

ARTIGO CIENTÍFICO

Tema: **Métodos Alternativos para Detecção de Organismos Geneticamente Modificados**

Responsável: Jacques Dieu

Depto: Divisão Biotecnologia

E-mail: jacques@gehaka.com.br

Data: 18/08/2006

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO	3
II - MÉTODOS DE DETECÇÃO	4-9
III - TESTES PARA VERIFICAÇÃO DE LIMITES VARIÁVEIS	9-18
IV – CONCLUSÃO	18
V – REFERÊNCIAS	19

I – INTRODUÇÃO

A utilização da engenharia genética no melhoramento de plantas, visando entre outros, diminuir os custos de produção e aumentar a flexibilidade do manejo da cultura, está presente em várias culturas, como: milho, algodão, soja e outros. As primeiras características desenvolvidas atenderam necessidades de agricultores como plantas resistentes a herbicidas ou insetos. De acordo com dados da Universidade de Reading, na Inglaterra, se o produtor brasileiro plantasse 90% (800 mil hectares) da área cultivada no Brasil com algodão resistente a inseto, haveria uma economia de 4,3 milhões de diesel e 700 toneladas de inseticida por ano (CIB, 2005). Atualmente, novas variedades de plantas geneticamente modificadas estão sendo desenvolvidas e terão como característica, uma melhor qualidade com, maior teor de proteína ou óleos de melhor qualidade. O Brasil ainda não autorizou o plantio em escala comercial de muitas variedades geneticamente modificadas, contudo, a medida que novas cultivares e eventos forem aprovados, estas deverão atender a todos os critérios necessários para a sua certificação. Na produção de sementes, cada lote deve atender requisitos de pureza mínimos para vários critérios. No passado, eram avaliadas propriedades, tais como o percentual de germinação, plantas daninhas e material inerte. Porém, para o presente e o futuro, cada vez mais, sementes contendo modificações genéticas serão vendidas e cultivadas no mercado ao lado de sementes convencionais, por exemplo as sementes de algodão tipo Bollgard® e Roundup Ready®. Portanto, a pureza das sementes genéticas e convencionais, no que tange a presença e a ausência de traços transgênicos, deverá ser incorporada à lista de propriedades a serem mensuradas. Diversos métodos foram desenvolvidos para detectar eventos específicos de modificação genética (ex: Algodão Bollgard®) ou genes que codificam características específicas (resistência a insetos) em sementes. De maneira geral, estes métodos podem ser classificados em duas categorias. A primeira categoria inclui métodos que requerem a amplificação de um pedaço de DNA com subsequente detecção direta ou indireta do produto final. A segunda categoria inclui métodos que envolvem o emprego de anticorpos marcados. A amplificação do sinal emitido pelo anticorpo marcado permite detectar uma proteína específica presente na semente geneticamente modificada. Compreender o funcionamento dos testes diagnósticos permite reduzir o número de resultados falsos positivos e falsos negativos que possam ocorrer durante os testes efetuados em lotes de sementes. O presente trabalho apresenta as vantagens e limitações dos métodos de detecção de GM mais utilizados. São discutidos, também, os

métodos de teste que permitem estimar a pureza genética de um banco de sementes em relação a um determinado limite, algumas considerações e cuidados a serem tomados nos procedimentos de amostragem, bem como apresentação de ferramenta estatística utilizada (programa SeedCalc) para se estimar a contaminação de um lote ou testar a pureza de sementes.

II - MÉTODOS DE DETECÇÃO

Os três testes diagnósticos mais usados para se determinar a presença ou ausência de eventos específicos de modificação genética em sementes e matérias-primas alimentares são: - Os testes ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)(Mason, 1992), - O teste de tira por fluxo lateral (Hermanson et al., 1992) e - A PCR (Polymerase Chain Reaction)(Innis et al., 1990). Os dois primeiros testes detectam proteínas que conferem características específicas (ex: resistência a insetos) e são provenientes da modificação genética. O PCR é um método que envolve a amplificação e detecção de um segmento de DNA (ex: promotor 35S) presente na planta transgênica. As chamadas plantas transgênicas são aquelas que tiveram introduzido em seu genoma um novo gene ou fragmento de DNA, pelo processo do DNA recombinante ou engenharia genética. Com a produção e comercialização de sementes e alimentos geneticamente modificados no Brasil e em função da nossa legislação, que prevê informação nos rótulos dos alimentos é necessário que metodologias analíticas confiáveis e baratas permitam detectar eventos de modificação genética. Como já citado, os métodos atualmente utilizados para detectar sementes ou matérias-primas alimentares GM estão fundamentados na capacidade de indicar a presença de novas seqüências de DNA, correspondentes ao novo gene ou à construção genética introduzida, ou novas proteínas, decorrentes da expressão dessas novas seqüências (ILSI, 2001). Atualmente, no Brasil apenas o PCR tem sido reconhecido como método validado para detecção de modificação genética em commodities e matérias-primas de alimentos. Tanto os métodos imunológicos quanto a PCR têm sido utilizados em laboratórios de pesquisa e de análises clínicas há alguns anos, como, por exemplo, nos testes de paternidade ou na dosagem de hormônios, ambos com capacidade de qualificar e quantificar. Da mesma forma estes métodos são amplamente empregados na indústria alimentícia, afim de assegurar o cumprimento da regulamentação, atender aos programas de Preservação de Identidade e garantir a qualidade dos produtos que fornecem. Portanto, já existe uma grande experiência na análise de material

biológico humano ou vegetal. Apesar dos métodos imunológicos e PCR diferirem quanto a velocidade e custo por análise (tabela 1), que em geral é mais rápida e barata no primeiro caso, e também quanto a sensibilidade, com vantagem para a detecção de DNA, observa-se uma grande concordância entre os resultados obtidos com os dois tipos de metodologia, pelo menos até o nível aproximado de 1% de material GM (Lipp et al., 1999). Contudo, a robustez do método, o custo por análise, a necessidade de resposta qualitativa rápida, a velocidade de execução, os limites legais e treinamento de pessoal podem definir a escolha em favor de métodos imunológicos rápidos, principalmente daqueles em configuração mais simples (testes de tira). Constantes avanços técnicos no desenvolvimento de OGMs, bem como sua diversidade e as dimensões da cadeia produtiva de alimentos, levam a demanda de métodos rápidos para análise na pesquisa, controle de qualidade e fiscalização.

Tabela 1: Vantagens e limitações dos métodos mais usados para detecção de OGMs

Método	Teste	Preço/amostra	Duração	Dificuldade	Resultados
Tira	Protein	8 - 10 U\$	5 – 10 min	Pequena	Qualitativo
ELISA	Protein	25 – 50 U\$	2 – 4 hrs	Moderada	Quali/quantitativo
PCR	DNA	200 – 300 U\$	2 – 3 dias	Alta	Quali/semi

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

O método aplicado na detecção de material GM é a reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction), em que uma DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) aliada ao uso de iniciadores (primers) específicos para a seqüência-alvo de DNA, permite a amplificação de quantidades mínimas de DNA alterado presentes em uma amostra (Gachet et al., 1999; Lockley; Bradley, 2001). Essa amplificação significa “multiplicação” da seqüência, o que aumenta a sua quantidade através da síntese controlada de fragmentos idênticos. Nesse processo, o DNA extraído da amostra, juntamente com a polimerase, iniciadores e demais reagentes, é submetido a ciclos de incubação sob diferentes temperaturas. Ao final de cada ciclo e sob condições ótimas de amplificação, a polimerase promove a duplicação do DNA-alvo. Uma vez que as novas fitas de DNA produzidas em um ciclo servem como molde para amplificação no ciclo seguinte, após 30 ciclos pode-se considerar que o número de cópias do

DNA-alvo se aproxima a 230. Em geral a quantidade de DNA produzida pela amplificação é suficiente para visualização em um gel de eletroforese, sendo possível aplicar essa técnica a métodos analíticos quantitativos ou qualitativos ou ainda, utilizando equipamento adequado (PCR Real Time) ter sua concentração determinada por espectrofotometria no decorrer dos ciclos de amplificação.

Métodos imunológicos

Os métodos de análise que indicam a presença de proteínas transgênicas são basicamente métodos imunológicos, nos quais as ferramentas essenciais são anticorpos específicos contra a proteína-alvo (Brett, 1999; Stave et al., 1999). Em razão da robustez e simplicidade, os métodos imunológicos utilizados para detecção de proteínas em grãos e matérias primas de alimentos podem ser encontrados em várias configurações, dentre as quais estão: os métodos qualitativos rápidos, nos quais uma tira de papel contendo anticorpos contra proteína transgênica, ao ser mergulhada num extrato da amostra, permite a análise em poucos minutos; O método ELISA (Brett, 1999; Gachet et al., 1999) consiste no uso de anticorpos para fazer, ao mesmo tempo, a separação e detecção da proteína de interesse. Neste método, os anticorpos são imobilizados na superfície interna de uma placa de microtitulação, que permite a análise simultânea de dezenas de amostras.

Método ELISA:

O teste ELISA detecta ou mede a quantidade da proteína de interesse presente em uma amostra contendo proteínas variadas ou dessemelhantes. O método utiliza um anticorpo que se liga à proteína de modo específico, outro que serve para amplificar a detecção (opcional) e um anticorpo que se conjuga a uma enzima, produzindo-se uma cor visível e quantificável, quando comparada com a curva padrão da proteína de interesse (Figura 2). Os procedimentos formatados não-quantificáveis baseados na utilização de placa de cultura de tecido com 96 orifícios (96-well) representam ainda outra opção para execução do teste.

No teste ELISA, anticorpos específicos para proteínas geneticamente modificadas (cultivos GM ou biotecnológicos) são adicionados e ligados a cada cavidade da placa de poliestireno. Após um

procedimento de lavagem para remover os anticorpos não ligados, são adicionados os extratos das amostras contendo a proteína de interesse, padrões de concentrações conhecidas e controles, seguido pela adição de outro anticorpo específico para a proteína de interesse, o qual, no entanto, deverá ser originário de outro animal. O tempo de incubação é de fundamental importância, assim como a lavagem entre cada fase do teste. Se a proteína de interesse específica estiver presente, a ela se ligará o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo/tag. À placa adiciona-se uma solução de substrato. Quando a proteína de interesse está presente, forma-se um produto colorido. A placa pode ser inspecionada visualmente para análise da intensidade da cor ou para a obtenção de leituras precisas da intensidade de cor, mediante a utilização de espectrofotômetro. A quantidade de proteína de interesse pode ser determinada por meio de valores estimados, que são comparados com uma curva padrão. A duração do teste, incluindo o tempo de preparação, é de 2 a 8 horas.

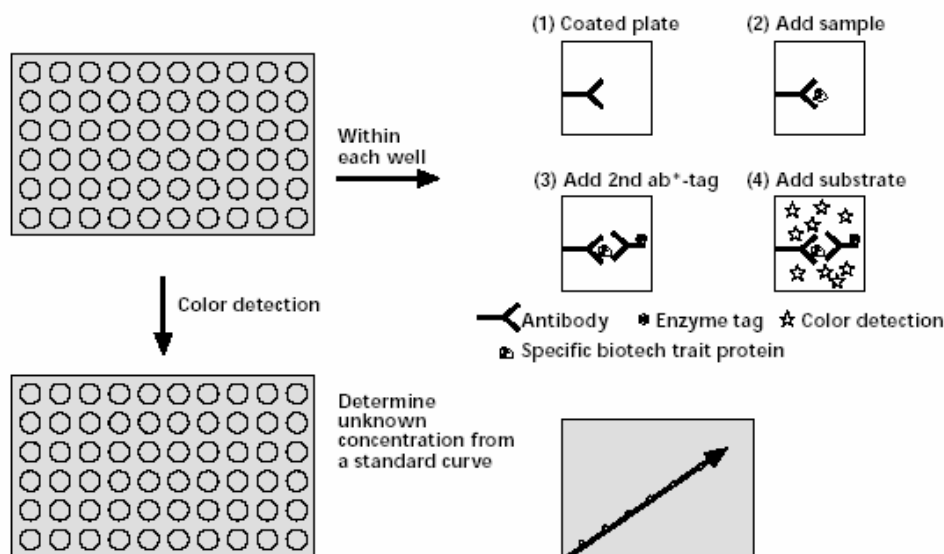


Figura 1. Esquemático do teste ELISA.

Características do método ELISA:

- O método ELISA requer mão de obra qualificada e equipamento especializado.
- Apesar de menos sensível que o PCR, é menos susceptível a falsos positivos
- Baixo custo por amostra quando comparado ao PCR
- Métodos baseados na detecção de proteína são mais práticos e rápidos em relação ao PCR.

Método de tira de fluxo lateral

O teste da tira de fluxo lateral é feito de nitrocelulose e tem anticorpos que reconhecem a proteína alvo (proveniente da modificação genética). O teste usa um duplo anticorpo no formato de sanduíche. Anticorpos específicos a proteínas alvo são acoplados a um reagente colorido e incorporados na tira de teste. Quando a tira é colocada numa pequena quantidade de extrato que contenha a proteína proveniente da modificação genética, um complexo Proteína-anticorpo é formado com parte do anticorpo incorporado ao reagente colorido. Este complexo colorido flui por capilaridade através da tira através de uma membrana porosa. A membrana contém duas zonas de captura, uma específica para o complexo proteína-anticorpo, uma para o complexo da proteína e outra para os anticorpos não reagidos, acoplados ao reagente colorido. Estas zonas de captura exibem uma coloração avermelhada quando o complexo Proteína-anticorpo e/ou o reagente colorido são capturados nas zonas específicas da membrana. A presença de apenas uma linha (linha de controle) na membrana indica um resultado negativo enquanto o aparecimento duas linhas indica que uma amostra é positiva. A duração do teste é de aproximadamente 5 a 15 minutos.

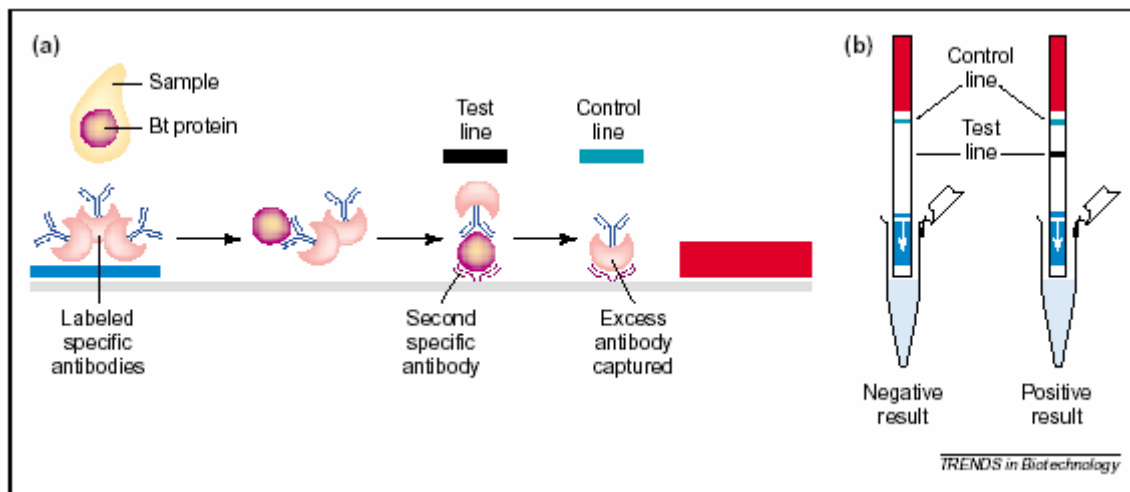


Figura 2. Formato do ensaio da tira de fluxo lateral. (a) A vista de lado ilustra o princípio do teste imunológico e a localização relativa das linhas de controle e de teste. (b) Vista vertical das tiras de teste imersas em tubo tipo eppendorf, contendo material geneticamente modificado, com resultado negativo e positivo. Abreviação: Bt, *Bacillus thuringiensis* (TRENDS in Biotechnology Vol.20, No.5, maio de 2002).

Para o teste de fluxo lateral, não são necessários equipamentos específicos, nem capacitação especializada para o pessoal. Algumas das principais características da avaliação das tiras de fluxo lateral são:

- Menor sensibilidade do que a PCR, portanto, menor susceptibilidade, em relação à PCR, a “falsos positivos” provocados por níveis baixos.
- Custo menor por amostra
- Facilidade de uso, rapidez e baixo custo

III - TESTES PARA VERIFICAÇÃO DE LIMITES VARIÁVEIS

Um ponto chave no processo de produção de sementes está no plano de amostragem e nos procedimentos de teste para avaliar a pureza nos lotes de sementes. Entretanto, devido à incerteza em tais métodos, há sempre um risco em rejeitar ou aceitar incorretamente um lote de sementes.

No processo de produção de sementes é necessário determinar se um lote de sementes encontra-se no nível mínimo de pureza em relação a vários critérios. Dentre esses critérios, um dos que deve ser verificado, é a presença adventícia de OGM. A decisão de aceitar ou rejeitar o lote é baseado inteiramente nos resultados dos testes a partir das amostras das sementes. Se a pureza da amostra não é representativa do lote de sementes ou se o sistema de teste tem alto nível de erro, então o lote terá maior chance de ser classificado erroneamente. Mesmo sobre condições ideais, há sempre um risco de rejeitar lotes com pureza adequada ou aceitar lotes impuros.

Uma maneira de evitar estes riscos é testar todas as sementes do lote com um método não destrutivo e livre de erro. Isto raramente é possível e não tem sentido prático. Assim, se o risco não pode ser eliminado, uma alternativa é manter o risco em níveis aceitáveis. Isto pode ser conseguido pela amostragem e pelo plano de teste apropriado. A existência de ferramentas robustas e confiáveis, como o PCR, Elisa e tiras, não são garantia da obtenção de resultados corretos, se a amostra analisada não for representativo do universo que esta deveria representar. Tiras rápidas de fluxo lateral são testes de fácil uso, rápidos (tempo-resultado) e de baixo custo, empregados em testes desde sementes em laboratórios, a de commodities transgênicos e convencionais transportados em contêineres ou embarcações. Utilizam ferramentas estatísticas para determinar, com nível elevado de confiança estatística, se a concentração de transgênicos em um lote encontra-se acima ou abaixo de um limite específico (Stave, et. al., 2003). O protocolo de amostragem e de teste pode ser utilizado para fins de atender ao nível de tolerância a risco especificado pelos compradores e vendedores envolvidos numa determinada transação. Ao ser efetuada uma amostragem de um lote com concentrações relativamente baixas de sementes transgênicas, a probabilidade de que a amostra efetivamente contém sementes ou grãos transgênicos dependerá de fatores como o tamanho da amostra,

assim como a concentração e distribuição das sementes transgênicas no lote. Visto que sempre haverá incerteza em relação à amostragem, existe o risco de que o protocolo de teste implique na classificação errônea de um determinado lote, levando, por exemplo, à rejeição de um lote que deveria ser aceito, ou à aceitação de um lote que deveria ser rejeitado. Estes dois tipos de risco são designados, respectivamente, o risco ao Vendedor e o risco ao Comprador, cuja inter-relação é apresentada na Figura 4. Devido à distribuição heterogênea das sementes transgênicas (grãos ou sementes, etc.) contidas em um lote, existe alguma probabilidade de que a amostra obtida do lote apresentará um nível de concentração acima ou abaixo da concentração real. A probabilidade de que um lote com diferentes percentuais de transgênicos será liberado é definida pela curva de características operacionais (ROC) apresentada na figura 3, com base na utilização de amostras de 1.000 sementes. Os riscos ao Comprador e ao Vendedor de um lote com uma concentração efetiva de 1% de unidades transgênicas, distribuídas de forma randômica pelo lote, são indicados pela área da figura situada entre a curva ROC e a linha representando 1%. Com base na aplicação destes princípios, foram desenvolvidos distintos protocolos de amostragem e de teste para atender às demandas de mercados específicos.

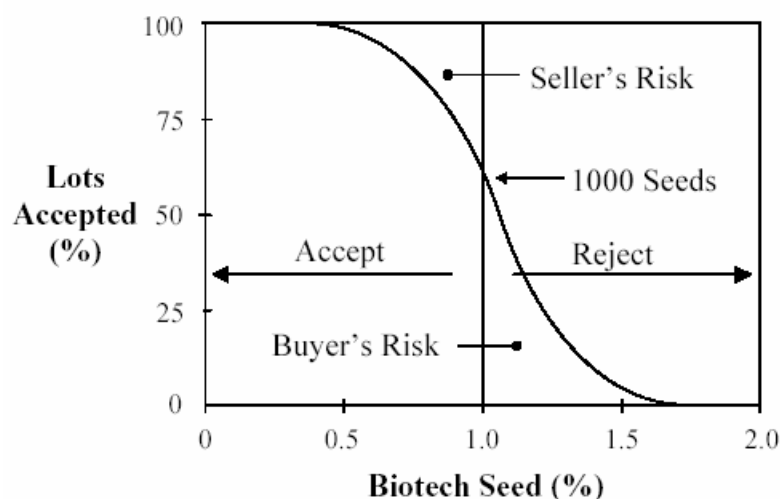


Figura 3. Curva de característica operacional mostrando o risco ao Comprador e ao Vendedor (Thomas B. Whitaker, USDA)

Um exemplo da utilização desta abordagem em larga escala são os testes realizados no Brasil para verificar a presença de grãos de soja RR®. Há, atualmente no mundo, um mercado para produtos OGM e produtos não-OGM, existindo também um interesse pela segregação desses produtos. Os produtores brasileiros podem se aproveitar das oportunidades que vêm se apresentando, garantindo a qualidade de suas sementes ou cultivos.

Intervalo de Confiança e Teste de hipótese (SEEDCALC):

Considerações das estatísticas envolvidas nos testes de pureza de sementes A estatística é um conjunto de técnicas úteis para a tomada de decisões sobre um processo ou população (ex. uma variedade de algodão), baseada na análise da informação contida em uma amostra desta população. O uso de distribuições de probabilidade serve para modelar o comportamento dos parâmetros em um processo ou um lote sobre avaliação. No caso dos testes de sementes os riscos cometidos na aceitação ou rejeição do lote podem se modelados pela **distribuição Binomial**, que é uma distribuição discreta de probabilidades.

Considere um processo consistindo de uma seqüência de n provas independentes (ex. a avaliação de cada semente para presença ou ausência de OGM). Provas independentes quer dizer que o resultado de cada prova não depende, de qualquer maneira, dos resultados das provas anteriores. Quando o resultado é "sucesso" (presença de OGM) ou "fracasso", as provas são chamadas **provas de Bernoulli**. Se a probabilidade de "sucesso" em qualquer prova (ou seja, p) é constante, então o número de "sucessos" x em n provas de Bernoulli independentes tem **distribuição Binomial** com parâmetro n e p . Assim, o número de sementes não-conformes ou pool de sementes não-conformes em uma amostra tomada de um lote de sementes segue uma distribuição Binomial com parâmetro n e p_b , em que n é o número de sementes individuais ou pool de sementes testados e p_b é a probabilidade de que uma semente individual ou pool de sementes é não-conforme. As fórmulas para o cálculo dessas probabilidades podem ser encontradas em Remund et al., 2001.

O objetivo da inferência estatística é a obtenção de resultados ou tomada de decisão sobre uma população baseada em uma amostra selecionada desta população. Assim, nos testes de pureza de sementes avalia-se a proporção de sementes não-conformes utilizando-se uma amostra e

extrapola-se esse resultado para a população, que no caso, será a variedade (ex. variedade de algodão) que está sendo avaliada. A verdadeira proporção de não-conformes na população é desconhecida, ou seja, para determinar a verdadeira proporção de não-conformes teria que avaliar todas as sementes da variedade e isto seria impossível. Através das distribuições de probabilidade, como mostradas acima, pode-se estimar tais parâmetros a partir da amostra (ex: proporção de não-conformes), de tal forma que essas estimativas sejam representativas da população estudada.

Para que o processo de estimação seja confiável, amostras de tamanho n retiradas da população devem ser aleatórias, ou seja, ela deve ser selecionada de tal modo que as observações sejam independentes e identicamente distribuídas. Então, na retirada da amostra para ser avaliada deve-se tomar o cuidado de retirar uma amostra representativa do lote.

No controle estatístico da qualidade de pureza de um lote de sementes, a distribuição de probabilidade Binomial é usada para descrever a fração de não-conformes no processo de teste de sementes. Essa distribuição é descrita pelos seus parâmetros. Como os parâmetros em geral são desconhecidos, necessitamos de procedimentos para estimá-los a partir de uma amostra. Essa estimativa pode ser por ponto ou por intervalo.

Uma estimativa pontual é um único valor numérico como estimativa de um parâmetro desconhecido. Um bom estimador pontual para a impureza do lote (parâmetro p da distribuição Binomial), se sementes individuais são testadas, é \hat{p} , em que d é o número de não-conformes e n o número de sementes avaliadas. Esse estimador possui características importantes, ou seja, é não-viesado e de variância mínima. Essas propriedades estatísticas garantem que esse estimador está refletindo a verdadeira proporção de não-conformes que seria esperada na população. Portanto, garantem a confiabilidade do teste estatístico quando faz-se inferência sobre a população a partir de uma amostra.

Uma estimativa intervalar de um parâmetro é um intervalo entre duas estatísticas que inclui o verdadeiro valor do parâmetro com uma dada probabilidade. Por exemplo, para construir uma estimativa intervalar para a proporção p , tem-se que encontrar duas estatísticas I e S tais que a probabilidade da verdadeira proporção populacional (p) estar entre I e S é igual a $1-\alpha$, ou seja

$P\{I \leq p \leq S\} = 1-\alpha$. O intervalo resultante $I \leq p \leq S$ é **chamado de intervalo de confiança de nível 100** $(1-\alpha)\%$ para a proporção desconhecida p . I e S são os limites inferiores e superiores de confiança e $1-\alpha$ é o nível ou coeficiente de confiança. A interpretação de um intervalo de confiança é que, se um grande número de intervalos é construído, cada um resultante de uma amostra aleatória, então 100 $(1-\alpha)\%$ deles irão conter o verdadeiro valor de p .

O intervalo de confiança é mais corretamente chamado de intervalo de confiança bilateral, uma vez que especifica limites inferior e superior para p . Algumas vezes, em aplicações para controle de qualidade, um intervalo de confiança unilateral pode ser mais apropriado. Um intervalo de confiança unilateral inferior de nível 100 $(1-\alpha)\%$ para p é dado pelo intervalo $I \leq p$, onde I , o limite inferior de confiança é escolhido de modo que $P\{I \leq p\} = 1-\alpha$. Um intervalo de confiança unilateral superior de nível 100 $(1-\alpha)\%$ para p é dado pelo intervalo $p \leq S$, onde S , o limite inferior de confiança é escolhido de modo que $P\{p \leq S\} = 1-\alpha$.

O objetivo primário de um teste de pureza de sementes é classificar os lotes nas categorias aceitáveis ou não aceitáveis. A estimativa do nível de pureza em lotes de sementes tem, portanto uma importância secundária. A aceitação de um lote de sementes está focada na determinação de que se o nível de impureza de um determinado lote de sementes está acima ou abaixo de um dado limite. A estimativa por intervalo da impureza do lote fornece a real amplitude na qual se encontra a verdadeira proporção de impureza do lote.

Supondo que o produtor de sementes deseja garantir que o lote de sementes tem menos que 2% de OGM com 95% de confiança. Na classificação do lote de sementes, poderíamos simplesmente tomar a decisão de aceitar ou rejeitar o lote baseado no resultado do teste. Se o lote é aceito, pode-se dizer com 95% de confiança de que a verdadeira presença de OGM no lote de sementes está abaixo de 2%. Isto implica somente que o limite de confiança superior da impureza estimada é igual ou menor que 2%. Por outro lado, se o objetivo é estimar a impureza do lote de sementes, podem-se utilizar fórmulas estatísticas (Remund et al., 2001) para calcular essas estimativas. Um limite de confiança superior para esta estimativa pode então ser calculado e a verdadeira impureza no lote de sementes seria esperada estar abaixo do limite de 2% com uma confiança de 95%. Se o limite superior do intervalo de confiança está acima de 2%, então o

lote é rejeitado. Se o limite superior do intervalo de confiança está abaixo de 2%, então o lote é aceito.

A utilização de estimativas por intervalo fornece mais informação, pois se pode estimar o limite superior do intervalo de confiança com 95% de certeza e não, simplesmente, declarar se o limite superior está acima ou abaixo de 2%. Por exemplo, se dois lotes de sementes são testados e ambos são aceitos usando o critério de rejeita/aceita, dado que o nível de impureza está abaixo de 2% em ambos os lotes. Entretanto, se fosse calculado o limite superior do intervalo com 95% de confiança, pode-se mostrar que em um lote esse limite poderia ser de 1,9%, enquanto no outro lote o limite superior seria de 0,5%. Assim, a estimação da impureza no lote de sementes, apesar de requerer mais trabalho, fornece mais informação do que simplesmente a classificação do lote. Por exemplo, partindo-se de uma amostra de 10 sementes e após a análise com as tiras, verificou-se 2 sementes não-conformes, ou seja, com mais de 1% de OGM, então, a proporção de impurezas é $\frac{2}{10} = 0,2$, ou seja, 20% de impureza e 80% de pureza. Na equação verifica-se que "d" é o número de sementes não-conformes e "n" o tamanho da amostra. Assim, pode-se saber nessa amostra que a porcentagem de impureza é de 20%. Se o limite fosse de 1%, esse lote seria rejeitado.

Portanto, quando se tem uma estimativa pontual da % de impureza, não é possível determinar o erro envolvido nessa estimativa. Utilizando-se a estimação por intervalo, o limite superior da % de impureza seria o seguinte (Remund et al., 2001):

Em que $F_{1-\alpha}$ é um valor tabelado da distribuição de probabilidades de F com $2d+2$ e $2n-2d$ graus de liberdade. O valor tabelado de 2,7413 foi obtido considerando um α de 5%, e assim uma confiança de $(1-\alpha)$ de 95%. Então, a verdadeira proporção de impureza no lote é de no máximo 50,69% com uma confiança de 95%, ou seja, em 100 amostras, em 95 delas o lote seria rejeitado devido ter mais de 1% de impureza e em cinco delas o lote seria aceito. Portanto, a chance de rejeitar um lote com mais de 1% de impureza é muito alta (95,0%) e a chance de cometer um erro (aceitar um lote com mais de 1%) é muito baixa. O programa SeedCalq utiliza essas mesmas fórmulas estatísticas para calcular a % de impureza no lote. Utilizando o exemplo anterior a planilha do SeedCalq é mostrada a seguir:

Purity Estimation & Confidence Intervals (Assay measures purity characteristic)

(Number of seed sampled should not exceed 10% of total number in population)

# of Individual Seeds Tested	10	% Purity in sample	80.00 %
# Deviants Seeds	2	Desired Confidence Level	95 %
Upper Bound of True % Impurity			50.69
		<i>(95% confident that the lot impurity is below 50.69%.)</i>	
2-sided CI for True % Impurity		2.52	to 55.61
Lower Bound of True % Purity			49.31
		<i>(95% confident that the lot purity is above 49.31%.)</i>	
2-sided CI for True % Purity		44.39	to 97.48

O programa SeedCalq também mostra o intervalo de confiança bilateral que contém os limites superiores e inferiores, que são um pouco maiores que os limites unilaterais devido a manipulações estatísticas. No exemplo acima, verifica-se, baseando-se no intervalo de confiança bilateral, que a verdadeira proporção de impureza neste lote avaliado está entre 2,52 e 55,61% com uma confiança de 95%. O limite de pureza apresentado pelo SeedCalq é obtido pela diferença do limite de impureza.

Do exposto, se a amostragem foi bem feita e o método utilizado para a detecção de sementes não-conformes é preciso, a partir da estimativa da porcentagem de pureza utilizando-se o SeedCalq, pode-se rejeitar ou aceitar o lote de sementes com uma alta confiança. Por exemplo, se fossem testadas 3000 sementes e fossem encontradas 2 sementes não-conformes, a verdadeira % de impureza no lote estaria entre 0,01 e 0,24% (simulado no SeedCalq) com uma confiança de 95%. Assim, este lote seria aceito, pois apresenta menos de 1% de impurezas. Quando são testados pools de sementes ao invés de sementes individuais, as equações do cálculo dos intervalos mudam um pouco, mas o princípio de determinação de impurezas é o mesmo. Então, considerando um exemplo no qual a partir de um lote de sementes foram

coletados 3 pools contendo 10 sementes cada (30 sementes avaliadas) os quais foram avaliados utilizando tiras e encontraram-se 2 pools não-conformes. Quando se utiliza pool de sementes a equação para o cálculo da proporção de não-conformes é a seguinte (Remund et al. 2001):

pureza. Na equação verifica-se que "d" é o número de pools não-conformes; "n" é o número de pools e "m" é o número de sementes no pool. Assim, pode-se saber nessa amostra que a porcentagem de impureza é de 10,4%. Utilizando-se a estimação por intervalo, o limite superior da % de impureza seria o seguinte (Remund et al., 2001):

Em que $F_{1-\alpha}$ é um valor tabelado da distribuição de probabilidades de F com $2d+2$ e $2n-2d$ graus de liberdade. O valor tabelado de 19,33 foi obtido considerando um α de 5%, e assim uma confiança de $(1-\alpha)$ de 95%. Então, a verdadeira proporção de impureza no lote é de no máximo 33,48% com uma confiança de 95%, ou seja, em 100 amostras, em 95 delas o lote seria rejeitado devido ter mais de 1% de impureza e em cinco delas o lote seria aceito. Portanto, a chance de rejeitar um lote com mais de 1% de impureza é muito alta (95,0%) e a chance de cometer um erro (aceitar um lote com mais de 1%) é muito baixa. O programa SeedCalq utiliza essas mesmas fórmulas estatísticas para calcular a % de impureza no lote. Utilizando o exemplo anterior a planilha do SeedCalq é mostrada a seguir:

Impurity Estimation & Confidence Intervals (Assay measures impurity characteristic)

(Number of seed sampled should not exceed 10% of total number in population)

# of Seed Pools	3	Computed % in sample	10.40 %
# of Seeds per Pool	10		
Total Seeds Tested	30	<i>Measured property on seed pools</i>	
# Deviants Pools	2		
		Desired Confidence Level	95 %
Upper Bound of True % Impurity		33.48	
<i>(95% confident that the lot impurity is below 33.48%.)</i>			
2-sided CI for True % Impurity		0.99 to 37.99	
Lower Bound of True % Purity		66.52	
<i>(95% confident that the lot purity is above 66.52%.)</i>			
2-sided CI for True % Purity		62.01 to 99.01	

No exemplo acima, verifica-se, baseando-se no intervalo de confiança bilateral, que a verdadeira proporção de impureza neste lote avaliado está entre 0,99 e 37,99% com uma confiança de 95%. O limite de pureza apresentado pelo SeedCalq é obtido pela diferença do limite de impureza.

Na prática são testadas mais sementes ou mais pools de sementes. Por exemplo, se fossem testadas 3200 sementes divididas em 8 pools de 400 sementes cada, e fossem encontrados 2 pools não-conformes, a verdadeira % de impureza no lote estaria entre 0,01 e 0,26% (simulado no SeedCalq) com uma confiança de 95%. Assim, este lote seria aceito, pois apresenta menos de 1% de impurezas, com uma confiança de 95%.

Uma das categorias das técnicas da inferência estatística é o teste de hipótese. Uma hipótese estatística é uma afirmativa sobre os valores dos parâmetros de uma distribuição de probabilidade. Por exemplo, se o nível de qualidade aceitável é 1% de impureza podemos expressar essa afirmativa como:

$H_0: p \leq 0,01 / H_a: p > 0,01$

Em que, H_0 é chamada de hipótese nula e H_a de hipótese alternativa. Para testar uma hipótese, toma-se uma amostra aleatória da população em estudo, calcula-se uma estatística de teste apropriada e, então, rejeita-se ou não a hipótese nula H_0 . Quando se calcula a estatística de teste, delimita-se uma região de aceitação $(1-\alpha)$ e uma região de rejeição (região crítica - α) da hipótese H_0 . Quando o teste é realizado, se H_0 é verdadeira, espera-se que 100 $(1-\alpha)\%$ dos valores calculados estarão dentro da região de aceitação de H_0 . Assim uma amostra que produz um valor desta estatística fora desse limite de aceitação, ou seja, o valor calculado está na região de rejeição de H_0 (com probabilidade α de ocorrer), deveria ser considerada pouco comum se a hipótese nula fosse verdadeira e será, então, considerada evidência para a rejeição de $H_0: p \leq 0,01$. Em outras palavras, a possibilidade disso ocorrer é muito baixa e então se o valor calculado caiu na região de rejeição de H_0 é porque a amostra realmente possui mais de 1% de impureza.

Dois tipos de erro podem ser cometidos quando testamos hipóteses. Se a hipótese nula é rejeitada quando ela é verdadeira, então se diz que ocorreu o erro tipo I. Se a hipótese nula não é rejeitada quando ela é falsa, então tem-se um erro tipo II. As probabilidades desses dois erros são: $\alpha = P\{\text{erro tipo I}\} = P\{\text{rejeitar } H_0/H_0 \text{ é verdadeira}\}$ $\beta = P\{\text{erro tipo II}\} = P\{\text{não rejeitar } H_0/H_0 \text{ é falsa}\}$ Algumas vezes é mais conveniente trabalhar com o poder de um teste, em que: Poder = $1 - \beta = P\{\text{rejeitar } H_0/H_0 \text{ é falsa}\}$

Então, o poder é a probabilidade de corretamente rejeitar H_0 .

Em trabalhos de controle de qualidade, α é às vezes chamado risco do produtor, porque denota a probabilidade de um lote bom ser rejeitado. Também β é às vezes chamado **risco do consumidor**, por denotar a probabilidade de aceitação de um lote de baixa qualidade. O procedimento geral de teste de hipótese consiste em especificar um valor para a probabilidade α do erro tipo I, e, então, planejar um procedimento de teste de tal forma que um valor pequeno da probabilidade β do erro tipo II seja obtido. Então, deve-se controlar ou escolher diretamente o risco α . O risco β é, geralmente, uma função do tamanho da amostra e é controlado indiretamente. Quanto maior o tamanho da amostra utilizada no teste, menor o risco β .

A maneira tradicional de relatar um teste de hipótese é afirmar que a hipótese nula foi ou não rejeitada ao nível de significância α especificado. Por exemplo, a hipótese H_0 de 1% de impureza foi rejeitada ao nível de significância de 0,05, ou seja, em 95% das vezes estaríamos tomando a decisão correta de rejeitar uma amostra com mais de 1% de impureza e em apenas 5% das vezes estaríamos cometendo um erro de rejeitar uma amostra que na verdade teria menos de 1% de impureza. Então, verifica-se que a probabilidade de erro é muito pequena, e desse modo, a probabilidade de tomar a decisão correta é bastante alta, ou seja, realmente se a amostra tiver mais de 1% de impureza a chance de rejeitar essa amostra é muito alta.

A obtenção de Intervalos de Confiança para a estimativa da verdadeira proporção de impureza na amostra pode ser tratada como um teste de hipótese, pois se o limite superior do intervalo de confiança estiver acima do limite de impureza permitido, o lote será rejeitado. Neste caso pode-se utilizar um α de 5% e portanto, a confiança em rejeitar ou aceitar o lote de sementes será de 95%.

IV - CONCLUSÃO:

Os testes de limite de tira rápida e de fluxo lateral já foram implementados com sucesso e em larga escala para os grãos de milho, os grãos de soja e as sementes de algodão. O futuro desenvolvimento da tecnologia dependerá do aumento da capacidade de detecção de múltiplos traços a partir de uma única amostra. Os eventos biotecnológicos originais, tais como o milho tipo Bt 176 e o GA21, que eram problemáticos para os testes de proteína, estão sendo substituídos no mercado por novos eventos, entre eles o NK603, o 1507 e o MON863. Estes eventos possuem níveis relativamente altos de expressão de proteína, sendo que métodos rápidos têm sido elaborados para sua detecção. Órgãos como o U.S. EPA hoje exigem a existência de métodos de teste como condição do registro de produtos biotecnológicos, garantindo, desta forma, que a detecção seja uma consideração no desenvolvimento de cultivos biotecnológicos. A eliminação de eventos problemáticos e a introdução de eventos de alta expressão projetadas para serem detectadas aumenta a possibilidade do desenvolvimento de protocolos de testes de limiar rápidos para múltiplos eventos a partir de uma única amostra.



Com base na teoria de probabilidade, é possível desenvolver planos de amostragem apropriados para a detecção de presença adventícia (PA) de OGM's, facilitando a tomada de decisão (aceitação ou rejeição), minimizando os riscos, de aceitar lotes de sementes contendo concentrações de OGM acima do permitido e rejeitar lotes com concentrações permitidas. Utilizando esta ferramenta, é possível prover confiança estatística sólida para os testes qualitativos de corrida lateral, quando analisando para qualquer nível de concentração de OGM em sementes.

V – REFERÊNCIAS

Ahmed, F.E. (2002) Detection of genetically modified organism in foods. TRENDS in Biotechnology Vol.20 No.5.

Remund, K., Dixon, D.A., Wright, D.L. and Holden, L.R. (2001) Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. Seed Science Research 11: 101-119.

Laffont, J.L, Remund,. K., Wright, D., Simpson, R.D and Grégoire, S. (2005) Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. Seed Science Research 15: 197 – 204.

Stave, J.W. (2002) Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations, an practical considerations. J. AOAC int.85(3): 780-786.

Stave, J. W., Brown, M.C., Chen,J., McQuillin, A.B. and Onisk, D.V. Enabling grain distribution and foos labeling using protein immunoassay for products of agricultural biotechnology. In Press, M. Bhalgat, ed. American Chemical Society, 2003.

Stave, J.W. (1999) Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – Future needs. Food Control 10: 367-374.

Finardi F., Silveira J.M., Fukuma P., O meio ambiente é um dos maiores beneficiados pela biotecnologia em: Transgênicos - você tem direito de conhecer. Informe Publicitário do Conselho de Informação sobre Biotecnologia. 2005.