

IDENTIFICAÇÃO DE PEIXE IRRADIADO POR MICROELETROFORESE DO DNA.

Quilma Ribeiro Leite*, Paula M. Koseki*, Koji Hamasaki*, Maria Fernanda Romanelli*, Kátia Iared Sebastião*, Anna Lúcia C. H. Villavicencio*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Centro de Tecnologia das Radiações – CTR – Lab. De Análise e Detecção de Alimentos
Travessa R, no. 400 Cidade Universitária - CEP: 05508-910
São Paulo, Brasil. e-mail: villavic@net.ipen.br

RESUMO

O uso da radiação ionizante em alimentos traz vários benefícios, entre eles a diminuição de patógenos e a extensão da vida útil. Para a certificação do tratamento por radiação, é conveniente aplicar métodos de detecção diretamente no alimento. Já existem métodos de detecção para identificar o tratamento de alimentos por radiação aprovados pela Comunidade Européia desde 1996. A maioria requer equipamentos relativamente caros e necessitam de técnicas apuradas de extração dos compostos a serem identificados. A detecção pela formação de fragmentos de DNA usando-se a micro eletroforese vem de encontro à proposta de se utilizar um método de varredura, rápido, simples e barato como requisito de pré identificação de alimentos irradiados. Sabendo que a molécula de DNA é sensível à irradiação ionizante, utilizamos este método conhecido como “ensaio do cometa”, que se baseia nas alterações ocorridas no DNA, onde apresenta migrações bem características quando sofre o tratamento por radiação. Em nosso experimento, a espécie de peixe utilizada foi o cação, irradiado com ^{60}Co nas doses de 0; 1.0; 3.0; 5.0; 7.5 e 10.0 kGy. Os resultados nos mostram que conforme o aumento da dose, há um aumento da migração dos fragmentos, indicando desta forma, o dano pela radiação no DNA.

I. INTRODUÇÃO

Atualmente, a sociedade busca uma maior qualidade nos alimentos a serem consumidos. Neste contexto, o processamento dos alimentos por radiação se destaca. Esta é uma tecnologia na qual os alimentos são submetidos a uma certa dose de radiação ionizante pré estabelecida.

A irradiação de alimentos é um tratamento eficiente com amplas aplicações, entre elas, a redução das perdas nas colheitas e estocagem de alimentos assegurando assim a qualidade higiênica. As doses consideradas baixas, de até 1 kGy inibem o brotamento de sementes, inativa insetos e parasitas que estariam promovendo o processo de deterioração em cereais e legumes, frutas frescas e secas, carnes vermelhas, frutos do mar e peixe seco. Atua também no processo de maturação de frutas. As doses consideradas médias, são propostas entre 1 e 10 kGy, indicadas para o aumento da vida útil de peixe fresco e morangos, eliminação de microorganismos esporulados e patogênicos em diversos tipos de alimentos processados ou “in natura”, frutos do mar frescos e congelados, aves e carnes cruas ou congeladas. Participa também na melhoria das propriedades tecnológicas dos alimentos. As doses acima de 10kGy são utilizadas para esterilização industrial em combinação com aquecimento brando, descontaminação de certos aditivos e ingredientes alimentícios, além do uso como alimento esterilizado para pacientes imunodeprimidos, alpinistas e esportistas em geral

[1]. A irradiação facilita o comércio em grande escala de alguns produtos alimentícios com a vantagem de não deixar resíduos tóxicos. Tal método pode ser usado independentemente ou de forma combinada às técnicas convencionais já existentes, como, o tratamento pelo calor, a refrigeração, a desidratação e a defumação [2,3].

A unidade que mede a dose absorvida é o gray (Gy), 1 Gy equivale a 1 J (Joule) de energia absorvida por 1 kg de alimento irradiado. A grande diferença entre os raios gama provenientes de uma fonte de ^{60}Co e os elétrons oriundos de um acelerador industrial, é o seu poder de penetração [4,5,6]. É importante salientar que tanto a radiação gama de ^{60}Co , como a dos feixes de elétrons dos aceleradores, não têm energia suficiente para provocar qualquer reação nuclear na matéria e portanto, não deixam nenhum resíduo radioativo no material após a irradiação [5,6,7,8]. Os níveis de energia permitidos para os raios X ou γ são inferiores ou igual a 5 MeV e para elétrons, inferiores ou igual a 10 MeV [4,5,9,10]. Nenhum processo de tratamento de alimentos pode fazer com que um alimento estragado se torne próprio para o consumo, se o alimento mostra sinais de decomposição, não poderá ser recuperado pela irradiação [11]. A irradiação repetida do alimento deve ser evitada, pois pode ocorrer uma degradação do alimento sob o ponto de vista organoléptico e nutricional [5,8]. As alterações provocadas em macro nutrientes, tais como as proteínas, os carboidratos e as gorduras são relativamente estáveis às doses de até 10 kGy e os micro

nutrientes dependem da dose da radiação, do tipo de alimento, da temperatura, do teor de água e da presença de oxigênio no momento da irradiação. Deve ser salientado que as perdas dos micro nutrientes em alguns alimentos são pequenas ou nulas quando irradiados e ocorrem em muito maior escala em outros métodos de preservação [9].

No Brasil, o decreto lei nº. 72.718, de 29 de agosto de 1973 estabelece normas gerais sobre irradiação de alimentos. Em 8 de março de 1985, a portaria nº 9 da DINAL (Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos, do Ministério da Saúde), em conjunto com a CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), e o INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), estabelecem as normas gerais para irradiação de alimentos [9]. Observamos nos Peixes e produtos derivados (filés, salgados, defumados, secos, derivados), que o objetivo da irradiação é para aumentar a vida útil, descontaminação e desinfestação, onde a dose máxima permitida é 2.2 kGy. Uma forma de controle para sabermos se o alimento foi irradiado ou não, é a utilização dos métodos existentes para detecção de alimentos irradiados. Atualmente existem 5 métodos disponíveis, aprovados pela comunidade europeia. [13,14].

Entre os métodos de detecção de alimentos irradiados, o teste do “Comet Assay”, ocupa uma posição de destaque, atualmente é considerado como um método “screening”, não é um método específico para identificação de alimentos irradiados, entretanto os resultados encontrados podem indicar se o alimento sofreu algum tratamento por radiação, devendo ser este confirmado por testes mais específicos, conforme o tipo de alimento [11,13,15].

II. OBJETIVOS

Nosso trabalho teve como objetivo aplicar a técnica de detecção dos fragmentos do DNA formados pela radiação ionizante e identificar se as amostras propostas sofreram alterações detectáveis a nível de DNA, conforme o aumento da dose de radiação.

III. MATERIAL E MÉTODO

Amostras: Utilizou-se amostras de cação, que foram adquiridas em supermercados.

Irradiação: As amostras foram submetidas à radiação de ^{60}Co (Gammacell 220) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares –IPEN-CNEN/SP. As doses utilizadas no cação foram: 0; 1.0; 3.0; 5.0; 7.5 e 10.0 kGy.

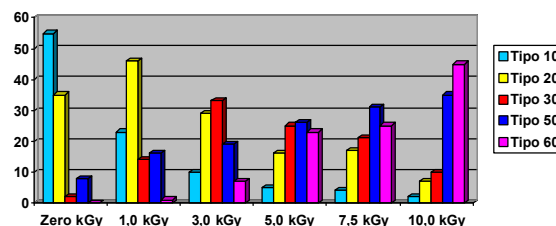
Método: O método utilizado, baseia-se nas alterações ocorridas no DNA. Foi utilizada a metodologia proposta por Cerda *et al.* 1997 [16]. Nesta metodologia propomos algumas alterações, visando a melhoria dos resultados. Na coloração, utilizamos 0,07% de AgNO_3 em vez de 0,02%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no teste do cometa mostraram que para os controles, não houve modificação, conforme observamos na figura 1a e no gráfico. Para as doses de 1.0 kGy, o início das modificações fica visível, porém com sutis alterações. Podemos observar que migrações denominadas de tipo 20 e posteriores, começam a ficar mais evidentes, conforme figura 2 b, c, d, e, f. Nas doses de 5,0 e 7,5 kGy, as modificações são mais evidentes e o aparecimento de migrações com maior número de fragmentos são mais frequentes.

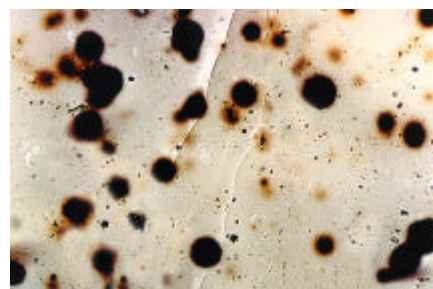
Na dose de 10 kGy, os fragmentos de DNA são bem mais evidentes e com uma extensão em micrômetros bem definidas. Os fragmentos encontrados quando comparados aos controles, são característicos da irradiação, mostrando uma nítida migração dos fragmentos de DNA das células, conforme observados nas figuras 1 e 2 f.

Figura 1: Contagem dos tipos de migração em amostras de cação.

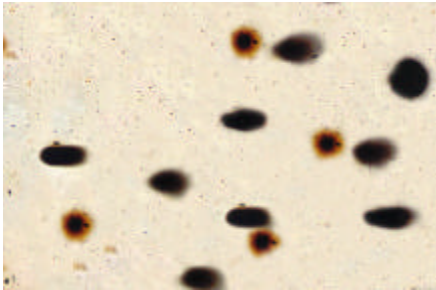


É evidente que a fragmentação do DNA ocorre após o tratamento com radiação e que também encontramos uma relação na dependência de aumento de dose e no aumento do comprimento formado pelos fragmentos de DNA.

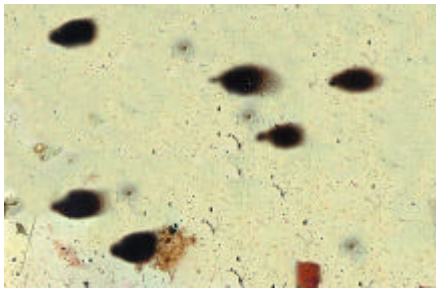
Fig. 2 – Fragmento de DNA em amostras de carne de Cação, no aumento de 10X



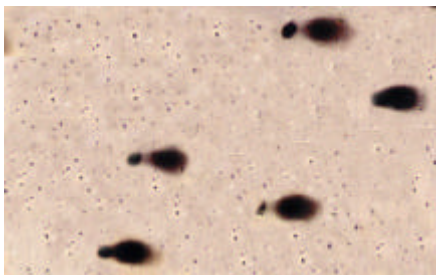
(a) Não irradiado.



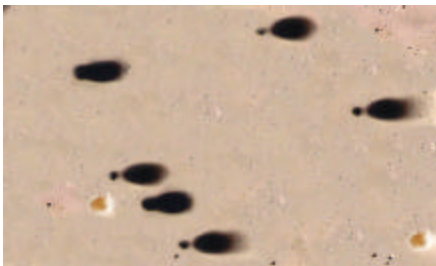
(b) Irradiado com 1,0 kGy.



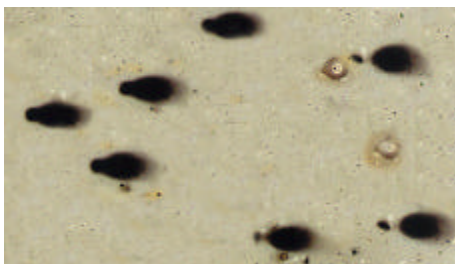
(c) Irradiado com 3,0 kGy.



(d) Irradiado com 5,0 kGy.



(e) Irradiado com 7,5 kGy



(f) Irradiado com 10,0 kGy.

O uso da metodologia do “Comet Assay” utilizada como um método de varredura, tem sido descrito por vários autores [17,18,19] com resultados satisfatórios, com estudos de carne de frango fresca, carne de porco e peixes. Esta metodologia é considerada promissora e de baixo custo [16]. Deve-se ressaltar que esta metodologia é aplicável a alimentos que não sofreram tratamento por calor [20].

V. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o teste de análise dos fragmentos de DNA oferece neste caso, um método em potencial para varredura inicial de detecção de peixe irradiados, além de ser rápido e barato. Nossos resultados estão de acordo com outros da literatura. Observamos que as células não irradiadas exibem uma migração limitada do DNA enquanto que as irradiadas produzem “cometas” sugerindo o tratamento por radiação, indicando que devem ser feitos testes mais complexos.

VI. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à **FAPESP** e ao **IPEN-CNEN/SP**.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DELINCÉE, H. Is it safe to eat irradiated food? Toxicological aspects. **Ann. Fals. Exp. Chim.** – Outubro-November-Décembre 90 – N° 941 – pp. 331-346. 1997.
- [2] FU, A.; SEBRANEK, J.G. and MURANO, E.A. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* O157:H7 and quality changes after irradiation of beef steaks and ground beef. **Journal of Food Science**, 60(5): 972-977. 1995.
- [3] SATIN, M. Food Irradiation. A Guidebook. **Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA; 1993.**
- [4] HAYASHI, T. Comparative effectiveness of gamma-rays and electron beams in food irradiation. In: **Stuart Thorne, Food irradiation, 1991**
- [5] DIEHL, J.F. Safety of irradiated food. **New York: Marcel Dekker, 454 p., 1995.**
- [6] MUÑOZ, R.B. Preservación de alimentos por irradiación. **Escuela Politecnica Nacional, 363p. Quito, Equador. 1985.**
- [7] IAEA (International Atomic Energy Agency) Analytical detection methods for irradiated foods: a review of the current literature. Vienna, 1991. 172p. [**IAEA-TECDOC-587**].

[8] SINGH, H. Wholesomeness of irradiated foods. In: **"FIPCOS '95"**. Canadá, 1995.

[9] LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS In: ABIA (Associação Brasileira das indústrias da alimentação) **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo, 1992, v. 1, p. 2.12-2.13; 2.30-2.32; 2.45-2.46.

[10] MCKEON, J. & DREWELL, N.H. Physical Mechanisms of irradiation technologies and their characteristics effects, pp. 3 - 13.. in: **Detection Methods for Irradiated Foods, current status** ed. by Cecil H. McMurray et al. 1996.

[11] DELINCÉE, H. DNA "comet assay" for rapid detection of irradiated food. **Acta Aliment., Budapest**, v. 25, n. 3, p. 319-321, 1996.

[12] VANDERVEEN JE. Interactions of food additives and nutrients. Nutrient interactions: **Proceedings of the 11th annual Basic Symposium of the Institute of Food Technologists & the Internacional Union of Food Science & Technology**. pp. 351-363 ; 1988.

[13] DELINCÉE, H. Detection of food treated with ionizing radiation. **Trends in Food Science & Technology**. 9:73-82. 1998.

[14] VILLAVICENCIO, A.L.C.H., MANCINI-FILHO, J. AND DELINCÉE, H. Application of a rapid screening method to detect irradiated meat in Brazil. **Radiation Physics and Chemistry** vol. 57:3-6, 295-298, 2000.

[15] McMURRAY, C. H., STEWART, E.M., GRAY, R., PEARCE, J., eds. Detection methods for irradiated foods: current status. **Cambridge: Royal Society of Chemistry**, 1996.

[16] CERDA, H., DELINCÉE, H., HAINE, H., RUPP, H. The DNA "comet assay" as a rapid screening technique to control irradiated food. **Mutat. Res., Amsterdam**, v.375, p. 167-181, 1997.

[17] CERDA, H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA comet assay. **Lebensm. Wiss. Technol.**,31: 89 - 92. 1998.

[18] KHAN, H. M. & DELINCÉE, H. Detection of irradiation treatment of foods using DNA "comet assay". **Radiat. Phys. Chem.**, 52: 141-144. 1998.

[19] VILLAVICENCIO, A.L.C.H., MANCINI-FILHO, J. AND DELINCÉE, H. Application of a rapid screening method to detect irradiated meat in Brazil. **Rad. Phys. Chem.** vol. 57:3-6, 295-298, 2000.

[20] Cerda, H. & Koppen, G. DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay **Lebensm. Unters Forsch. A**. 207:22-25. 1998.

ABSTRACT

The use of the ^{60}Co gamma rays in foods as a food process, brings benefits. Although properly irradiated food is safe and wholesome, consumers should be able to make their own free choice between irradiated and non-irradiated food. For this purpose labelling is indispensable. In order to check compliance with existing regulations, detection of radiation treatment by analysing the food is highly desirable. Since irradiation has been confirmed to be a very efficient method for the production of healthy, wholesome and microbiologically safe food, this paper intend to report the application of the DNA comet assay to detect the irradiation treatment in Fish. In our experiment, the used refrigerated fish meat, obtained in supermarket and irradiated with ^{60}Co in the following doses: 0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5 and 10,0 kGy. the results show us that it conforms the increase of the dose, there is an increase of the migration of the fragments, indicating this way, the damage for the radiation in the DNA.