,92	0,90	1,03	1,04	0,94	0,98	1,06	1,15
Medição	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
GM%	0,90	1,24	0,94	0,90	0,90	0,93	0,91	1,16	0,92	0,96	0,77
Medição	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
GM%	1,09	1,06	0,93	0,75	0,92	0,88	0,80	0,88	0,89	0,77	0,94
Medição	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
GM%	0,99	1,05	1,11	1,01	1,11	0,76	0,94	0,75	1,00	0,94	0,94

*Média= 0,948409; Desvio Padrão= 0,1126

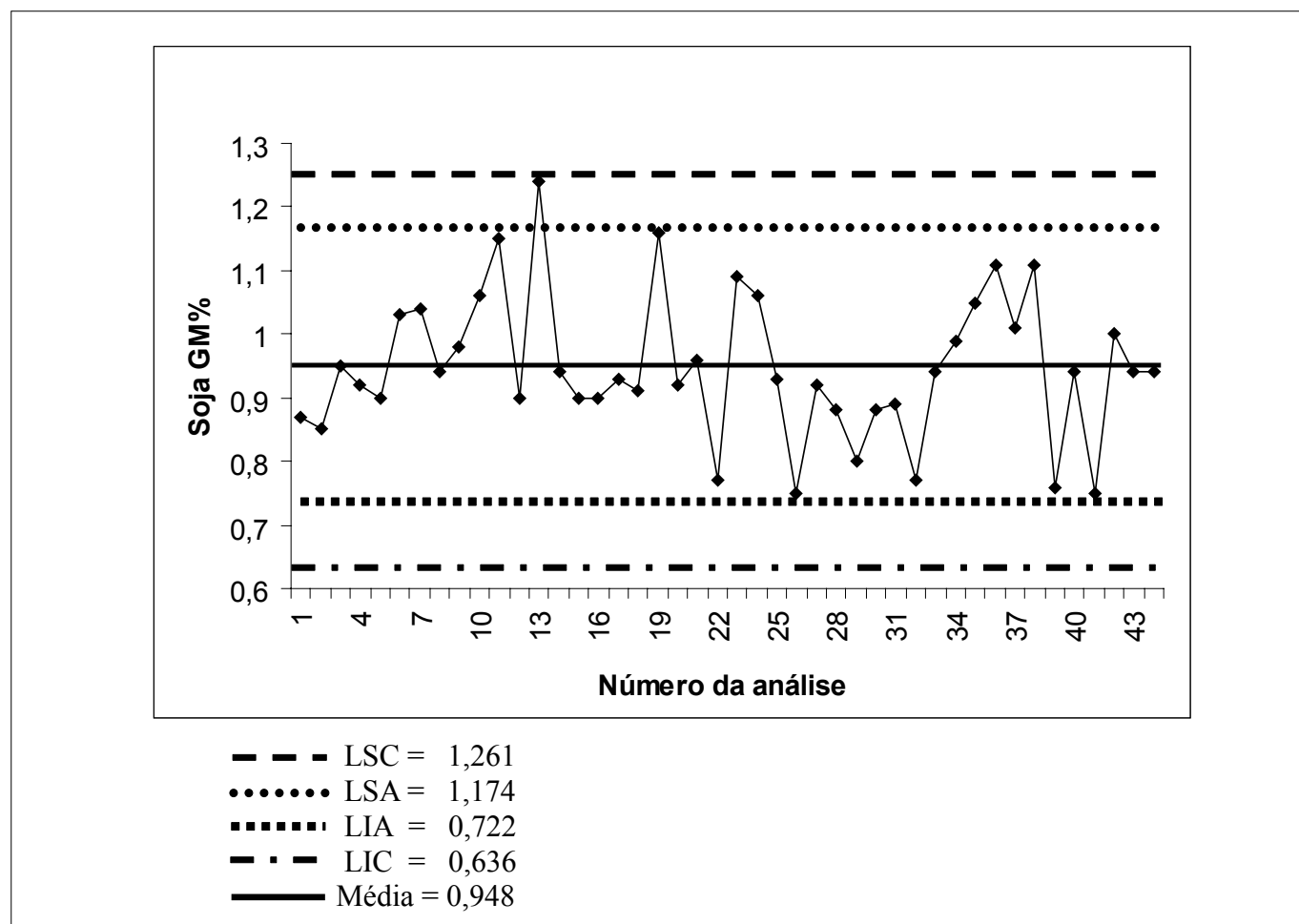


Figura 1. Carta de controle da análise quantitativa de soja geneticamente modificada em alimentos

ços. Shewhart desenvolveu um sistema de mensuração dessas variabilidades que ficou conhecido como Controle Estatístico de Processo que é um procedimento desenvolvido para facilitar a identificação das fontes de variabilidade anormal no processo. É constituído do controle, análise e correção das não conformidades (características fora dos limites de especificação). Ele criou ainda o Ciclo PDCA (Plan, Do, Check and Action), método essencial da gestão da qualidade naquela época. Garvin, em 1992, afirmou que, além dos métodos gráficos para representar valores de produção dentro ou não da faixa aceitável, a técnica desenvolvida por Shewhart, apesar de simples, trouxe uma contribuição expressiva para a melhoria dos processos em todas as fases da produção (11, 12).

Já superamos a época em que os analistas apresentavam seus resultados como sendo confiáveis e precisos

“porque eles estão nesta área por mais de 10 anos...”. Hoje, os laboratórios têm de demonstrar a qualidade de suas análises (13). A acreditação exige cada vez mais a participação em estudos interlaboratoriais (Ensaio de Proficiência), o uso de materiais de referência certificados e o controle analítico da performance.

CONCLUSÃO

Valores obtidos durante o procedimento de validação da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos foram utilizados para elaborar o gráfico de controle de Shewhart o qual se apresentou como uma ferramenta importante no monitoramento e controle das variações nas análises, auxiliando no planejamento e na tomada de decisão relativa às análises de quantificação de OGM em alimentos.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>, acessada em agosto de 2009.
2. MCT (Ministério da Ciência e Tecnologia); *Decreto nº 4.680* de 24 de abril de 2003.
3. MJ (Ministério da Justiça), *Portaria nº 2658* de 22 de dezembro de 2003
4. CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M. R.; FERREIRA R. T. B.; CRUZ, F. P.; GEMAL, A. L. *Food Control*, 16, 859-866, 2005.
5. CANKAR, K; STEBIH, D.; DREO, T; ZEL, J.; GRUDEN K. *BMC Biotechnology*, 6, 37-51, 2006.
6. SHEWHART, W. A., *Economic Control of Quality of the Manufactured Product, 50th anniversary commemorative issue*; American Society for Quality, Milwaukee, WI, 1980, about the author; http://books.google.com.br/books?id=EoynRAIOPo4C&printsec=frontcover&dq=Economic+control+of+quality+of&source=gbs_book_other_versions_r&cad=2#v=onepage&q=&f=false, acessada em maio de 2009.
7. INCQS/FIOCRUZ, Gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos, POP 65.3400.002 rev. 00.
8. GREINER, R.; KONIETZNY, U., VILLAVIVENCIO, A. L. C. H. *Food Control*, 16, 753-759, 2005.
9. BROD, F. C. A; FERRARI C. S.; VALENTE, L. L.; ARISI, A. C. M. *Food Science and Technology*, 40, 748-751, 2007.
10. SENAI (Serviço Nacional de Apoio à Indústria). *Elementos de Apoio para o Sistema APPCC*. 2 ed. Brasília-DF, 2000. (Série Qualidade e Segurança. Alimentar). Projeto APPCC Indústria. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE. p 297-352.
11. CORRÊA, J. M. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2007.
12. LONGO, R. M. J. 2005; “Gestão da Qualidade: Evolução Histórica, Conceitos Básicos e Aplicação na Educação.”, *Gestão da Qualidade na Educação: Em Busca da Excelência*, Centro de Tecnologia de Gestão Educacional, SENAC, SP, texto para discussão nº 397; http://www.ipea.gov.br/pub/td/td_397.pdf, acessada em julho de 2009.
13. KRAMER, K. J. M. *Trends in analytical chemistry*, 21, XX-XXII, 2002.