

DETECÇÃO DE CEBOLAS ARGENTINAS TRATADAS POR RADIAÇÃO DE ^{60}Co

Maria Fernanda Romanelli*, Clara Croci**, Kátia I. Sebastião*, Quilma R. Leite*, Paula M. Koseki*, Koji Hamasaki* e Anna Lúcia H. Villavicencio*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
CEP: 05508-910, São Paulo, Brasil
e-mail: villavic@net.ipen.br

**Universidad Nacional Del Sur
Avda. ALEM 1253
8000 Bahia Blanca, Argentina

RESUMO

Tradicionalmente o Brasil tem sido o principal importador de cebolas frescas da Argentina dentro do MERCOSUL. Nos últimos anos, um aumento na demanda deste produto fresco obrigou os países membros a unificar critérios que destacam as restrições fitossanitárias como o uso de produtos químicos. O uso do processo de radioinibição está descrito nos Códigos Nacionais de Alimentos tanto no Brasil como na Argentina. O emprego de métodos que permitam detectar o tratamento por irradiação contribuem para aumentar a confiança do consumidor quanto ao uso correto desse processo. O objetivo deste trabalho foi analisar os fragmentos de DNA formados durante o processo de irradiação e a estocagem por seis meses, como indicadores de detecção de alimentos irradiados. Foram usadas cebolas irradiadas argentinas. As cebolas irradiadas apresentaram tempo de estocagem maior quando comparadas às não irradiadas e, quando submetidas a eletroforese em gel de agarose, as células irradiadas apresentaram migrações do DNA em forma de cometa, enquanto que as células não irradiadas apresentaram migrações limitadas de DNA. Esse método demonstrou ser efetivo como uma varredura inicial para a detecção de cebolas irradiadas.

I. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta altas taxas de perdas pós-colheita e grande incidência de alimentos contaminados. Países da América do Sul produzem grande variedade de alimentos, que em muitos casos são deficientes em armazenagem e condições fitossanitárias [1]. O Brasil tem sido o principal importador de cebola fresca da Argentina no MERCOSUL [2]. Apenas três países da América do Sul possuem legislação sobre a irradiação de alimentos: Brasil, Argentina e Chile [3]. As cebolas são muito usadas pelo sabor que conferem aos alimentos, sendo boa fonte de vitamina C. Um aumento na demanda deste produto fresco obrigou países membros do MERCOSUL a unificar critérios que destacam restrições fitossanitárias, como o uso de produtos químicos [2]. A utilização das radiações ionizantes representa uma alternativa na preservação de alimentos. A interação da energia ionizante com a matéria promove efeitos distintos que permitem prolongar o período de armazenamento e consumo dos produtos alimentícios [4], além de causar a inativação de microorganismos, desinfestação de insetos, inibição de brotamento e atraso no

amadurecimento [5]. A WHO (World Health Organization) reconheceu a irradiação de alimentos como uma técnica segura contra a perda de alimentos [6]. Para o tratamento de produtos alimentícios são utilizadas radiações procedentes de fontes de ^{60}Co e elétrons acelerados, que são radiações ionizantes. De acordo com a finalidade da irradiação para um determinado alimento, são utilizadas diferentes doses de radiação: - prevenção de brotamento (0,05 a 0,15 kGy); - retardo no amadurecimento (0,2 a 0,5 kGy); - controle ou eliminação de insetos (0,2 a 1,0 kGy) e eliminação de parasitas, helmintos, bactérias patogênicas ou responsáveis pela deterioração, fungos e leveduras (2,0 a 10,0 kGy). As energias das fontes de irradiação de alimentos são muito baixas para induzir radioatividade em qualquer material. [7]. A inibição de brotamento por radiação ionizante vem sendo muito estudada e tem alcançado grande difusão. O uso de baixas doses de radiação (60 a 90 Gy) é indicado para controlar o brotamento em bulbos e tubérculos. A inibição também pode ser obtida através do emprego de inibidores químicos para brotamento que deixam resíduos no produto. Por motivos de saúde os inibidores são considerados nocivos e muitos países têm proibido o seu

uso. Podem ser usadas ainda baixas temperaturas/refrigeração durante um período longo de estocagem, o que se torna dispendioso, particularmente em regiões tropicais. A inibição de brotamento por radiação ionizante ou radioinibição não deixa resíduos e permite a estocagem em temperaturas mais elevadas [8].

O processo de radioinibição interrompe o desenvolvimento normal do broto e permite o aumento do período de armazenagem em condições ambientais. A Argentina autoriza o consumo batatas e bulbos de alho e cebolas tratados com energia ionizante desde o ano de 1989. Para a conservação de bulbos e tubérculos é necessário ter um produto em boas condições e seguir-se uma correta manipulação a partir da colheita.

Com o aumento do mercado de aplicação de alimentos irradiados, cresce o interesse no desenvolvimento de metodologias adequadas para detectar se um alimento foi irradiado ou não. Os métodos de detecção são necessários para o controle do processamento e comércio de alimentos irradiados [3].

Existem diferentes métodos de detecção de alimentos irradiados, classificados em métodos físicos (ESR, luminescência, termoluminescência, etc.), químicos (evolução dos gases, Ensaio do Cometa, etc.) e biológicos (germinação, teste microbiológico e imunológico) [5]. O teste do Ensaio do Cometa (Comet Assay) é baseado nas alterações ocorridas no DNA, já que essa molécula é o principal alvo da irradiação ionizante. O dano causado no DNA das células pode ser avaliado usando-se eletroforese em micro gel de agarose.

II. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi analisar os fragmentos de DNA formados durante o processo de irradiação e a estocagem por seis meses, como indicadores de detecção de alimentos irradiados.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Material. Foram usadas cebolas (*Allium cepa L.*) do cultivar Valcatorce INTA, produzidas na província de Buenos Aires.

Métodos. As cebolas foram tratadas por radiação ionizante no Centro Atômico Ezeiza, na Argentina. As irradiações foram feitas em fonte de ^{60}Co , utilizando-se as doses de 0 e 0,06 kGy, com taxa de dose de 16,5 kGy/h. Foi utilizado o método de detecção do Ensaio do Cometa, proposto inicialmente por Cerda *et al.*, logo após a irradiação. As cebolas foram estocadas em temperatura ambiente por seis meses. Após esse período fez-se novamente a detecção através do Ensaio do Cometa. Os resultados foram analisados através de lâminas para microscopia, submetidas à eletroforese em micro gel de agarose, que continham uma suspensão de células do alimento em estudo. De acordo com o grau de migração dos fragmentos de DNA os "cometas" formados receberam diferentes valores, de 10 a

50. Foi observado o brotamento das cebolas armazenadas por seis meses, irradiadas e não irradiadas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras que foram processadas por radiação, quando comparadas com as amostras controle, não irradiadas, apresentaram diferentes variações no grau de migração dos fragmentos de DNA.

Conforme observamos na figura 1, a migração dos fragmentos existentes é bem menor quando comparada com as amostras tratadas. Os cometas encontrados nas amostras são provavelmente formados pelo processo natural de morte celular conhecido como apoptose.

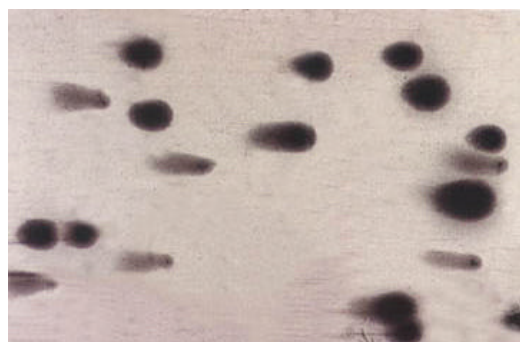


Figura 1. Migrações do DNA de Cebola não Irrradiada.

A figura 2 mostra um aumento significativo em tamanho e tipo de migrações após o tratamento com radiação.



Figura 2. Migrações do DNA da Cebola Irradiada com 0,06kGy.

Após 6 meses de estocagem, observamos nas amostras controle que algumas cebolas não irradiadas, apresentaram o processo de germinação. Estas amostras apresentaram brotos bem viçosos e verdes.

Observando a figura 3, nas amostras que apresentaram brotos, podemos notar que não houve ruptura de DNA, não apresentando nenhuma migração do tipo cometa. Este tipo de comportamento sugere que as células não entraram em processo de apoptose.

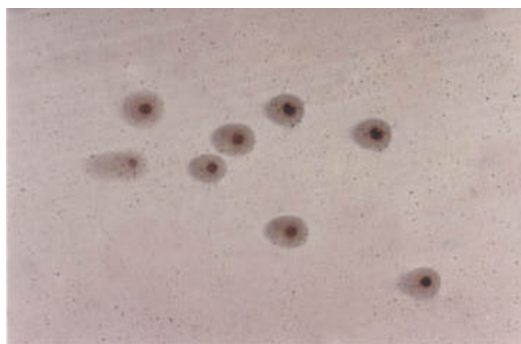


Figura 3. DNA da Cebola não Irradiada Brotada, após 6 Meses de Estocagem.

Após seis meses de estocagem em temperatura ambiente, podemos observar na figura 4 que nas amostras não brotadas também não houve migração significativa do DNA, indicando assim que estas amostras não sofreram danos provocados por qualquer tipo de tratamento.

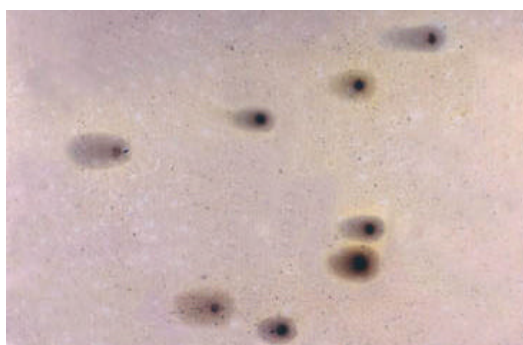


Figura 4. DNA da Cebola não Irradiada e não Brotada, após 6 Meses de Estocagem.

Após seis meses, as cebolas estocadas irradiadas não apresentaram brotamento.

Pode-se observar na figura 5 que ocorreu uma migração de fragmentos de DNA, indicando assim que estas amostras sofreram algum tipo de dano no DNA, provavelmente provocado pela radiação.

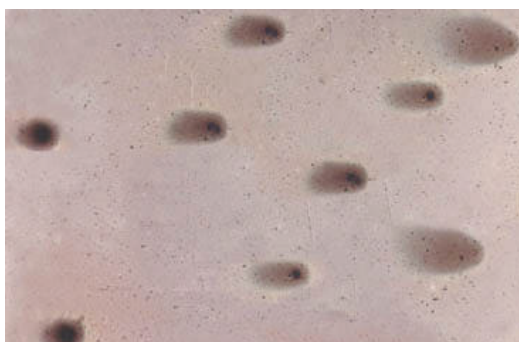


Figura 5 .Migrações do DNA da Cebola Irradiada com 0,06kGy,após 6 Meses

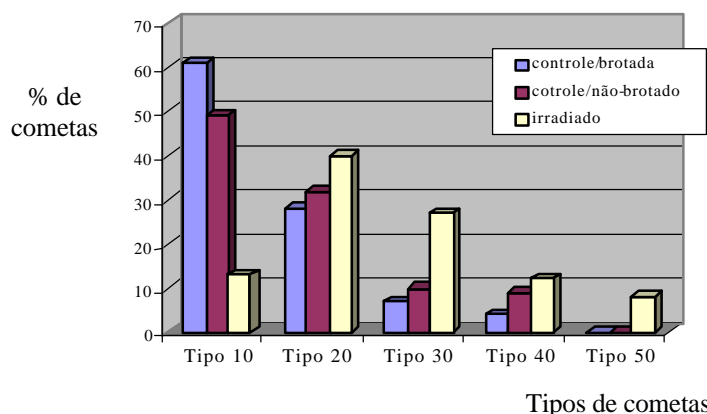


Figura 6. Análise de Cebolas Irradiadas e não Irradiadas após 6 Meses.

Os danos causados no DNA das células da cebola, puderam ser identificados logo após a irradiação (figuras 1 e 2) e após seis meses de estocagem (figuras 3, 4 e 5). Após seis meses de estocagem, o DNA da cebola irradiada apresentou uma diminuição na migração dos fragmentos, sugerindo a atuação de algum mecanismo de reparação.

Outros trabalhos foram realizados, baseados na migração dos fragmentos de DNA como detecção do tratamento por radiação. Koppen & Cerda [9] identificaram sementes irradiadas com doses baixas utilizando o método do “comet assay”. Os resultados obtidos nesse trabalho também mostram que sementes irradiadas com pequenas doses podem ser detectadas um ano após a irradiação. Delincée [10] utilizou sementes de “grapefruit” para analisar os fragmentos de DNA em frutas irradiadas. Células não irradiadas apresentaram o DNA intacto ou mostraram pequena migração do DNA. Já em células irradiadas não foi observado DNA intacto e sim migrações longas de DNA, formando a cauda do cometa.

Villavicencio [11] obteve típicos cometas formados pela radiação em feijões e migração limitada do DNA em células não irradiadas.

Os dados bibliográficos e os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a técnica do “comet assay” pode ser usada como uma varredura inicial para a detecção de vegetais tratados por radiação ionizante, com o objetivo de atrasar o amadurecimento, desinfestação e inibição do brotamento.

V. CONCLUSÕES

A molécula de DNA é particularmente sensível à radiação ionizante e quando submetida a esse tratamento, o DNA sofre danos, originando fragmentos. Esses fragmentos formados são utilizados para se detectar se o alimento foi irradiado ou não.

Após seis meses, o DNA da cebola irradiada apresentou uma diminuição da migração, sugerindo que o material genético sofreu reparos.

Os resultados obtidos nesse trabalho também mostram que cebolas irradiadas podem ser detectadas

mesmo tendo sido estocadas por seis meses após a irradiação.

O método do "comet assay" demonstrou ser efetivo como uma varredura inicial para a detecção de cebolas irradiadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Oliveira, L. C., Present situation of food irradiation in South America and the regulatory perspectives for Brazil. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. 57: 3-6, p 249-252, 2000.
- [2] Perez, M.B.; Curzio, O. A.; Aveldaño, M.L.; Croci, C.A., Effects of γ -irradiation on the lipid composition of inner sprout of garlic. **Radiation Physics and Chemistry**, Anaheim, vol. 52: 1-6, p 113-117, 1998.
- [3] Thomas, P. and Selvan, E., Application of flow cytometric DNA measurements in the detection of irradiated onions. **J. Sci. Food Agric.**, vol. 67, p 293-297, 1995.
- [4] Curzio, O.A.; Croci, C.A.; Urioste, A.M., Consumer Acceptance of Irradiated Onions in Argentina. **Food Technology**, vol. 44 (5), p 134-136, 1990.
- [5] Villavicencio, A. L. C. H., **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ^{60}Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris L.* e *Vigna unguiculata (L.) Walp.* Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, 1998.**
- [6] Diehl, J. F.; Hasselman, C. and Kilmcart, D., Regulation of food irradiation in the European Community: is an issue? **Food Control**, vol. 2, p 212-219, 1991.
- [7] GCIA (Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de Alimentos). **A irradiação de alimentos: ficção e realidade.** 1991.
- [8] ICGFI. **Facts about food irradiation: a series of fact sheets from International Consultative Group on Food Irradiation.** Vienna: ICGFI; 1999.
- [9] Koppen, G., Cerda, H. Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. **Lebensm. Wiss. Technol.**, Zurich, vol. 30, p 452-457, 1997.
- [10] Delincée, H., **Detection of irradiated food: DNA fragmentation in grapefruits.** 10th International Meeting on Radiation Processing, California, 1997.
- [11] Villavicencio, A.L.C.H., Mancini-Filho, J., Delincée, H. Application of different techniques to identify the effect

of irradiation on Brazilian beans after six months storage. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, vol. 52: 1-6, p 161-166, 1998.

ABSTRACT

Brazil has been the most important MERCOSUL's purchaser of fresh onions from Argentina. The increased claim for this fresh product has forced a consensus between the members' nations, as regards to phytosanitary restrictions. The radioinhibition is described on National Food Codes in Brazil and Argentina. Methods of food irradiation detection must be performed, since they increase the consumer's confidence. Quick and simple screening tests indicate whether a food product has been irradiated or not. This present study verified the DNA fragments of argentine fresh onions, produced during radiation process and 6 months of storage period. The DNA fragments are analyzed for detection of irradiated foods. The irradiated onions presented extensive DNA migrations, as comets, when submitted to agarose gel electrophoresis. They also showed more shelf life compared to the unirradiated onions. The unirradiated samples exhibited only limited DNA migration. This initial screen method showed to be effective for detection of irradiated onions.