

IDENTIFICAÇÃO DE TRIGO IRRADIADO UTILIZANDO RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA E TESTE DE GERMINAÇÃO

Adilson C. Barros*; Maria Teresa L. Freund**; Ana Lúcia C.H. Villavicenzio***; Valter Arthur*

*Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA / USP
Caixa Postal 96
13400-970, Piracicaba, Brasil

**Instituto de Física – IFUSP
Caixa Postal 66318
05315-970, São Paulo, Brasil

***Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Travessa nº 400 - Cidade Universitária
05508-970, São Paulo, Brasil

ABSTRACT

The objective of this research was to verify the possibility of detection of irradiated wheat by electron spin resonance spectroscopy, because ionizing radiation cause paramagnetic free radicals in materials and the germination test that established in radiobiological effects of inhibition of root-shoot lengths and germination percentages in seeds due radiation. For ESR spectroscopy, grains and shell have been irradiated with doses as follows: 0 kGy ; 1,0 kGy and 10,0 kGy at a dose rate of 6,20 kGy/h. For germination test only grains have been irradiated with 0 kGy; 0,10 kGy; 0,25 kGy; 0,50 kGy; 0,75 kGy; 1,0 kGy and 2,0 kGy at a dose rate of 1,724 kGy/h and stored by 90 days before germination. The ESR signal decay fastly with time but shell have free radicals ten times mor than grains by mass unit. As we can observe in germination test, occurs a reduction in development of root-shoot and germination percentages with dose increase. The results indicated that the ESR and germination test may be used for detection of irradiated wheat.

I. INTRODUÇÃO

Em vários países do mundo ocorre um crescimento da utilização da técnica de irradiação de alimentos como meio de melhorar a qualidade sanitária desses produtos devido a inativação de microorganismos patogênicos, retardamento de processos naturais de deterioração e aumento da vida útil desses alimentos. Nosso objetivo foi identificar trigo irradiado por diferentes doses de radiação gama. Foram utilizadas duas técnicas de análise para este propósito: A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) permitindo uma dosimetria direta no trigo, cujo sinal de leitura é

proporcional à dose e inversamente proporcional ao tempo transcorrido desde a irradiação e o teste de germinação que se baseia nos efeitos radiobiológicos de inibição e retardo do crescimento de brotos e raízes provocados em sementes pela radiação. Após extensas pesquisas sobre o tema irradiação de alimentos, uma grande coleção de dados foi acumulada ao longo de vários anos e forneceu suporte para que uma comissão de especialistas da FAO-WHO-IAEA* , em 1980, concluíssem que os alimentos irradiados

* FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Codex Alimentarius)
WHO – Organização Mundial da Saúde
IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica

com uma dose média de até 10 kGy não apresentavam riscos de natureza toxicológica, microbiológica e nem problemas nutricionais^[5]. Esta conclusão conduziu à um aumento do número de autorizações para a utilização de alimentos irradiados em vários países. Como regra para o controle de alimentos irradiados tornou-se desejável o desenvolvimento de métodos analíticos para detecção direta nos alimentos, do tratamento por irradiação^[6]. A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)^[1,2] tem sido extensivamente usada na análise de diferentes grãos submetidos à radiação ionizante^[3]. No presente trabalho analisamos o sinal de RPE da casca e do grão de trigo submetidos a diferentes valores de dose e analisados ao longo de duas semanas. Sabemos que a irradiação de quase todas as substâncias, incluindo materiais biológicos, irá produzir radicais livres^[1]. Se as condições experimentais corretas forem aplicadas, eles podem ser detectados por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica^[1].

A irradiação de grãos e frutos com sementes interfere na viabilidade do embrião, inibindo sua germinação mesmo em doses relativamente baixas. Tal inibição tem sido utilizada na identificação de cereais e legumes irradiados^[3]. Em 1973, pesquisadores japoneses^[4] já haviam relatado que a irradiação do trigo reduz o comprimento de brotos e raízes após a germinação. Sabemos então que o dano causado no crescimento de brotos e raízes de trigo pela radiação gama é um parâmetro útil para a detecção deste tipo de tratamento em sementes e isto torna o teste de germinação um método simples, sensível e barato para a detecção do trigo irradiado. De qualquer modo o comprimento da raiz pode ser retardado por outros fatores como alta temperatura, alto índice de umidade, longo período de armazenagem e presença de doenças. Isto sugere que um método complementar seja também aplicado para reduzir incertezas^[1].

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Os grãos de trigo *Triticum aestivum* foram obtidos no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e as cascas de trigo no comércio da cidade de Piracicaba-SP. Para as análises de RPE, os grãos e cascas de trigo foram irradiados com raios gama de uma fonte de ⁶⁰Co tipo Gammacell instalada no Centro Tecnológico das Radiações do IPEN em São Paulo, com uma atividade de 8630,156 Ci em 26/06/2000 e uma

taxa de dose de 6,20 kGy/h. As doses utilizadas para os grãos e cascas foram de 0 kGy (controle); 1,0 kGy e 10,0 kGy. Os grãos foram irradiados 1 hora antes da primeira leitura. Os grãos foram cortados sobre a bancada com o auxílio de um bisturi e foram colocados em capilares de vidro que são utilizados no espectrômetro. As cascas foram cortadas sobre a bancada com o auxílio de uma tesoura e também foram colocadas em capilares de vidro. Para a espectroscopia de RPE foi usado um espectrômetro da Bruker, EMX, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, com Banda X, frequência de microonda em torno de 9,768 GHz. O campo magnético foi medido com um gaussímetro da Bruker, ER 035 NMR Gaussmeter, e os espectros foram convertidos para a escala de valores de g com o programa WINEPR da Bruker. A amplitude de modulação usada foi 10 G, sendo que valores menores foram testados, e não implicaram em melhor resolução do espectro. Foi usada a frequência de modulação de 100 kHz. A microonda foi aplicada com potência de 20 mW, resultando em apenas uma pequena saturação do sinal, não o deformando. Resultados muito semelhantes aos apresentados aqui, porém muito menos intensos, como esperado, foram obtidos com a potência de 1 mW. Os espectros mostrados foram obtidos com varredura de 100 ou 500 G, conforme especificado na figura 1. O tempo de varredura (168 s) e a constante de tempo (164 ms) foram ajustados de tal maneira que se obtivesse uma relação sinal/ruído satisfatória, não causando deformações no sinal de RPE.

Para o teste de germinação, os grãos foram irradiados com raios gama em uma fonte de ⁶⁰Co tipo Gammacell 220 Excell da MDS Nordion-Canadá pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, na cidade de Piracicaba, com atividade de 2638,18 Ci em janeiro de 1999 e taxa de dose de 1,724 kGy/h. As doses utilizadas foram de 0 kGy (controle); 0,10 kGy; 0,25 kGy; 0,50 kGy; 0,75 kGy; 1,0 kGy e 2,0 kGy. Os grãos foram guardados durante 90 dias após a irradiação em condições ambientes e então foram submetidos ao teste de germinação. Utilizou-se dez grãos para cada dose e estes foram colocados em placas de petri contendo ao fundo uma dupla camada de papel filtro, previamente recortado, que atuou como substrato. Utilizando um conta gotas graduado umidecemos o papel filtro com 1ml de água destilada, embrulhamos separadamente cada placa em papel alumínio e estas foram incubadas em uma câmara climática tipo 102 FC da Eletrolab com temperatura de 30 ± 0,5°C. As placas foram observadas diariamente

durante nove dias, quanto à porcentagem de germinação e aumento do tamanho de brotos e raízes. O controle da umidade nas placas foi conduzido pelo acréscimo de 1ml de água destilada em cada observação diária para manter o papel filtro umedecido.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão apresentados os espectros de RPE obtidos com o grão e a casca do trigo irradiados com 10 kGy. Os sinais foram obtidos com varredura do campo magnético de 500 G (a) e 100 G (b). Observa-se um sinal dominante em g igual a 2, com possíveis interações hiperfinas, presentes em torno do sinal principal. Os espectros também foram obtidos com varredura de 2000 G, e, apesar de aparecerem outros picos, nenhum outro sinal relevante foi detectado.



Figura 1 (a) Espectros de RPE com 500 G de varredura do grão e da casca do trigo irradiados com 10 kGy. Os parâmetros estão especificados em materiais e métodos.

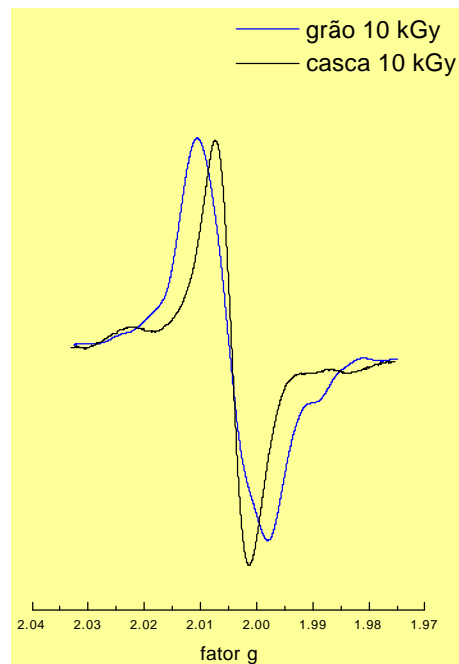


Figura 1 (b) Espectros de RPE com 100 G de varredura do grão e da casca do trigo irradiados com 10 kGy.

No presente trabalho não estamos interessados na análise espectroscópica do sinal de RPE do trigo, com possível identificação dos radicais que o originam, mas somente na variação da amplitude do sinal com a dosagem, e com o tempo de armazenamento das amostras. É interessante notar que o espectro obtido com o grão de trigo é significativamente mais largo do que aquele obtido com a casca do trigo. Este resultado, provavelmente, pode ser atribuído a interações hiperfinas não resolvidas no grão de trigo, devido à presença do meio aquoso e possivelmente, de oxigênio. Quando integrados (dupla integral), para comparação da quantidade de radicais livres presentes nas amostras, verificamos que a casca do grão de trigo apresenta, por unidade de massa, quantidade 10 vezes maior de radical do que o grão.

É importante notar que tanto o grão como a casca do trigo, em seu estado natural, isto é, antes de receberem radiação, já apresentam sinal de RPE, indicando a presença de radicais livres estáveis nestas amostras. O sinal de RPE observado nestas amostras parece ser semelhante àquele obtido após a irradiação, mas por ter amplitude muito baixa é difícil de ser analisado. A Tabela 1 mostra as variações das amplitudes dos sinais obtidos com diferentes amostras: casca e grão irradiados com 0 kGy ; 1 kGy e 10 kGy.

Testes preliminares com grãos de trigo irradiados com doses inferiores à 1,0 kGy não apresentaram variações significativas da amplitude do sinal de RPE quando comparados com o sinal obtido do trigo controle e pode sugerir baixa sensibilidade da técnica para a dosimetria de grãos irradiados com esses valores de dose.

Entre parênteses estão mostrados os valores relativos da amplitude do sinal, tomando por referência o grão não submetido à radiação (grão 0). Para melhor visualização das variações relativas dos sinais das várias amostras com o tempo, os valores apresentados na Tabela 1 estão mostrados na Figura 2.

Amostra	Dh/mg (mesmo dia)	Dh/mg (3 dias)	Dh/mg (7 dias)	Dh/mg (11 dias)	Dh/mg (14 dias)
Casca 0	$1,4 \times 10^2$ (5)	$2,0 \times 10^2$ (7)	$2,4 \times 10^2$ (8,6)	$2,0 \times 10^2$ (7,1)	$2,0 \times 10^2$ (7,1)
Casca 1	$4,7 \times 10^2$ (17)	$3,9 \times 10^2$ (14)	$4,7 \times 10^2$ (17)	$3,4 \times 10^2$ (12)	$2,7 \times 10^2$ (9,5)
Casca 10	$3,9 \times 10^3$ (140)	$1,1 \times 10^3$ (39)	$8,0 \times 10^2$ (29)	$6,2 \times 10^2$ (22)	$5,1 \times 10^2$ (18)
grão 0	$2,8 \times 10$ (1)	$4,4 \times 10$ (1,6)	$6,2 \times 10$ (2,2)	$6,4 \times 10$ (2,3)	$5,9 \times 10$ (2,1)
grão 1	$1,0 \times 10^2$ (4)	$1,5 \times 10^2$ (5)	$1,6 \times 10^2$ (5,7)	$1,8 \times 10^2$ (6,3)	$1,8 \times 10^2$ (6,3)
grão 10	$1,8 \times 10^3$ (64)	$2,9 \times 10^2$ (10)	$2,5 \times 10^2$ (9)	$1,8 \times 10^2$ (6,3)	$1,6 \times 10^2$ (5,8)

Tabela 1. Variação da amplitude do sinal de RPE com o tempo. Δh é a amplitude do sinal em unidades arbitrárias. Casca ou grão 0, 1 e 10, correspondem, respectivamente à casca e ao grão do trigo não irradiados e irradiados com 1 e 10 kGy. As variações relativas das amplitudes dos sinais, tomando como referência a amostra grão0, estão em vermelho.

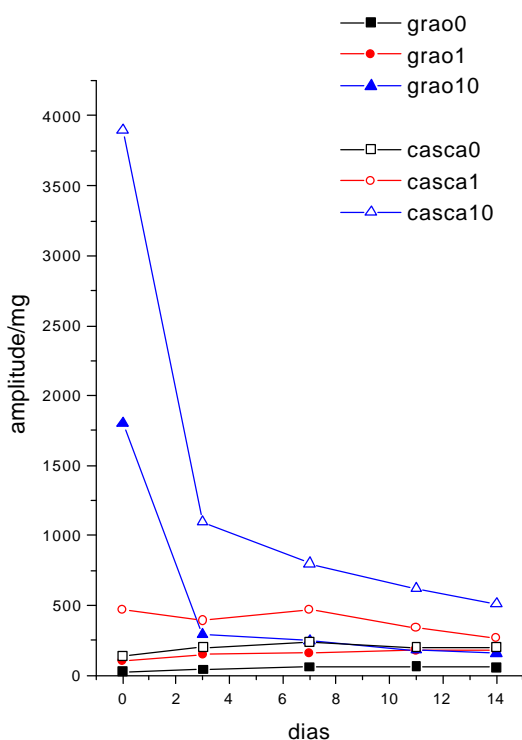


Figura 2. Variação com o tempo, da amplitude do sinal de RPE em $g=2$, em unidades arbitrárias, por miligrama de amostra, para o grão e a casca de trigo não irradiados e irradiados com 1,0 e 10,0 kGy.

Observa-se a queda rápida do sinal com o tempo, tanto para o grão como para a casca, sendo que a casca ainda mantém algum sinal residual, que a diferença da amostra não irradiada, no final de 14 dias. Estes resultados mostram que, diferentemente de outros grãos^[31], os radicais livres formados no trigo por irradiação do material, rapidamente reagem entre si ou com outras moléculas, desaparecendo. É importante lembrar que as amostras foram armazenadas na bancada do laboratório, à temperatura e umidade ambientes.

No teste de germinação observou-se que para baixas doses de radiação, até 0,25 kGy ocorreu um interessante efeito de estímulo no crescimento de brotos e raízes, conforme demonstra o gráfico da figura 3, bem como um estímulo na porcentagem de germinação, na faixa de 60-70%.

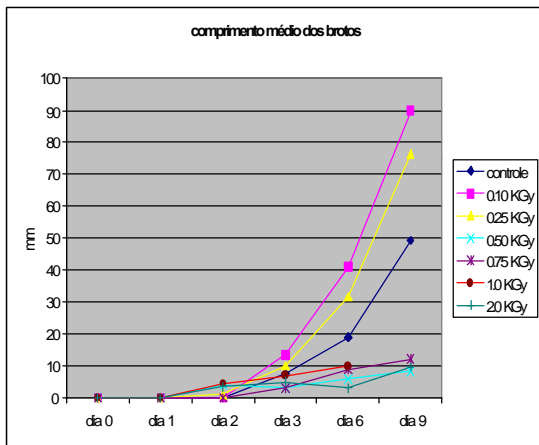


Figura 3. Comprimento médio dos brotos, em milímetros, para as doses 0 kGy ; 0,10 kGy ; 0,25 kGy ; 0,50 kGy ; 0,75 kGy ; 1,0 kGy e 2,0 kGy.

Luckey^[7] relata abundantemente os efeitos estimulantes das baixas doses de radiação sobre o desenvolvimento de plantas, em uma área do conhecimento denominada hormese. Para doses entre 0,50 kGy e 1,0 kGy foi observado uma acentuada diminuição do comprimento dos brotos e no desenvolvimento das raízes e a porcentagem de germinação reduziu-se para a faixa de 50-60%. Para a dose de 2,0 kGy foi observado, como esperado, a menor porcentagem de germinação, que não ultrapassou a faixa de 30% conforme o gráfico da figura 4. Também constatou-se o menor desenvolvimento de brotos e raízes no último dia de observação.

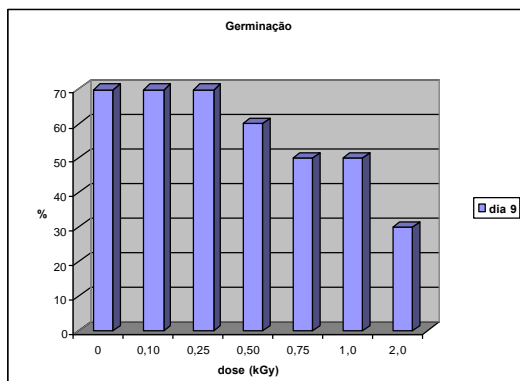


Figura 4. Porcentagem de germinação após 9 dias de observação.

Este trabalho com a germinação de trigo irradiado preocupou-se unicamente em se fazer uma abordagem qualitativa do teste de germinação para as sementes de trigo e distinguir faixas de dose passíveis de detecção. Pelos resultados observamos que o teste de germinação pode ser utilizado como um método simples e barato para a identificação de trigo irradiado mas é necessário que se realizem mais experimentos levando em consideração o período de estocagem após a irradiação, a umidade relativa no ambiente e as variedades do trigo. Concluímos que a desvantagem deste método está no longo tempo de realização, da ordem de 3 a 6 dias para a obtenção de resultados. A ressonância paramagnética eletrônica tem maior sensibilidade para doses mais elevadas, acima de 1,0 kGy, consiste em um teste rápido cujo resultado é obtido em minutos mas não pode ser aplicada em trigo que permaneceu estocado por longos períodos pois o sinal de RPE decai rapidamente com o tempo. Segundo Sunnetçioğlu^[8] e colaboradores, o rápido desaparecimento dos radicais livres produzidos no trigo pela radiação, torna a aplicação de técnicas tradicionais de RPE impraticável para grãos estocados por mais de 30 dias, no entanto não há referência às propriedades paramagnéticas da casca do trigo, que neste trabalho apresentou um sinal mais intenso e persistente que o sinal obtido nos grãos para os mesmos valores de dose. O teste de germinação tem maior sensibilidade para baixas doses até 2,0 kGy, não é um teste rápido pois o resultado é obtido em dias mas permite a investigação de trigo que ficou armazenado por meses. De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que os métodos investigados neste trabalho podem ser utilizados para a identificação de trigo irradiado. Concluímos também que a utilização de mais de um método de investigação deveria ser aplicado simultaneamente na análise de trigo irradiado para reduzir as incertezas sobre os resultados obtidos por uma única técnica.

REFERÊNCIAS

- [1] Swartz, H.M., Bolton, J.R. e Borg, D.C., **Biological Applications of Electron Spin Resonance**. Wiley-Interscience, 1972.

[2] Weil, J.A., Bolton, J.R. e Wertz, J.E., **Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications**. John Wiley & Sons INC, 1994.

[3] McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., Pearce, J., **Detection Methods for Irradiated Foods**. The Royal Society of Chemistry, 1996.

[4] Kawamura, Y., Suzuki, N., Uchiyama, S. e Saito, Y., **Germination test for identification of gamma-irradiated wheat**, Radiat. Phys. Chem. Vol. 40, No. 1, pp. 17-22, 1992.

[5] **A irradiação de alimentos: ficção e realidade**. Série de fichas descritivas do Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de Alimentos, ficha descritiva nº 1 do GCIA. Tradução e Edição: CNEN e Governo do Estado de Minas Gerais. Documento original.

[6] Cerda, H., Delincée, H., Haine, H., Rupp, H., **The DNA “comet assay” as a rapid screening technique to control irradiated food**. Mutation Reserch 375 (1997) 167-181.

[7] Luckey, T.D., **Hormesis with ionizing radiation**. CRC Press, 1980.

[8] Sunnetçioğlu, M.M., Dadaylı, D., Çelik, S. e Koksel, H., **Application of the Electron Paramagnetic Resonance Spin Probe Technique for Detection of Irradiated Wheat**. Cereal Chem, vol.75, nº6, pag 875-878, 1998.