

TESTE DO COMETA NA DETECÇÃO DE ALHO IRRADIADO

Anna Lucia C.H. Villavicencio¹; Nélide Simona Marín-Huachaca¹; Maria Fernanda Romanelli¹ and Henry Delincée²

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - **IPEN-CNEN/SP** - CTRD
Av. Lineu Prestes 2.242, CEP:05508-900 Butantã, São Paulo, SP, Brasil
e-mail: villavic@net.ipen.br

²Federal Research Centre for Nutrition - **BFE** –
Haid-und-Neu-Str. 9, D-76131 Karlsruhe, Germany.
e-mail: henry.delincee@bfe.uni-karlsruhe.de

RESUMO

A irradiação de alimentos oferece grandes benefícios à indústria dos alimentos e ao consumidor. Pode ser aplicada na inibição do brotamento de bulbos e tubérculos em vez do uso de inibidores químicos do brotamento tais como a hidrazida maleica, propham, cloroprotham entre outros, os quais deixam resíduos cancerígenos nos produtos alimentícios. Doses baixas de radiação ionizante, entre 0,05 e 0,15 kGy, são utilizadas na inibição do brotamento de vegetais. A necessidade de dispor de métodos de detecção de alimentos irradiados surgiu como resultado do progresso no comércio internacional de alimentos irradiados e pela demanda do consumidor. Neste trabalho foi utilizado o teste do cometa do DNA para a detecção do processamento por irradiação de amostras de alho provenientes da China. Essa técnica é considerada como um método de varredura e é adotada como método padrão de detecção de alimentos irradiados na Comunidade Européia (EN 13784).

Keywords: food irradiation; garlic; comet assay; DNA

I. INTRODUÇÃO

A utilização das radiações ionizantes representa uma alternativa na preservação de alimentos. Para o tratamento de produtos alimentícios são utilizadas radiações procedentes de fontes de ⁶⁰Co, aceleradores de elétrons e raios X [1]. A interação da energia ionizante com a matéria promove efeitos distintos que permitem prolongar o período de armazenamento e o consumo dos produtos alimentícios, além de causar a inativação e a redução de microorganismos patogênicos, eliminação de insetos, inibição de brotamento e atraso no amadurecimento [2,3,4].

A conservação de alimentos pela irradiação é recomendada por instituições nacionais e internacionais, dentre elas a Associação Médica Americana, o FDA nos Estados Unidos, a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) [5,6]. O processamento dos alimentos por radiação está relacionado com a sua conservação. Dependendo do tipo de alimento e a dose de radiação, a energia ionizante pode ter uma variedade de funções diferentes.

O propósito de irradiar vegetais é, freqüentemente, produzir uma forte interferência com as funções metabólicas normais da planta, retardando ou evitando sua germinação. Batatas, cebolas e alhos são comercializados

irradiados para evitar o brotamento. A causa imediata do fenômeno biológico observado após irradiação, tal como a inibição do crescimento e brotamento, é provavelmente o resultado do dano da radiação sobre o DNA [2,4].

De acordo com a finalidade da irradiação para um determinado alimento, são utilizadas diferentes doses de radiação:

- prevenção de brotamento (0,05 a 0,15kGy);
- retardo no amadurecimento (0,2 a 0,5kGy);
- controle ou eliminação de insetos (0,2 a 1,0kGy);
- eliminação de parasitas, helmintos, bactérias patogênicas ou responsáveis pela deterioração, fungos e leveduras (2,0 a 10,0kGy) [7].

A inibição do brotamento por radiação ionizante vem sendo muito estudada e tem alcançado grande difusão. O uso de baixas doses de radiação (0,05 a 0,15kGy) é indicado para controlar o brotamento em bulbos e tubérculos. Doses maiores que 1,0kGy inibem nitidamente o brotamento de feijões e trigo [8,9,10,11].

A inibição também pode ser obtida pelo emprego de inibidores químicos para brotamento que deixam resíduos no produto, como a hidrazida maleica. Por motivos de saúde pública, os inibidores químicos de brotamento, são considerados nocivos e muitos países têm proibido os seus usos [12].

As radiações gama de ⁶⁰Co e a radiação de feixe de elétrons não deixam nenhum resíduo radioativo no material

após a irradiação, pois são consideradas muito baixas para induzir radioatividade em qualquer tipo de alimento [2,3,4,6]. Em geral, o processo de irradiação de alimentos acarreta poucas alterações químicas nos alimentos, uma vez que não é nocivo e não compromete o sabor do alimento [2,7].

A capacidade para identificar analiticamente alimentos irradiados, complementando com a certificação, ajudam a aumentar a confiança dos consumidores. A presença de tais métodos de detecção confirma aos consumidores que o controle pode ser efetivo. Pode ser possível checar a concordância com as regulamentações existentes e eventualmente facilitar o comércio internacional de alimentos [13,14].

O teste do cometa, “DNA Comet Assay” [15], tem sido aplicado a um grande número de alimentos tanto de origem animal como vegetal. As vantagens desse teste são sua velocidade e simplicidade, pois a separação eletroforética só demora alguns minutos [7,8,10,11,15-26]. É considerado como um método de varredura, adequado para sugerir em alguns casos se o alimento foi processado por irradiação ou não, e seus resultados deverão ser confirmados por outros métodos mais específicos para a irradiação. Esse método é proposto como padrão europeu para a detecção de alimentos irradiados pela Comunidade Européia como padrão de número EN 13784. [27].

II. METODOLOGIA

Amostras. Amostras conhecidas foram obtidas de agricultores locais, para se ter certeza que não haviam sofrido o tratamento anteriormente por irradiação.

Dois grupos de amostras desconhecidas, A e B, provenientes da China, foram enviadas pelo Ministério da Agricultura para serem analisadas se sofreram o tratamento por radiação.

Irradiação. Algumas irradiações foram realizadas em fonte de ^{60}Co , Gammacell 220 (A.E.C.L.), no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). As doses utilizadas na irradiação dos alhos tidos como parâmetros foram de 30, 60 e 80Gy, com taxa de dose de 6,55kGy/h.

Teste do DNA. A metodologia de análise dos fragmentos de DNA foi realizada de acordo com o proposto inicialmente por CERDA *et al.*, 1997[15]. Essa metodologia foi aplicada para os alhos, irradiados e não irradiados, sendo repetida em todos os materiais. Das amostras de alho, foram retiradas as porções que originam o broto e porções próximas a elas. As quantidades retiradas foram pesadas, usando-se 2g de cada amostra.

A extensão do dano no DNA das amostras desconhecidas, foi comparada com o de amostras tratadas com doses conhecidas.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando-se o Teste do Cometa, observou-se que as amostras do grupo A mostraram células intactas na sua grande maioria, apesar de apresentarem também células com leve fragmentação de DNA, sugerindo uma cauda em forma de cometa, conforme pode ser observado na figura 1.

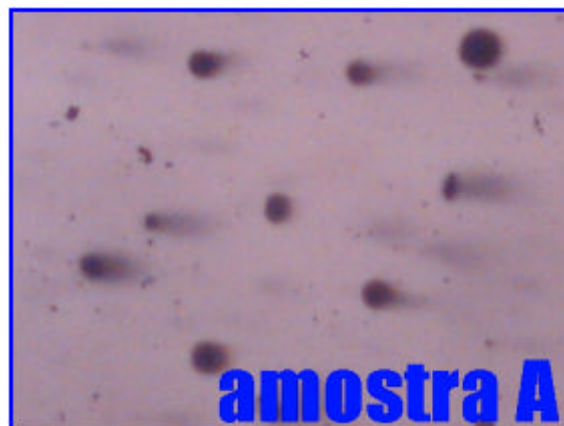


Figura 1. Amostra A

As amostras do grupo B também mostraram comportamento semelhante aos do grupo A. Apesar de serem encontradas as estruturas em forma de cometa, as células sem migração do DNA estavam em maior quantidade, conforme pode ser observado na figura 2.

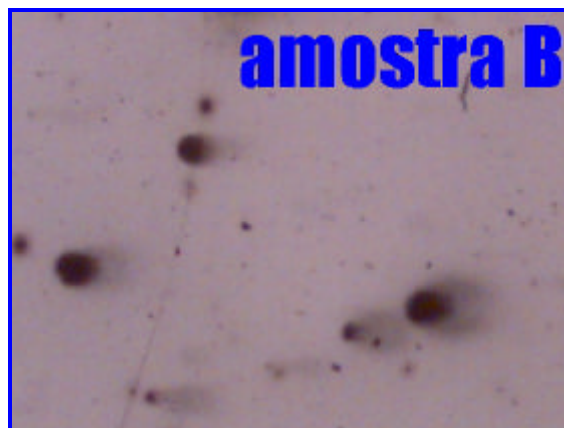


Figura 2. Amostra B

Para controle das análises, utilizou-se alhos sem qualquer tipo de tratamento e foram observados resultados semelhantes às amostras enviadas, porém com maior número de células intactas, conforme a figura 3.

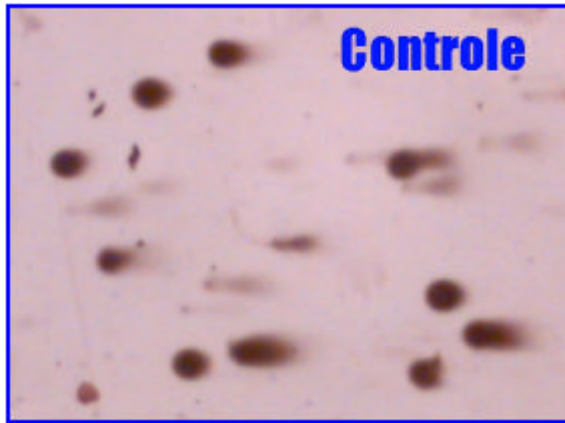


Figura 3. Amostra Controle

Para comparação, também foram analisadas amostras de alho tratados com a substância química hidrazida maleica (figura 4), utilizada como inibidora de brotamento.

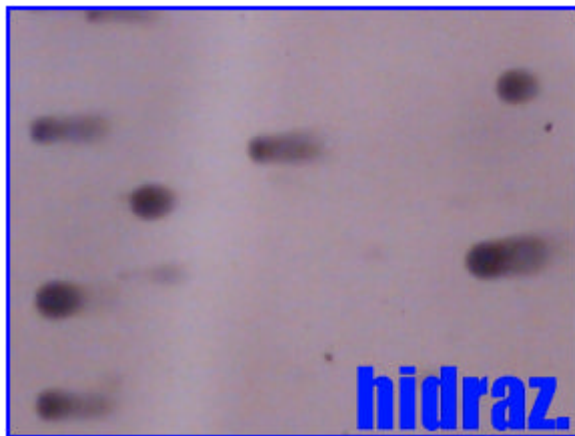


Figura 4. Amostra tratada com Hidrazida Maleica

Observou-se um leve dano no DNA das células, semelhante aos das amostras irradiadas, conforme observamos nas figuras 5, 6 e 7.

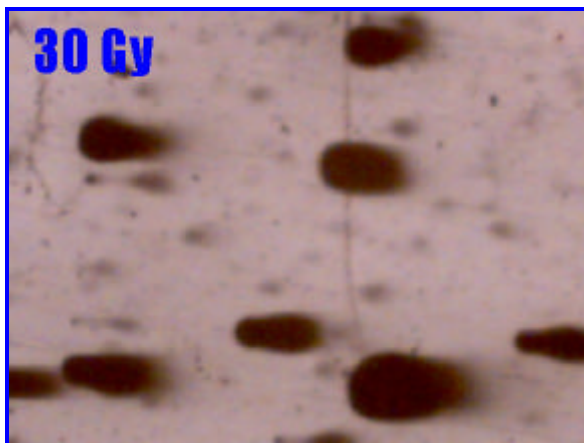


Figura 5. Amostra Irradiada com 30 Gy

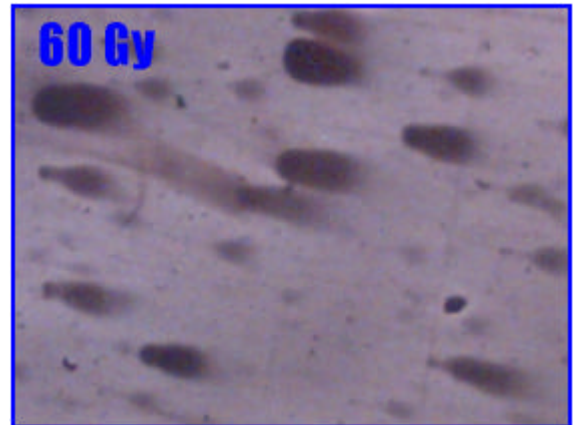


Figura 6. Amostra Irradiada com 60 Gy

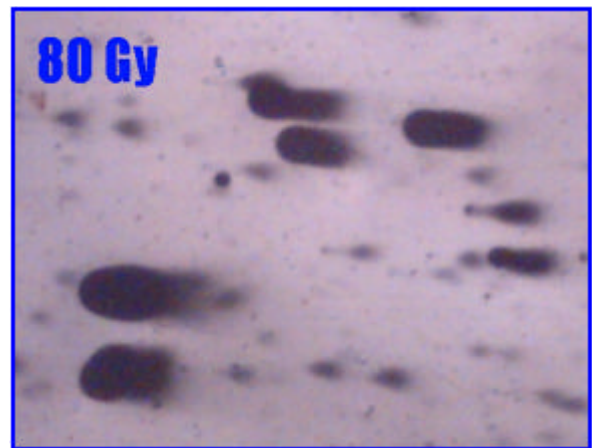


Figura 7. Amostra Irradiada com 80 Gy

Atualmente muitos trabalhos estão sendo realizados baseados na migração dos fragmentos de DNA como detecção do tratamento por radiação em alimentos, decorrentes da necessidade de se ter comprovado o método como indicador do processamento por radiação. Muitos autores tem publicado seus resultados com diferentes tipos de alimentos [7,8,10,11,26,15-27]. Análise de diferente carnes para controlar as importações na Suécia, foram feitas por Merino & Cerda [20]. A recente autorização para a irradiação de carne para hamburger nos Estados Unidos, gerou trabalhos sobre detecção de carne de hamburger irradiada e congelada [18]. Recentes trabalhos com carnes incluem a detecção do processamento por radiação em carnes exóticas no Brasil [21] ou o uso de um protocolo alcalino para o teste do cometa [26]. Para alimentos de origem vegetal, sementes foram analisadas por Koppen & Cerda [22]. Delincée [23] utilizou sementes de “grapefruit” para analisar os fragmentos de DNA em frutas irradiadas. Marin-Huachaca [10] analisa o tratamento por radiação em diferentes tipos de frutas e difere as sementes que receberam o tratamento por radiação das não-irradiadas com o teste do cometa. Villavicencio [8] obteve típicos cometas formados pela radiação em feijões e migração

limitada do DNA em células não irradiadas. Khan *et al.* [24], mostram resultados com análise de especiarias. Romanelli [25] também demonstra que o dano no DNA de alhos irradiados aumenta com o aumento da dose de radiação. O DNA de alimentos não-irradiados mostra-se intacto ou apresenta leve migração do DNA. Já em alimentos irradiados, a migração dos fragmentos de DNA é observada conforme o aumento da dose de radiação. Há uma nítida correlação da extensão da migração dos fragmentos DNA com a dose de radiação.

Nas amostras controle -os alhos que não foram tratados por radiação- pode-se observar que a proporção de migração dos fragmentos de DNA é quase nula. Nas amostras de alho tratadas com hidrazida maleica, podemos observar uma leve migração do DNA, indicando que houve algum dano na molécula de DNA. Esses resultados estão de acordo com a literatura, pois segundo SHIBATA & ZUMAN [26], a hidrazida maleica bloqueia a divisão celular, provavelmente por causar algum dano ao DNA. A dose de hidrazida maleica aplicada nas nossas amostras provavelmente foi muito pequena, permitindo somente uma leve migração do DNA. Porém quando comparamos com nossos controles conhecidos, irradiados com doses baixas, podemos comparar as migrações do DNA.

IV. CONCLUSÃO

Nossas análises sugerem que as amostras recebidas não sofreram o tratamento por radiação mas que poderiam ter sido tratadas com alguma substância química inibidora de brotamento, uma vez que encontramos leves migrações no DNA, porém em maior quantidade do que nas nossas amostras controle. Nos estudos que desenvolvemos paralelamente, aplicando doses conhecidas, num tempo conhecido e amostras obtidas de agricultores do estado de São Paulo, pudemos observar, que com o tratamento por radiação a quantidade de células intactas, diminui sensivelmente com o aumento da dose de radiação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à **CAPES, CNPq** ao **IPEN** e ao **BFE**.

REFERÊNCIAS

[1] CODEX ALIMENTARIUS. **General standard for irradiated foods**. vol. XV. 1983.

[2] Diehl, J.F. **Safety of Irradiated Foods**, (2. Ed.) Marcel Dekker, New York, 1995.

[3] WHO. **High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy**. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group, Geneva. Technical Report Series, 890, 1999.

[4] Molins, R. **Food Irradiation: Principles and Applications**, J. Wiley & Sons, New York, 2001.

[5] Crawford, L.M. **Challenges and Opportunities for Food Irradiation in the 21st Century**. In: *Irradiation for Food Safety and Quality*. Edited by P.Loaharanu and P.Thomas. Technomic, Lancaster (PA), USA, 2001.

[6] ICGFI. **Facts about food irradiation**. Vienna, Austria, 1999.

[7] Villavicencio, A.L.C.H., **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ⁶⁰Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris L.* e *Vigna unguiculata (L) Walp.*** Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos –F.C.F.–USP. – 1998.

[8] 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 . 52: 161-166, 1998.

[9] Villavicencio, A.L.C.H., Mancini-Filho, J., Delincée, H. **Utilization of half-embryo test to identify irradiated beans**. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, . 136:11, 670-673, 1997.

[10] Marin-Huachaca, N.S. **Teste do cometa e teste de germinação na detecção do tratamento de alimentos com a radiação ionizante**. Dissertação de mestrado – IPEN. 2002.

[11] Barros, A. C.; Freund, M. T. L.; Villavicencio, A.L.C.H.; Delincée, H.; Arthur, V. **Identification of irradiated wheat by germination test, DNA comet assay and electron spin resonance**. Radiation Physics and Chemistry. 63: 3-6, . 423-426, 2002.

[12] Käferstein, F. K., Moy, G. G. **Public health aspects of food irradiation**. Journal of Public Health Policy, 14:, n. 2, Summer 1993.

[13] Stewart, E.M. Detection Methods for Irradiated Foods. In: *Food Irradiation: Principles and Applications*. Edited by: R.A. Molins. J.Wiley & Sons, New York, pp. 347-386, 2001.

[14] Delincée, H. **Analytical methods to identify irradiated food –a review**. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 455-458. 2002.

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

[16] Marin-Huachaca, N.S.; Delincée, H. & Villavicencio, A.L.C.H. **Avaliação dos fragmentos de dna e germinação em frutas irradiadas**. CD-Room- ENAN2000.

ABSTRACT

[17] Marin-Huachaca, N.S. & Villavicencio, A.L.C.H. **Identificação de Mamão Irradiado Mediante o Teste do “Comet Assay”**. Livro de Resumos do III Encontro Nacional de Biociências Nucleares . Gramado, RS. 2001.

[18] Delincée, H. **Rapid detection of irradiated frozen hamburgers**. Radiation Physics and Chemistry, 63: 443-446. 2002.

[19] Marin-Huachaca, N.S., Lamy-Freund, M.T., Mancini-Filho, J., Delincée, H., Villavicencio, A.L.C.H. **Detection of irradiated fresh fruits treated by e-beam or gamma rays**. Radiation Physics and Chemistry, 63: 419-422. 2002.

[20] Merino, L., Cerda, H. **Control of imported irradiated frozen meat and poultry using the hydrocarbon method and the DNA comet assay**. European Food Research and Technology 211: 298-300, 2000.

[21] Villavicencio, A.L.C.H., Mancini-Filho, J., Delincée, H. **Application of a rapid screening method to detect irradiated meat in Brazil**. Radiation Physics and Chemistry 57: 295-298, 2000.

[22] Koppen, G., Cerda, H. **Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay**. Lebensm. Wiss. Technol..30: 452-457, 1997.

[23] Delincée, H., **Detection of irradiated food: DNA fragmentation in grapefruits**. Radiation Physics and Chemistry 52:135-139, 1998.

[24] Khan, A.A., Khan, H.M., Delincée, H. **Identification of Irradiated Spices Using the Novel Technique of DNA Comet Assay**. Journal of Food Science 67: 493-496, 2002.

[25] Romanelli, M. F.; Sebastião, K. I.; Leite, Q. R.; Hamasaki, K. & Villavicencio, A.L.C.H. **Análise dos fragmentos de dna formados em alhos tratados por radiação ionizante de 60co**. XII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, 2000.

[26] Miyahara, M., Saito, A., Ito, H., Toyoda, M.. **Identification of low level gamma-irradiation of meats by high sensitivity comet assay**. Radiation Physics and Chemistry 63: 451-454, 2002.

[27] CEN. **European Standard EN 13784. Foodstuffs – DNA Comet Assay for the detection of irradiated foodstuffs – Screening method**. European Committee for Standardization, Brussels, 2001.

[28] Shibata, M.; Zuman, P. **Electroreduction of the hydrazide of maleic acid in aqueous solutions**. Journal of Electroanalytical Chemistry, vol. 420. 79-87.1997.

The increased claim for fresh produce has forced a consensus between nations to pay more attention to the phytosanitary regulations. Inhibition of sprouting of bulbs and tubers by applying ionising radiation is authorised by the National Food Codes in Brazil. The availability of methods for detection of irradiated food will contribute to increase consumers' confidence. A quick and simple screening test to indicate whether a food product has been irradiated or not was utilised in this study. The DNA comet assay was applied to verify whether garlic imported from China had been irradiated or not. This test has already been adopted as a European Standard (EN 13784), for detection of irradiated food. Non-irradiated control samples of garlic and garlic treated with maleic hydrazide were compared with garlic samples irradiated in our department. The unirradiated samples exhibited only limited DNA migration. If samples were irradiated, an increased DNA fragmentation was observed which permitted the discrimination between non-irradiated and irradiated samples. Since the garlic samples from China showed only very limited DNA fragmentation, they were deemed non-irradiated. Thus, this simple screening test was shown to be successful for identification of an irradiation treatment.