



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**TESTE DO COMETA E TESTE DE GERMINAÇÃO NA
DETECÇÃO DO TRATAMENTO DE ALIMENTOS COM A
RADIAÇÃO IONIZANTE**

NÉLIDA SIMONA MARÍN HUACHACA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Anna Lúcia C.H. Villavicencio

**São Paulo
2002**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**TESTE DO COMETA E TESTE DE GERMINAÇÃO
NA DETECÇÃO DO TRATAMENTO DE
ALIMENTOS COM A RADIAÇÃO IONIZANTE**

Nélida Simona Marín Huachaca



**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Dra. Anna Lúcia C.H. Villavicencio

São Paulo

2002

*Ao meu pai Crisóstomo
(In memoriam)*

*A minha mãe Eduviges pelo seu
apoio incondicional*

*Aos meus irmãos e irmãs:
Alfredo, Freddy, Miguel, Rocio,
Henry, Edith e Paul*

AGRADECIMENTOS

- *Agradeço a minha orientadora Dra. Anna Lúcia pela amizade, confiança, conselhos e pelos conhecimentos adquiridos na realização deste trabalho*
- *Ao CAPES pela concessão da bolsa de mestrado*
- *Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por ter me brindado a oportunidade de me realizar profissionalmente*
- *Aos engenheiros Carlos Gaia e Elizabeth Somessari pela sua valiosa atenção nas irradiações das amostras*
- *Ao pessoal da Secretaria do CTR, da CPG e da biblioteca pela sua atenção no serviço*
- *Ao pessoal do Laboratório de Detecção de Alimentos Irrradiados pela sua ajuda e amizade*
- *Ao Dr. Valter Arthur e ao Dr. Jose Tadeo Faria pelas importantes sugestões para a melhora deste trabalho*
- *Ao Msc. Nelson Omi pela sua valiosa ajuda nas correções ortográficas e pela amizade*
- *Ao Dr. Odon Sánchez pelo incentivo, apoio e paciência*
- *Ao Dr. Arturo Zavala pela assistência nas análises estatísticas*

TESTE DO COMETA E TESTE DE GERMINAÇÃO NA DETECÇÃO DO TRATAMENTO DE ALIMENTOS COM A RADIAÇÃO IONIZANTE

Nélida Simona Marín Huachaca

RESUMO

Dois métodos de detecção de alimentos irradiados, um bioquímico, o teste do cometa e, um outro biológico, o teste de germinação, foram aplicados em amostras de coxão mole bovino e de frutos. O teste do cometa detecta o dano radioinduzido no DNA. O teste de germinação avalia a radiosensibilidade de sementes quanto à capacidade de germinação e crescimento de caules e raízes. As amostras foram irradiadas em fonte gama e em acelerador de elétrons. As doses foram 0,0; 2,5; 4,5 e 7,0 kGy para as amostras de coxão mole bovino estocadas sob refrigeração e, 0,0; 2,5; 4,5; 7,0 e 8,5 kGy para as estocadas sob congelamento. Em frutos tais como melão, melancia, maçã, laranja, mamão e tomate, as doses foram: 0,0; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 kGy. As diferenças entre os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre a distância de migração dos fragmentos de DNA e, sobre o crescimento de caules e raízes, resultaram ser similares. O teste do cometa, versão neutra, permitiu discriminar as amostras controle de coxão mole bovino das irradiadas até um mês de estocagem. Nas amostras de frutos também foi possível distinguir, mediante o teste do cometa, entre amostras irradiadas e não irradiadas a partir da dose de 0,5 kGy. No teste de germinação, o comprimento da raiz foi melhor parâmetro para discriminar amostras irradiadas e não irradiadas de melão, melancia e tomate, enquanto que, a porcentagem de germinação foi melhor parâmetro em maçã e laranja.

THE DNA COMET ASSAY AND THE GERMINATION TEST IN A DETECTION OF FOOD TREATED BY IONIZING RADIATION

Nélida Simona Marín Huachaca

ABSTRACT

Two methods of irradiated food detection, one biochemical, the comet assay and, other biological, the germination test, were applied in bovine meat and fruit samples. The comet assay detects the damage on DNA caused by ionizing radiation. The germination test evaluates the sensitivity to radiation of seeds as for germination ability, shooting and, rooting. The samples were irradiated in gamma font and electron accelerator. For bovine meat samples, the doses were 0.0; 2.5; 4.5 e 7.0 kGy at chilled condition and, 0.0; 2.5; 4.5; 7.0 e 8.5 kGy at frozen conditions. For fruit samples such as melon, watermelon, apple, orange, papaya and, tomato, the doses were: 0.0; 0.5; 0.75; 1.0; 2.0 e 4.0 kGy. The differences between the gamma rays and the electron beam effects on extent of DNA migration and, on shooting and rooting, showed to be similar. The comet assay, under neutral conditions, permitted to discriminate between irradiated and unirradiated bovine meat samples, until one month of storage. Also, it was possible to distinguish, by the comet assay, the control sample with regard to irradiated fruit, at doses as low as 0,5 kGy. In the germination test, the root length was the best parameter to discriminate irradiated and unirradiated samples of melon, watermelon and tomato, while the germination percent was the best parameter for apple and orange.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	:	Acido desoxirribonucléico
D ₁₀	:	Dose de radiação requerida para reduzir a população de microorganismos por um fator 10
EDTA	:	Etilenodiaminotetracético
FAO	:	Food and Agricultural Organisation of the United Nations
kGy	:	kilogray
MeV	:	Mega elétron-voltios
OMS	:	Organização Mundial da Saúde
PBS	:	Buffer fosfato salino
pH	:	Potencial de hidrogênio
SDS	:	Sulfato dodecil de sódio
TBE	:	Buffer Tris-borato-EDTA
TCA	:	Acido tricarboxílico

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 5.1. Fotomicrografias de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino	36
FIGURA 5.2. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 1 dia após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	38
FIGURA 5.3. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 4 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	39
FIGURA 5.4. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 7 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	40
FIGURA 5.5. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 15 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	42
FIGURA 5.6. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 30 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	43
FIGURA 5.7. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, conforme o tempo de estocagem (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	45
FIGURA 5.8. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino congelado irradiadas com raios gama	47
FIGURA 5.9. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino congelado irradiadas com feixe de elétrons	48
FIGURA 5.10. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 1 dia após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	50
FIGURA 5.11. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 4 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	51
FIGURA 5.12. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 7 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	52
FIGURA 5.13. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 15 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	53

FIGURA 5.14. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, conforme o tempo de estocagem (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	55
FIGURA 5.15. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino resfriado irradiadas com raios gama	57
FIGURA 5.16. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino congelado irradiadas com feixe de elétrons	58
FIGURA 5.17. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de embriões de melão (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	63
FIGURA 5.18. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de embriões de melão (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	64
FIGURA 5.19. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de embriões de melancia (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	67
FIGURA 5.20. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de embriões de melancia (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	67
FIGURA 5.21. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de embriões de maçã (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	70
FIGURA 5.22. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de embriões de maçã (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	70
FIGURA 5.23. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de caroços de tomate (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	75
FIGURA 5.24. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de caroços de tomate (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	75
FIGURA 5.25. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melão (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	79
FIGURA 5.26. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melancia (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	81
FIGURA 5.27. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de maçã (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	83
FIGURA 5.28. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de mamão (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	85
FIGURA 5.29. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de tomate (a) radiação gama (b) feixe de elétrons	87

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1.1. Exportações brasileiras de frutas	3
TABELA 1.2. Exportações brasileiras de carnes	4
TABELA 3.1. Faixas de doses de radiação ionizante utilizadas para diferentes propósitos	15
TABELA 3.2. Métodos padrões europeus de detecção de alimentos irradiados (incluindo métodos propostos)	17
TABELA 3.3. Métodos físicos de detecção de alimentos irradiados	20
TABELA 3.4. 2-alcilciclobutanonas produzidos a partir de ácidos graxos	22
TABELA 3.5. Métodos químicos de detecção de alimentos irradiados	23
TABELA 3.6. Métodos biológicos de detecção de alimentos irradiados	25
TABELA 5.1. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 1 dia após irradiação	37
TABELA 5.2. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 4 dias após irradiação	39
TABELA 5.3. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 7 dias após irradiação	40
TABELA 5.4. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 15 dias após irradiação	41
TABELA 5.5. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 30 dias após irradiação	43
TABELA 5.6. Distância total de migração do DNA por tempo de estocagem sob congelamento em amostras irradiadas de coxão mole bovino	44
TABELA 5.7. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 1 dia após irradiação	49
TABELA 5.8. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 4 dias após irradiação	50
TABELA 5.9. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 7 dias após irradiação	52

TABELA 5.10. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 15 dias após irradiação	53
TABELA 5.11. Distância total de migração do DNA por tempo de estocagem sob refrigeração em amostras irradiadas de coxão mole bovino	54
TABELA 5.12. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões irradiados de melão	62
TABELA 5.13. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões irradiados de melancia	66
TABELA 5.14. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões irradiados de maçã	69
TABELA 5.15. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões de laranja irradiados com radiação gama	72
TABELA 5.16. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de caroços irradiados de tomate	74
TABELA 5.17. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melão	78
TABELA 5.18. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de melão	79
TABELA 5.19. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melancia	80
TABELA 5.20. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de melancia	81
TABELA 5.21. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de maçã	82
TABELA 5.22. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de maçã	83
TABELA 5.23. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de mamão	84
TABELA 5.24. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de mamão	85
TABELA 5.25. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de tomate	86
TABELA 5.26. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de tomate	87

LISTA DE FOTOS

	Pág.
FOTO 5.1. Embriões de melão, 4 dias após incubação a 30°C, irradiados com raios gama	61
FOTO 5.2. Embriões de melancia, 4 dias após incubação a 32°C, irradiados com raios gama	65
FOTO 5.3. Embriões de maçã, 7 dias após incubação a 30°C, irradiados com raios gama	68
FOTO 5.4. Embriões de laranja, 7 dias após incubação a 35°C, irradiados com raios gama	71
FOTO 5.5. Caroços de tomate, 7 dias após incubação a 32°C, irradiados com raios gama	73

INDICE

	Pág.
Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de siglas e abreviaturas	v
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	viii
Listas de fotos	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
3.1 Mecanismo de ação da radiação	6
3.1.1 Radiólise dos principais constituintes dos alimentos	7
3.1.1.1 Proteínas	7
3.1.1.2 Lipídeos	8
3.1.1.3 Carboidratos	8
3.1.1.4 Vitaminas	8
3.1.2 Radiólise do DNA	9
3.2 Fontes de radiação	10
3.3 Efeitos da radiação nos organismos que infestam os alimentos	11
3.4 Aplicações	13
3.5 Detecção de alimentos irradiados	16
3.5.1 Métodos físicos	18
3.5.2 Métodos químicos	21
3.5.3 Métodos biológicos	24

3.6	Teste do cometa ou eletroforese em microgel.....	26
3.7	Teste de germinação	28
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Amostras	29
4.2	Irradiações	29
4.3	Métodos	30
4.3.1	Teste do cometa	30
4.3.1.1	Procedimento	30
4.3.1.2	Preparo de soluções e reagentes	33
4.3.2	Teste de germinação	35
4.3.3	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Teste do cometa em coxão mole bovino	36
5.1.1	Coxão mole bovino congelado	37
5.1.2	Coxão mole bovino resfriado	49
5.2	Teste de germinação	61
5.2.1	Melão	61
5.2.2	Melancia	64
5.2.3	Maçã	68
5.2.4	Laranja	71
5.2.5	Tomate	73
5.3	Teste do cometa em frutos	78
5.3.1	Melão	78
5.3.2	Melancia	80
5.3.3	Maçã	82
5.3.4	Mamão	84
5.3.5	Tomate	86
6.	CONCLUSÕES	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

A idéia de usar a radiação ionizante surgiu imediatamente depois do descobrimento da radioatividade por Henri Becquerel em 1895. No mesmo ano em que Becquerel publicou o seu trabalho, a sugestão de usar a radiação ionizante para destruir microorganismos em alimentos foi publicada em uma revista médica alemã. Poucos anos depois, nos Estados Unidos e na Grã Bretanha, foram emitidas as patentes que descreviam o uso da radiação ionizante na destruição de microorganismos em alimentos. Na época, esta tecnologia não foi considerada comercialmente viável porque as fontes de radiação a serem usadas não eram facilmente disponíveis (Satin, 1993).

A irradiação de alimentos foi adotada nos Estados Unidos logo após a Segunda Guerra Mundial. Em 1963, os Estados Unidos tiveram a sua primeira regulamentação quando o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o seu uso para controlar insetos em trigo e farinha de trigo (www.foodsafety.ufl.edu/consumer).

Em 1980, o Comitê de Especialistas sobre Irradiação de Alimentos da FAO/IAEA/OMS concluiu que “...a irradiação de qualquer item de alimento com dose média de até 10 kGy não apresenta dano toxicológico e não introduz nenhum problema especial nutricional ou microbiológico” (WHO, 1981). Conforme esta conclusão e a evidência científica, a Comissão do *Codex Alimentarius* da FAO/OMS adotou, em 1983, o *Codex General Standard* para Alimentos Irradiados, limitando a dose média a 10 kGy (FAO, 1984).

Um grupo de especialistas *ad hoc*, convidados pela Organização Mundial da Saúde, concluiu que o alimento irradiado, produzido conforme as Boas Práticas de Fabricação estabelecidas, pode ser considerado seguro e nutricionalmente adequado (WHO, 1994).

Em 1997, o Grupo de Estudo sobre Irradiação em Altas Doses da FAO/IAEA/OMS, examinou os resultados de pesquisas feitas em alimentos irradiados com doses acima de 10 kGy. Reconhecendo que, na prática, as doses aplicadas para eliminar agentes biológicos seriam menores àquelas que iriam comprometer a qualidade sensorial, o grupo de estudo concluiu que nenhum limite superior precisa ser imposto (WHO, 1999).

Os primeiros estudos sobre irradiação de alimentos no Brasil foram publicados no ano 1968. A seção de entomologia do CENA (Centro de Energia Nuclear para a Agricultura) da Universidade de São Paulo tem desenvolvido ampla pesquisa sobre irradiação de alimentos e insetos, sendo Frederico W. Wiendl, o pioneiro nesse campo. Desde 1991, as pesquisas sobre irradiação de alimentos também estão sendo feitas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) (Del Mastro, 1999).

No Brasil, a irradiação de alimentos é permitida mediante o decreto Nº 72718 de 29 de agosto de 1973 (Brasil, 1973). Conforme a Resolução-RDC Nº 21 de 26/01/2001, qualquer alimento pode ser tratado com a radiação ionizante considerando que a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e, a dose máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento (Brasil, 2001).

O Brasil é um grande país produtor de alimentos e apresenta um apreciável comércio internacional de alimentos, entre eles frutos e carnes. A irradiação de alimentos é uma alternativa que pode afiançar o comércio internacional. As tabelas 1.1 e 1.2 mostram os níveis de exportações de frutas e de carnes respectivamente. Como exemplo, a maçã é exportada principalmente ao Reino Unido, Alemanha, Bélgica, Espanha e Países Baixos; o suco de laranja aos Estados Unidos, Japão, República da Coreia, Bélgica, Luxemburgo e Países Baixos; e o tomate à Argentina e Uruguai. Exportações de carne bovina *in natura* são feitas principalmente a Chile, Países Baixos, Israel, Itália, Reino Unido, Alemanha, Egito e outros muitos países (www.mdic.gov.br).

TABELA 1.1. Exportações brasileiras de frutas

Produtos	1998	1999	2000	2001
Castanha de caju, sem casca	31 882	24 101	33 588	29 356
Goiabas, mangas e mangostões	39 186	53 765	67 169	94 291
Maças frescas	10 706	57 438	64 480	35 786
Melões frescos	65 005	65 453	60 904	99 434
Mamões frescos	9 878	15 709	21 510	22 804
Melancias frescas	8 809	13 146	13 605	13 698
Laranjas frescas ou secas	65 614	103 086	75 345	139 582
Uvas frescas	4 405	8 083	14 344	20 660
Castanha-do-pará, sem casca	3 075	1 119	5 362	7 903
Castanha-do-pará com casca	12 053	4 987	13 566	2 649
Bananas, frescas ou secas	68 555	81 227	71 812	105 112
Tangerinas, mandarinas	5 308	7 518	12 032	17 258
Limões e limas, frescos ou secos	2 301	5 336	8 607	14 811
Abacaxis frescos ou secos	13 003	15 814	16 023	14 457
SUBTOTAL (t)	339 780	456 782	478 347	617 801
Outras frutas	9 336	9 276	8 096	13 016
Total (t)	349 116	466 058	486 443	630 817

Fonte: SECEX/MDIC

TABELA 1.2. Exportações brasileiras de carnes

Carnes	1999	2000	2001
Boi "in natura"	150 740	188 656	368 288
Boi industrializado	140 838	125 698	132 639
Frango "in natura"	770 582	906 746	1 249 288
Frango industrializado	5 807	9 348	16 599
Peru "in natura"	25 387	42 489	67 953
Suíno "in natura"	75 408	116 005	247 371
Demais carnes	45 783	54 617	69 495
Total geral (t)	1 214 545	1 443 559	2 151 633

Fonte: SECEX/MDCI

Em dezembro de 1988, na Conferência Internacional sobre "Aceitação, Controle e Comércio de Alimentos Irrradiados", realizada em Genebra, delegados de cerca de 60 países estiveram reunidos juntamente com representantes da FAO, Organização Mundial da Saúde e ITC-UNCTAD/GATT e chegaram à conclusão da necessidade de métodos e procedimentos padrões que poderiam detectar se o alimento foi processado ou não com a radiação ionizante (Anon, 1989).

Vários métodos de detecção de alimentos irradiados têm sido discutidos na literatura (Delincée, 1998b, 2001b; Raffi, 1998; Haire *et al.*, 1997; McMurray *et al.*, 1996). Muitos destes métodos estão em um estado avançado de desenvolvimento e novas técnicas estão ainda surgindo. Embora vários métodos de detecção terem sido propostos em vários laboratórios, não têm sido validados em estudos interlaboratoriais. Além disso, estão sendo implementadas melhoras nos métodos com a finalidade de simplificar o procedimento e/ou acentuar a sensibilidade da detecção (Delincée, 2001b).

2. OBJETIVOS

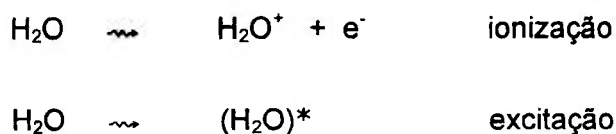
O presente trabalho teve como objetivo:

Avaliar a sensibilidade do teste do cometa e do teste de germinação como métodos para a detecção de amostras de carne e frutos tratados com radiação gama e com feixe de elétrons.

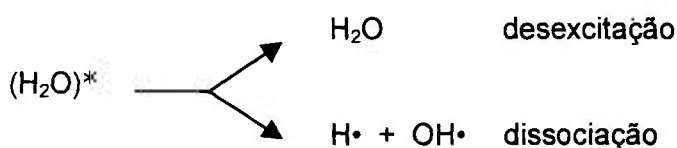
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA RADIAÇÃO

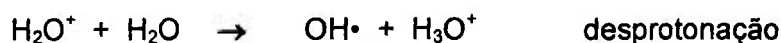
Devido ao fato de a água ser o constituinte mais abundante nos sistemas biológicos é importante considerar a radiólise da água. Quando a água é irradiada a ionização produz um elétron energético e um cátion radical, entretanto, excitação produz moléculas excitadas de água, como descritas a seguir (Woods & Pikaev, 1994):



As moléculas excitadas e seus produtos de dissociação não contribuem significativamente para a química da radiação da água líquida, os mecanismos apresentam estados excitados que retornam ao seu estado basal sem dissociação.



Na ionização ocorre a formação de radicais primários ($\text{OH}\cdot$, e_{aq}^- , $\text{H}\cdot$, H_2 , H_2O_2). Os radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e elétron aquoso (e_{aq}^-) são as espécies principais, sendo que os radicais hidroxila são poderosos agentes oxidantes enquanto que os elétrons aquosos são poderosos agentes redutores. Estes radicais são formados mediante as seguintes reações (Taub, 1983):





solvatação

A reatividade destes radicais livres primários é bastante alta, por esta razão é que freqüentemente reagem com outras espécies do mesmo tipo ou de tipo diferente. Quando os radicais livres primários reagem com constituintes do alimento podem se formar novos radicais livres e, uma vez que todos estes radicais tenham reagido, os produtos finais estáveis, denominados produtos radiolíticos, irão estar presentes (Taub, 1983; Olson, 1995).

A formação de produtos devido à ação radiolítica sobre um material corresponde a efeitos diretos e a formação de produtos mediante a reação dos radicais livres primários com o material são considerados como efeitos indiretos (Taub, 1983; Butler, 1984).

3.1.1 RADIÓLISE DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DOS ALIMENTOS

3.1.1.1 Proteínas

O dano causado pela radiação ionizante inclui: deaminação, descarboxilação, diminuição de ligações dissulfeto, oxidação de grupos sulfidrilos, quebra das ligações peptídicas e mudanças nos estados de valência dos íons metálicos das enzimas. Os principais produtos formados pela interação da radiação com o material protéico são: grupos carbonila, amônia, aminoácidos livres, peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos entre outros. Em altas doses pode haver ligações cruzadas. Todas estas mudanças químicas são afetadas pela estrutura e estado das proteínas e também pelas condições de irradiação. Na presença de oxigênio há pouca ou nenhuma agregação, mas sim fragmentação da cadeia polipeptídica (Giroux & Lacroix, 1998).

3.1.1.2 Lipídeos

O sítio mais susceptível ao ataque dos radicais livres numa molécula de lipídeo é a dupla ligação. Os radicais livres podem reagir com o oxigênio causando a formação de hidroperóxidos os que irão produzir uma grande variedade de compostos como álcoois, aldeídos, ésteres de aldeído, hidrocarbonetos, hidroxiácidos, cetoácidos, cetonas, lactonas, oxoácidos e compostos diméricos. Cabe salientar que a rota de formação dos produtos intermediários a partir da autooxidação radioinduzida dos lipídios é igual àquela da autooxidação natural. Na ausência de oxigênio as mudanças nos lipídeos consistem em: descarboxilação, desidratação e polimerização, sendo produzidos: CO₂, CO, H₂, hidrocarbonetos e aldeídos. O mecanismo geral da radiólise não oxidativa dos triglicérides compreende a quebra da ligação entre os ácidos graxos e os gliceróis dando origem aos radicais livres (Giroux & Lacroix, 1998).

3.1.1.3 Carboidratos

Os principais efeitos da radiação ionizante sobre os carboidratos presentes no alimento são basicamente iguais àqueles causados por aquecimento ou outros tratamentos. Estes incluem quebras das cadeias dos polissacarídeos, degradação do amido e celulose em açúcares simples e, a formação de ácidos de açúcar, cetonas e outros açúcares a partir dos monossacarídeos (Murano, P., 1995).

3.1.1.4 Vitaminas

Os tipos de possíveis reações dos radicais livres estão determinados pelo meio no qual as vitaminas estarão presentes. As vitaminas lipossolúveis iriam estar expostas aos radicais produzidos pela ação direta da radiação sobre os lipídeos, e as vitaminas hidrossolúveis aos radicais livres formados pela radiólise da água. No caso das

vitaminas lipossolúveis as reações mediadas pelos radicais livres são insignificantes pois estes irão se recombinar principalmente com os íons positivos dos lipídeos. Algumas vitaminas hidrossolúveis podem reagir com o e_{aq}^- diretamente ou adquirir um elétron dos outros radicais produzidos em meio aquoso. Pelo fato de as vitaminas estarem em muito pouca quantidade na maioria dos alimentos, os radicais OH^\bullet irão reagir principalmente com os outros constituintes - proteínas, lipídeos e carboidratos - antes de reagirem com as vitaminas (Giroux & Lacroix, 1998).

3.1.2 Radiólise do DNA

O dano nas bases tem sido estudado extensivamente e muitos produtos intermediários de vida curta têm sido caracterizados especialmente para a timina. O radical OH^\bullet pode atacar a dupla ligação da timina no C-5 ou C-6, e menos freqüentemente, pode abstrair hidrogênio do grupo metila. O radical 6-hidroxitimina formado pode reagir com o oxigênio para produzir glicol timina. A ação direta da radiação ionizante pode conduzir à ejeção de um elétron na posição C-5 ou C-6 e o radical resultante iria reagir com o íon hidroxila. Assim, os efeitos da radiação direta ou indireta podem resultar em radicais intermediários reativos idênticos. Similarmente, a 8-hidroxi guanina resulta da adição do radical OH^\bullet no C-8 da guanina (Friedberg, 1995).

A radiólise dos ácidos nucléicos é de interesse devido a sua importância na destruição microbiana. A radiação ionizante induz quebras das cadeias do DNA diretamente e a maior parte dos efeitos letais da radiação ionizante pode se atribuir a estas lesões, em particular às quebras duplas. Como consequência das quebras, a célula microbiana perde a habilidade de se replicar e, de transportar e metabolizar nutrientes (Murano, E., 1995).

3.2 FONTES DE RADIAÇÃO

Conforme as recomendações da Comissão do *Codex Alimentarius*, são disponíveis três tipos de fontes de radiação para o processamento de alimentos (FAO, 1984):

- ❖ Fontes de radioisótopos: ^{60}Co (energia máxima 1,33 MeV) e ^{137}Cs (energia máxima 0,66 MeV), este último não disponível em quantidades comerciais.
- ❖ Aceleradores de elétrons com energia máxima de 10 MeV
- ❖ Máquinas de raios X com energia máxima de 5 MeV

Vantagens da fonte de ^{60}Co são (WHO, 1994):

- Alta penetração e dose uniforme, permitindo o tratamento de produtos de tamanho, forma e densidades variáveis.
- Uso comprovado por longa data em aplicações similares
- Fácil disponibilidade de várias fontes deste material
- Baixo risco ambiental

As desvantagens incluem:

- Meia-vida de 5,263 anos, o que significa 12% da fonte deve ser substituída anualmente para manter a potência original
- Baixa taxa de dose.

A principal vantagem dos aceleradores de elétrons e dos geradores de raios X, em relação às fontes de radiação gama, é que podem ser desligados quando não estiverem em uso. Outras vantagens são:

- A fonte não precisa ser recarregada
- São facilmente disponíveis
- Apresentam história conhecida de uso
- Alta taxa de dose.

Entre as desvantagens são:

- A complexidade da máquina e a conseqüente necessidade de manutenção periódica
- Grandes requerimentos de potência e resfriamento.

Estas fontes de radiação não induzem radioatividade mensurável no alimento (Wakeford *et al.*, 1991; Findlay *et al.*, 1993; Woods & Pikaev, 1994; ICGFI, 1995) porque a energia limiar para a reação (γ, n) está bem acima de 10 MeV para todos os isótopos presentes no alimento. Assim sendo, os limiares nos principais isótopos de carbono, oxigênio e nitrogênio são: 18,72 MeV (^{12}C), 15,67 MeV (^{16}O) e 10,55 MeV (^{14}N) respectivamente. No entanto, uns poucos isótopos têm baixos limiares: 2,225; 4,85 e 4,15 MeV em deutério (^2H), ^{13}C e ^{17}O respectivamente, porém, a concentração destes isótopos é extremamente baixa. Além disso, os isótopos ^1H , ^{12}C e ^{16}O , os que são produzidos quando o nêutron é ejetado, são estáveis. Muitos dos elementos traços e contaminantes no alimento têm limiares menores que 10 MeV. Os nêutrons emitidos nestes processos usualmente têm energia de uns poucos MeV, mas estes gradualmente desaceleram mediante colisões com os átomos do alimento, isto é, são "termalizados". Alguns dos nêutrons podem escapar do alimento e serem absorvidos pela trilha de transporte e pelas paredes da câmara de irradiação, entretanto, alguns podem ser absorvidos no alimento (ICGFI, 1995).

3.3 EFEITOS DA RADIAÇÃO NOS ORGANISMOS QUE INFESTAM OS ALIMENTOS

Os efeitos de uma determinada dose de radiação sobre os organismos depende de vários fatores tais como: tipo de organismo, número de organismos, composição do alimento, presença ou ausência de oxigênio, estado físico do alimento, estágio ou fase do organismo (Jay, 2000).

As bactérias apresentam uma tendência de serem mais resistentes à radiação na fase *lag* justo antes de ativar a divisão celular. As células tornam-se mais sensíveis à radiação durante a fase logarítmica e atingem o seu mínimo no final desta fase. Em geral, as bactérias gram-positivas são mais resistentes do que as gram-negativas (Jay, 2000).

Yersinia, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Aeromonas spp.* e as células vegetativas de *Bacillus cereus* são as bactérias vegetativas mais sensíveis à radiação ionizante com valores de D_{10} entre 0,04 e 0,20 kGy em alimentos não congelados. *Escherichia coli* (incluindo a *E. coli* 0157:H7) e *Arcobacter butzleri* são também sensíveis à radiação com valores de D_{10} na faixa de 0,24 a 0,40 kGy em produtos não congelados. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* são relativamente mais resistentes à radiação quando comparados com outras bactérias patogênicas não formadoras de esporos, com valores de D_{10} entre 0,4 e 0,8 kGy em alimentos não congelados, algo similar às das células vegetativas de *Clostridium perfringens*. As espécies relativamente resistentes à radiação são *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* e *Moxarella phenylpyruvica* com valores de D_{10} na faixa de 0,65 a 0,86 kGy (Farkas, 1998).

Em geral, as bactérias formadoras de esporos são mais resistentes do que as não formadoras de esporos. Os esporos de *Clostridium botulinum* tipo A parecem ser os mais resistentes do que todos os esporos clostridiais (Jay, 2000).

Quanto a radiosensibilidade de fungos e leveduras, tem sido reportado que este último é mais resistente do que o primeiro, sendo, em geral, ambos os grupos menos sensíveis do que as bactérias gram-positivas (Jay, 2000). Com relação às resistências à radiação de conidiosporos de *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, estas são similares àquelas de bactérias vegetativas menos tolerantes à radiação, porém, os valores de

D_{10} de *Curvalaria geniculata* e *Alternaria alternata* são pelo menos três vezes maiores (Blank & Corrigan, 1995).

Os vírus são mais resistentes à radiação do que as bactérias. Os vírus entéricos, os que podem ser encontrados em frutos de mar de águas poluídas, incluem: poliovírus, Coxsackie vírus, echovírus, vírus da hepatite A e vírus Norwalk (Jay, 2000; Monk *et al.*, 1995). Os valores de D_{10} , na faixa de 3,9 e 5,3 kGy, para 30 vírus, foram determinados por Sullivan *et al.* (1971) em um meio mínimo essencial de *Eagle* suplementado com soro 2%.

Os efeitos da radiação sobre protozoários e helmintos estão associados à perda de infectividade, perda de patogenicidade, interrupção ou prevenção do ciclo de vida, e morte do parasita (Farkas, 1998).

A ação da radiação ionizante sobre os insetos ocorre mediante distúrbios fisiológicos tal como a respiração e, mediante distúrbios biológicos tais como a alteração da atividade enzimática e a replicação do DNA. A sensibilidade à radiação ionizante varia nos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (Murano, E., 1995; Diehl, 1995).

3.4 APLICAÇÕES

O processamento dos alimentos com a radiação ionizante está relacionado com a sua conservação. A radiação pode ser aplicada depois de embalado o produto, como um tratamento terminal, eliminando a possibilidade de recontaminação ou reinfestação. A radiação pode inativar organismos em alimentos em estado congelado sem necessidade de descongelamento (Farkas, 1998). Dependendo do tipo de

alimento e da dose de radiação, a energia ionizante pode ter uma variedade de funções úteis como mostra a Tabela 3.1 (Delincée, 1997).

O propósito de irradiar vegetais é, freqüentemente, produzir uma forte interferência com as funções metabólicas normais da planta. Batatas, cebolas e alhos são irradiados para evitar o brotamento. Os frutos podem ser irradiados com a intenção de retardar o processo do amadurecimento. O efeito imediato do fenômeno biológico observado após irradiação, tal como a inibição do crescimento e brotamento, é provavelmente o resultado do dano radioinduzido no DNA, o que causa mudanças na atividade de certos hormônios vegetais e de enzimas. A síntese dos hormônios giberelina e ácido indolacético, os que estimulam o crescimento das plantas, é inibida pela radiação (Diehl, 1995).

Pelo fato de as especiarias, ervas e condimentos vegetais serem freqüentemente contaminados com microorganismos, a maioria destes produtos é fumegada usualmente com gases esterilizantes tal como o óxido de etileno, que tem seu uso proibido pela União Européia em 1991 por ser carcinogênico (ICGFI, 1999). Do mesmo modo, os frutos são freqüentemente tratados com dióxido de sulfeto, entre outros agentes químicos, para estender a vida de prateleira e para retardar a maturação, no entanto, a irradiação tem emergido como uma alternativa viável (Murano, E., 1995).

Tem sido demonstrado que a irradiação é um método efetivo, aplicável, no controle de pragas e, uma boa alternativa ao uso de brometo de metila, fumegante mais amplamente usado no controle de insetos. Além disso, o brometo de metila tem sido identificado como um agente químico potente que destrói a camada de ozônio (ICGFI, 1994; 1999).

TABELA 3.1. Faixas de doses de radiação ionizante utilizadas para diferentes propósitos

PROPÓSITO	DOSE (kGy)	PRODUTOS
Doses baixas (até 1 kGy)		
(a) Inibição de brotamento Permite maior tempo de estocagem, sem o uso de inibidores químicos de brotamento	0,05 – 0,15	Batatas, cebolas, alho, gengibre, inhame
(b) Desinfestação de insetos Preventivo contra a perda de alimentos sem o uso de fumegantes químicos, preventivo contra a propagação de pragas no comércio de alimentos; como tratamento de quarentena sem o uso de fumegantes químicos. Desinfestação de parasitas Reduz doenças causadas pelo consumo de produtos crus ou mal cozidos, infectados, como por exemplo com triquina, <i>Taenia</i> sp, <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>	0,15 – 0,75	Cereais, legumes, frutas frescas e secas, carne seca, peixe, carne fresca de porco
(c) Retardo do processo fisiológico: Ex. Maturação, permitindo maior tempo de prateleira.	0,25 – 1	Frutas e vegetais frescos
Doses médias (1-10 kGy)		
(a) Aumento da vida de prateleira Redução de microorganismos que causam deterioração	1 – 3	Peixe fresco, morango, etc.
(b) Eliminação de microorganismos patogênicos e outros patógenos não formadores de esporos.	1 – 5	Frutos do mar frescos e congelados, carnes de ave e carnes vermelhas cruas ou congeladas, produtos de ovo, etc.
(c) Eliminação de microorganismos patogênicos e de aqueles que causam deterioração	3 – 10	Ervas e especiarias, condimentos, vegetais desidratados, gomas.
(d) Melhora das propriedades tecnológicas	2 – 7	Uvas (aumento do rendimento do suco), frutas desidratadas (melhorando a reidratação), vegetais desidratados (reduzindo o tempo de cocção).
Doses altas (10 – 100 kGy)		
(a) Esterilização industrial (em combinação com calor moderado) Destroi ambos, esporos e microorganismos patogênicos, incluindo formadores de esporos tal como <i>Clostridium botulinum</i> , permitindo um período maior de estocagem em temperatura ambiente.	30 – 100	Carnes vermelhas, carne de aves, frutos de mar, alimentos prontos, dietas hospitalares.
(b) Descontaminação de certos aditivos e ingredientes alimentícios Permite maior tempo de prateleira e a prevenção de alimentos contaminados com a substituição de fumegantes químicos.	10 – 50	Ervas e especiarias, condimentos, preparados de enzimas, gomas naturais.

Fonte: Delincée, 1997

Os países que conformam o Protocolo de Montreal concordaram diminuir o uso de brometo de metila nos países desenvolvidos da seguinte maneira: 25% em 2001; 50% em 2005 e 100% em 2010 tomando como referência os níveis de uso do ano 1991. Para os países em desenvolvimento ainda não foi estabelecida a diminuição do uso de brometo de metila (Marcotte, 1998).

Os alimentos radioesterilizados têm sido dados a pacientes com deficiências no sistema imunológico e têm sido consumidos por astronautas. A Organização Mundial da Saúde já recomenda a irradiação de alimentos em altas doses, tais como especiarias e outros ingredientes secos do alimento, alimentos pré-cozidos pré-empacotados que podem ser estocados a temperatura ambiente por períodos extensos. Os componentes de todas as classes de alimentos, cujas qualidades sensoriais não sejam comprometidas, podem ser irradiados em altas doses (WHO, 1999; ICGFI, 1999).

3.5 DETECÇÃO DE ALIMENTOS IRRADIADOS

As principais razões para o desenvolvimento de métodos de detecção de alimentos irradiados são as seguintes (Delincée, 1993):

- 1.- Facilitar o comércio internacional.
- 2.- Verificar a submissão às regulamentações existentes, como por exemplo obrigatoriedade de rotulagem, controle da proibição.
- 3.- Acentuar a confiança do consumidor na correta aplicação do processamento por irradiação e o seu controle apropriado pelas autoridades de inspeção.
- 4.- Proteger a liberdade de escolha dos consumidores entre alimentos irradiados e não irradiados.

No final de 1996, cinco métodos padrões de detecção de alimentos irradiados foram adotados pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN). Estes métodos estão apresentados na tabela 3.2 (CEN, 1996a, 1996b, 1996c, 1996d, 1996e) incluindo os métodos propostos (Delincée, 2001b).

TABELA 3.2. Métodos padrões europeus de detecção de alimentos irradiados (incluindo métodos propostos)

PADRÃO Nº	MÉTODOS	PRODUTOS VALIDADOS
EN 1784	Análise por cromatografia gasosa dos hidrocarbonetos	Frango, porco, bife, abacate, manga, mamão, queijo <i>Camembert</i>
EN 1785	Análise por cromatografia gasosa/ espectrometria de massa dos 2-alcilciclobutanonas	Frango, porco, ovo
EN 1786	Espectroscopia ESR de ossos	Frango, peixe, coxa de rã
EN 1787	Espectroscopia ESR de celulose	Pó de pimentão doce, morango
EN 1788	Termoluminescência de minerais de silicato	Ervas e especiarias, camarões
prEN 13708	Espectroscopia ESR de açúcares cristalinos	Mamões secos, mangas secas, figos secos, passas
prEN 13751	Luminescência fotoestimulada	Ervas e especiarias, mariscos
prEN 13783	Teste microbiológico DEFT/APC	Ervas e especiarias
prEN 13784	Teste do cometa (<i>comet assay</i>)	Frango, porco, sementes

Fonte: Delincée, 2001b

Segundo Delincée (1998b), os métodos de detecção de alimentos irradiados podem ser divididos em métodos físicos, químicos e biológicos.

3.5.1 Métodos físicos

A tabela 3.3 apresenta os métodos baseados nas mudanças físicas no alimento irradiado.

A Espectroscopia de Ressonância *Spin* Elétron (ESR) detecta centros paramagnéticos (radicais). Um campo magnético externo produz uma diferença entre os níveis de energia nos *spins* do elétron. Quando aplicada a energia apropriada da frequência de microondas (frequência de ressonância), os *spins* dos elétrons são forçados a se inverterem e, em conseqüência, a energia de absorção de microondas é detectada como sinal. Os radicais são estáveis nos componentes sólidos e secos do alimento. Esta técnica é não destrutiva, específica e combina simplicidade e rapidez (Stevenson & Gray, 1995; Raffi & Stocker, 1996; Desrosiers, 1996).

O método padrão EN 1786 é aplicado em alimentos contendo ossos. Embora os principais constituintes do osso serem a hidroxiapatita e o colágeno, o espectro característico da ESR do osso irradiado, corresponde ao radical CO_2^- . A hidroxiapatita tem a fórmula idealizada de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, porém é comumente observada a substituição isomorfa de alguns íons de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} e, está particularmente associada com as superfícies minerais. O íon CO_3^{2-} é geralmente considerado como a origem do radical CO_2^- no osso irradiado (Glidewell & Goodman, 1996).

O método padrão EN 1787 está baseado na formação de radicais de celulose após irradiação. Com o propósito de aumentar a sensibilidade têm sido feitas melhoras no procedimento por Delincée & Soika (2001), De Jesus *et al.* (1999) e Yordanov *et al.* (2000).

A composição química de frutos desidratados e das partes sólidas de frutos frescos é mais complicada do que o osso, portanto os sinais induzidos pela irradiação são mais complexos e mais dependentes da espécie e da parte particular do fruto (Raffi *et al.*, 1992). No exoesqueleto de crustáceos, a química da cutícula também é bastante complexa, por essa razão, são produzidos sinais diferentes para diferentes espécies (Stewart, 1996). A ESR também pode detectar radicais induzidos pela radiação no material da embalagem, oferecendo um controle indireto do alimento irradiado (Helle *et al.*, 1993).

Os produtos alimentícios contendo minerais de silicato guardam energia pelo processo de aprisionamento devido à exposição à radiação ionizante. No método de termoluminescência (TL), estes minerais são isolados do alimento e a sua energia armazenada é liberada mediante aquecimento controlado dos minerais, dando origem à emissão de luz. Pelo fato de quantidades ou tipos variáveis de minerais de silicato exibirem intensidades de TL muito variáveis após a irradiação, é necessária uma segunda medida de TL da mesma amostra após exposição a uma dose conhecida de radiação para normalizar a resposta de TL. É pré-requisito que uma quantidade suficiente (alguns mg) de minerais de silicato possa ser isolada (Delincée, 1998b; Villavicencio *et al.*, 1996).

A luminescência fotoestimulada evita a necessidade de isolar minerais, assim, a medida é realizada em poucos minutos. Em contraste à TL, à quimioluminescência e à lioluminescência, a luminescência fotoestimulada não é destrutiva (Sanderson *et al.*, 1994).

A técnica de impedância consiste em submeter amostras de alimentos a fortes correntes elétricas alternadas e a várias frequências (Haire *et al.*, 1997). Hayashi *et al.* (1996) mostrou que a relação das magnitudes de impedância de 5 a 50kHz, medida a

22-25°C na região apical da batata com 1mA de corrente alternada, pode ser usada para detectar batatas irradiadas.

A viscosidade de homogenatos e suspensões pode ser alterada pela radiação ionizante. Embora este método seja um dos mais fáceis, baratos e rápidos de executar, tem sido sugerido que os resultados positivos devem ser checados pela ESR ou pela TL (Haire *et al.*, 1997).

TABELA 3.3. Métodos físicos de detecção de alimentos irradiados

MÉTODO	APLICABILIDADE
Mudanças nas propriedades físicas	
Impedância elétrica	Batatas
Viscosimetria	Pimenta
Análise termal	Peixe, camarão, ovo branco
Espectroscopia Infravermelho Próximo (NIR)	Especiarias
Ressonância Magnética Nuclear (NMR)	
Deteção de radicais livres	
Espectroscopia de Ressonância Spin Elétron (ESR)	Alimentos contendo ossos, alimentos contendo celulose, alimentos contendo açúcar cristalino (manga seca, figo seco), alguns crustáceos.
Luminescência:	
Quimioluminescência	Algumas especiarias, ervas e vegetais desidratados, crustáceos, ossos de frango.
Termoluminescência	Alimentos contendo minerais de silicato (especiarias, ervas e camarões), crustáceos frutas e vegetais desidratados.
Luminescência fotoestimulada	Alimentos contendo traços de minerais e materiais bioinorgânicos (ervas, especiarias e temperos, crustáceos e mariscos)

Fonte: Delincée, 1998b

3.5.2 Métodos químicos

O método químico de detecção mais avançado detecta mudanças na parte lipídea do alimento (McMurray *et al.*, 1996; Raffi *et al.*, 1994).

O método padrão europeu EN 1784 está baseado na formação de hidrocarbonetos radiolíticos. O método compreende o isolamento da gordura, separação da fração do hidrocarboneto mediante cromatografia de absorção e a caracterização dos hidrocarbonetos por cromatografia gasosa. Embora os hidrocarbonetos serem também formados por outros tratamentos no alimento, o seu padrão de distribuição quantitativa é característico. Este método é aplicável em alimentos contendo lipídeos incluindo aqueles com baixo conteúdo de gordura (Delincée, 1998b; Villavicencio *et al.*, 1997a). A cromatografia gasosa pode ser utilizada em combinação com a cromatografia líquida, precisando de menor material e de menor tempo (Schulzki *et al.*, 1997).

O método padrão EN 1785 está baseado na detecção dos 2-alcilciclobutanonas derivados dos ácidos graxos após irradiação. A gordura do alimento é extraída mediante solventes, os alcilciclobutanonas são isolados mediante cromatografia de adsorção e, analisados mediante cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Pode ser aplicado em alimentos contendo gorduras, mesmo que estejam presentes em pequenas quantidades (Delincée, 1998b). A cromatografia líquida também pode ser utilizada conforme Meier *et al* (1996).

Tem sido considerado que a formação dos 2-alcilciclobutanonas é iniciada pela perda de um elétron do oxigênio do grupo carbonila de um ácido graxo ou de um triglicerídeo e, a ocorrência de um processo de rearranjo para produzir os 2-alcilciclobutanonas (Tabela 3.4). Os 2-alcilciclobutanonas parecem ser específicos do

processo de irradiação porque ainda não têm sido encontrados em amostras não irradiadas (Stevenson, 1996).

TABELA 3.4. 2-alcilciclobutanonas produzidos a partir de ácidos graxos

Acido Graxo	2-alcilciclobutanona produzido
Mirístico (C14:0)	2-decilciclobutanona
Palmítico (C16:0)	2-dodecilciclobutanona
Esteárico (C18:0)	2-tetradecilciclobutanona
Oléico (C18:1)	2-tetradecenilciclobutanona
Linoleico (C18:2)	2-tetradecadienilciclobutanona

Fonte: Stevenson, 1996

A medida de gases radiolíticos (H_2 , CO_2) aprisionados no alimento é utilizada para a detecção de alimentos irradiados. Estes gases são liberados mediante trituração ou breve aquecimento por microondas e detectados mediante cromatografia de gás ou outros sensores de gás. Devido ao fato destes gases difundirem rapidamente fora do alimento antes da detecção, este método está limitado a alimentos congelados (Hitchcock, 1994).

Nićiforović *et al* (1999) reportou a identificação do dano radiolítico nas proteínas acompanhadas de mudanças na massa molecular o que poderia servir como um marcador do tratamento prévio por irradiação.

TABELA 3.5. Métodos químicos de detecção de alimentos irradiados

METODOS	APLICABILIDADE
Proteínas	
o-tirosina	Frango, camarão, mariscos, peixe, coxa de rã, ovo branco
Formaldehido	Aves
Ligações cruzadas	
Fragmentação (Imunoquímica)	Ovo branco, frango, camarão
Lipídeos	
Hidrocarbonetos	Frango, porco, bife, abacate, queijo <i>Camembert</i> , manga, mamão, ovo em pó, peixe, camarão, mariscos, especiarias, coxa de rã, nozes, feijão
2-alcilciclobutanonas	Frango, porco, ovo, bife, carne de cordeiro, camarão, manga, mamão, queijo <i>Camembert</i>
Imunoquímica	Frango, camarão graúdo
Hidroperóxidos de lipídeos	Porco, ovo em pó, frango, licor
Produtos de oxidação do colesterol	Ovo em pó, frango, bife, porco
Carboidratos	
Isômeros óticos	
Ácidos nucléicos	
Dano nas bases, imunoensaio	Trigo, camarão
Quebra das cadeias:	
Filtração alcalina	Crustáceos
Eletroforese em agarose do DNA mitocondrial	Fígado de boi, carnes, frango, peixe, camarão
Eletroforese em gel (<i>pulsed field</i>)	Frango
Eletroforese em microgel (<i>Comet Assay</i>)	Carnes, cereais, frutos, peixes, vegetais
Citometria de fluxo	Cebolas
Outros constituintes do alimento	
Evolução de gases de baixo peso molecular	Carnes congeladas, camarão, especiarias
Isômeros óticos	Licor

Fonte: Delincée, 1998b

A o-tirosina, é formada pela adição de radicais HO• no anel aromático da fenilalanina (Karam & Simic, 1988). Dos três tipos de isômeros aromáticos formados (*orto*, *meta* e *para*), o isômero *orto* é o mais fácil de quantificar (Chuaqui-Offermanns & McDougall, 1991). Cabe salientar que Szekely *et al* (1992) detectaram pequenas

quantidades residuais de *o*-tirosina em carne não irradiada, porém a sua concentração não interferiu com o teste. A dependência dos níveis de *o*-tirosina e *m*-tirosina em produtos ricos em proteínas com a dose absorvida de radiação, oferece a possibilidade de identificação de alimentos processados por irradiação (Krach *et al.*, 1999).

A fragmentação do DNA pode ser analisada por vários métodos como eluição de filtro e várias técnicas eletroforéticas (Delincée, 1996a). Os efeitos da radiação ionizante sobre o DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido estudados por Marchioni (1996). A vantagem de utilizar o mtDNA é que está protegido contra reações enzimáticas que geralmente quebram o DNA celular durante o armazenamento e parece ser resistente aos ciclos de congelamento/descongelamento (Delincée, 1996a). Assim sendo, tem sido assumido que a quebra das cadeias de mtDNA é específica da radiação ionizante. Uma desvantagem deste método é que o processo de extração do mtDNA é complicado e demorado (Marchioni, 1996).

Outros métodos químicos de detecção estão sumariados na tabela 3.5.

3.5.3 Métodos biológicos

Betts *et al* (1988) propôs o método baseado no uso combinado dos testes DEFT (*Direct Epifluorescent Filter Technique*) e APC (*Aerobic Plate Count*) para a detecção de alimentos irradiados. O teste DEFT é usado para determinar o número total de microorganismos, independente da sua viabilidade, no alimento e, o teste APC enumera os microorganismos viáveis capazes de formar colônias. As diferenças entre as contas dos testes DEFT e APC estimam o número de microorganismos considerados não viáveis pelo processo.

Outro método, similar ao teste DEFT/APC, utiliza o teste *LAL* (*Limulus Amoebocyte Lysate*) em combinação com o teste GNB (*gram-negatives Bacterias*). O teste *LAL* determina a medida das endotoxinas derivadas das bactérias *gram* negativas viáveis e não viáveis (Hammerton, 1996).

Os métodos *LAL*/GNB e DEFT/APC podem ser disponíveis para determinar o estado higiênico do alimento antes e ainda após o tratamento por irradiação (Delincée, 1998b).

Outros métodos biológicos são apresentados na tabela 3.6.

TABELA 3.6. Métodos biológicos de detecção de alimentos irradiados

METODOS	APLICABILIDADE
Características histológicas/morfológicas	
Inibição da divisão celular	Bulbos e tuberosas
Perda da formação do peridermo na parte danificada	Batatas
Inibição da germinação da semente	Frutos, cereais
Aberrações cromossômicas	Cereais, batatas, morango
Microscopia eletrônica	Frutos, camarões
Mudanças na susceptibilidade à decomposição bacteriana	Carnes, peixe
Mudanças na microflora	
Análise microbiológica	Peixe, camarão, morango
Resistência à radiação	Frango, peixe, camarão
Redução da viabilidade:	
DEFT/APC (<i>Direct Epifluorescent Filter Technique</i>)	Carnes, especiaria, camarão, bacalhau
<i>Aerobic Plate Count</i>	
<i>LAL</i> /GNB (<i>Lysate/Gram-negatives Bacterias</i>)	Frango
Mudanças nos insetos	
Gânglio supraesofagal	
Teste do polifenoloxidase	

Fonte: Delincée, 1998b

3.6 TESTE DO COMETA OU ELETROFORESE EM MICROGEL

O teste do cometa (*comet assay*), também denominada eletroforese em microgel, foi primeiro introduzido por Östling e Johanson em 1984 como uma técnica eletroforética para a direta visualização do dano no DNA em nível de células individuais (Östling & Johanson, 1984). Quando as células são submetidas a um campo elétrico, os fragmentos danificados de DNA migram para o anodo adquirindo a aparência de um cometa. A região nuclear dá origem à cabeça do cometa enquanto que os fragmentos dão origem às caudas cuja extensão está intimamente relacionado com a intensidade do dano (Fairbairn *et al.*, 1995; McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Östling & Johanson (1984) observaram que a migração destes fragmentos era uma função da dose de radiação. Isto porque com o acréscimo da dose de radiação ocorre maior fragmentação do DNA e estes fragmentos irão migrar mais pronunciadamente durante a eletroforese.

Têm sido considerados dois princípios que determinam o padrão de formação do cometa. A habilidade de migração dos fragmentos de DNA é uma função tanto do tamanho do DNA quanto do número de fragmentos quebrados que iriam se unir a fragmentos maiores do DNA, os que podem migrar uma curta distância desde o núcleo. A extensão de migração dos fragmentos de DNA inicialmente aumenta com o dano, porém, atinge um máximo o que é definido pelas condições da eletroforese mas não pelo tamanho dos fragmentos (Fairbairn *et al.*, 1995). Virtualmente, todas as células eucarióticas podem ser processadas para analisar o dano no DNA usando o teste do cometa (Fairbairn *et al.*, 1995; McKelvey-Martin *et al.*, 1993).

O teste do cometa tem sofrido varias modificações, porém, os seus princípios estão baseados na versão neutra ou alcalina. Em geral, sob condições alcalinas são medidas as quebras simples e duplas e os sítios álcali-lábeis, enquanto sob condições

neutras somente são observadas as quebras duplas da fita do DNA (Cerde, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995; Klaude *et al.*, 1995).

Esta técnica, hoje em dia, é amplamente aceita e está sendo utilizada em uma variedade de áreas de investigação como: estudos de genotoxicidade, estudos de reparo do DNA, biomonitoramento ambiental, estudo de células apoptóticas, monitoramento humano, entre outros (Rojas *et al.*, 1999; Olive, 1999; Koppen *et al.*, 1999; Fairbairn *et al.*, 1995; Malyapa *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1995; Choucroun *et al.*, 2001; Kassie *et al.*, 2000).

O uso do teste do cometa na detecção de alimentos irradiados foi sugerido por Östling & Hofsten (1988) e por Johanson (1991). Cerde *et al* (1993) aplicou este método pela primeira vez em amostras de alimentos utilizando um protocolo neutro. Para simplificar o teste utilizou uma camada simples de agarose em vez de uma camada “sanduíche” e, pelo fato de as doses de radiação, usadas na irradiação de alimentos, causarem danos expressivos no DNA, utilizou um pH neutro em combinação com baixa voltagem e tempo curto de eletroforese.

O teste do cometa tem sido aplicado a um grande número de alimentos tanto de origem animal e vegetal. As vantagens deste teste, no entanto, para alimentos não expostos ao calor, são sua velocidade e simplicidade, visto que a corrida eletroforética demora apenas alguns minutos. O DNA pode ser visualizado mediante coloração com solução de prata evitando a necessidade de um microscópio de fluorescência, conseqüentemente, este método requer equipamentos relativamente baratos em contraste a outros métodos para identificação de alimentos irradiados. O teste do cometa é considerado como um método de varredura (*screening*), adequado para detectar se o alimento foi processado por irradiação ou não e, seus resultados deverão ser confirmados por outros métodos mais específicos (Delincée, 1996b).

A fragmentação do DNA é um processo natural que acontece nas células após a morte (apoptose). Este processo também pode ocorrer pelo tratamento com calor, ciclos repetidos de congelamento/descongelamento, assim, os longos períodos de armazenamento podem interferir com os resultados (Cerde & Koppen, 1998; Cerda, 1998a,b; Delincée, 1996b). Em carnes não irradiadas, a presença de muitas células em estado avançado de degradação do DNA pode ser somente um sinal de condições pobres de armazenamento o que pode servir como indicador de qualidade (Cerde *et al.*, 1997).

O teste do cometa tem sido proposto como padrão europeu para a detecção de alimentos irradiados (prEN 13784) (Delincée, 2001b).

3.7 TESTE DE GERMINAÇÃO

A irradiação de cereais e frutos afeta à viabilidade das sementes ainda em doses relativamente baixas usadas nestes produtos alimentícios. O teste de germinação está baseado na avaliação do crescimento de raízes e de caules de sementes em germinação (Hammerton, 1996; Kawamura *et al.*, 1996b).

O teste de germinação é considerado como um método simples, prático e barato e, pode ser usado como varredura na detecção de frutos e cereais irradiados (Kawamura *et al.*, 1996b).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram analisados alimentos "*in natura*" de origem animal tal como coxão mole bovino e, de origem vegetal, frutos tais como: laranja, melão, maçã, tomate, melancia e mamão. As amostras foram obtidas no comércio varejista da cidade de São Paulo.

4.2 IRRADIAÇÕES

As amostras de alimentos foram irradiadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). As fontes de radiação utilizadas foram:

- ♦ GammaCell 220 ^{60}Co , Atomic Energy of Canada Ltda;
- ♦ Acelerador de elétrons da Radiation Dynamics Inc. USA, 1.5MeV-25mA

Amostras de coxão mole bovino, de aproximadamente 5gr por dose, foram empacotadas em sacos pequenos de plástico e irradiadas em fonte gama com taxa de dose de 5,31 kGy/h. Devido ao fato de o acelerador de elétrons apresentar uma penetração máxima de 5mm, foram utilizadas amostras de 5mm de espessura. As doses utilizadas foram: 0,0; 2,5; 4,5 e 7,0 kGy para carne resfriada e 0,0; 2,5; 4,5; 7,0; e 8,5 kGy para carne congelada. As amostras de carne estocadas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) foram avaliadas durante 15 dias enquanto que as estocadas sob congelamento ($-6^{\circ}\text{C} \pm 1$) foram avaliadas durante 30 dias.

Para o teste do cometa em frutos, os caroços foram retirados dos frutos, 15-20 caroços sadios por dose foram acondicionados em placas petri e irradiados a

temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) nas seguintes doses: 0,0; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 kGy, sendo as taxas de dose na fonte gama: 5,31 kGy/h para as amostras de maçã e laranja e, 5,37 kGy/h para as de melão, melancia e tomate.

Para o teste de germinação, foram irradiadas as seguintes quantidades de caroços por dose: 12 de melão e melancia, 20 de tomate, 10 de maçã, e 8-10 caroços de laranja. Os caroços foram acondicionados em placas petri e irradiados.

As doses aplicadas estiveram dentro das faixas de doses recomendadas, para a diminuição da carga microbiana em carne e, para a desinfestação de insetos e retardo do amadurecimento em frutos. Doses superiores às recomendadas foram aplicadas para efeitos comparativos.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Teste do cometa

Este método foi realizado utilizando um protocolo neutro conforme descrito por Cerda *et al* (1997).

4.3.1.1 Procedimento

- Preparo das lâminas com a agarose

Foram colocadas 2 gotas da primeira agarose a 50°C sobre a lâmina. A agarose foi puxada com outra lâmina formando uma fina camada de gel. A lâmina foi deixada secar a temperatura ambiente e depois rotulada.

- **Preparo da suspensão de células da amostra**

Amostras de carne: 2g de carne por dose foram trituradas e colocadas em um béquer. Foi adicionado 3ml de PBS gelado.

Amostras de frutos: foram extraídos os embriões de 10-15 caroços por dose. Os embriões foram triturados e colocados em 2ml de amilase 2% por 5 minutos (para eliminar restos de amido se houver), em seguida foi adicionado 1ml de PBS gelado.

Uma vez em PBS, as suspensões das amostras foram homogeneizadas em um agitador magnético por 5 minutos e filtradas em gaze normal e, em seguida em filtro de 125 μ m. Somente a suspensão de células dos embriões dos frutos foi deixada sedimentar por 30 minutos.

- **Preparo de gel com células**

100 μ L do sobrenadante da suspensão de células foram misturados com 500 μ L da segunda agarose. 100 μ L desta mistura foram colocados sobre a lâmina, identificada previamente, e coberta com lamínula para espalhar as células. O procedimento foi repetido para cada dose e para cada amostra. As lâminas foram deixadas no suporte com gelo por 5 minutos para solidificação do gel, em seguida as lamínulas foram retiradas cuidadosamente.

- **Lise das células**

As lâminas foram mergulhadas no tampão lise por 15 minutos para as amostras de carne e 30 minutos para as amostras de frutos.

- **Eletroforese**

As lâminas foram posicionadas na câmara de eletroforese horizontal até completar os espaços. 1L de tampão de eletroforese foi colocado na câmara e após 5 minutos, a corrida eletroforética foi realizada por 2 minutos, 2V/min e 100mA.

As lâminas foram lavadas com água bidestilada por 1 minuto e deixadas escorrer e secar em uma bandeja com papel absorvente ou secadas na estufa aproximadamente por 20 minutos a 50°C.

- **Fixação**

As lâminas foram mergulhadas em uma cubeta com a solução fixadora por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água bidestilada por 1 minuto e deixadas secar.

- **Coloração**

A soluções A e B foram misturadas e adicionadas na cubeta contendo as lâminas. O tempo de coloração foi de 30 minutos e de 1 hora para as amostras de carne e de frutos respectivamente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água bidestilada por 1 minuto e mergulhadas na solução finalizadora por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água bidestilada e deixadas para secar.

- **Microscopia**

As observações das células foram feitas em microscópio óptico em aumento de 40x1,25x12,5.

- **Avaliação**

Foram medidas as distâncias de migração do DNA, em micrômetros, em 100 células por dose. A medida foi feita desde a metade do núcleo até o final da cauda, conforme o critério adotado por Koppen & Cerda (1997).

4.3.1.2 Preparo de soluções e reagentes

- Tampão TBE 0,45M = Tris-Borato-EDTA (pH 8,4) (Solução estoque)

Para 1 litro:

0,446M Tris 54g

0,445M ácido bórico 27,5g

0,5M EDTA, pH 8 20ml

Completar com água destilada até 1000ml e acertar o pH para 8,4

Preparo de 20ml de EDTA 0,5M : Pesar 3,72 g de EDTA num béquer de 20ml completar com 18ml de água e acertar o pH em 8,0 com NaOH 40%.

- Solução estoque de EDTA (500ml)

Na₂ EDTA. 2H₂O 93,05 g

Diluir em 300ml de água destilada e agitar bem. Acertar o pH em 8,0 e completar o volume para 500ml. Autoclavar.

- Preparo do TBE 0,045M para câmara de eletroforese

Para 1L: 100ml de TBE 0,45M + 900ml de água destilada, acertar o pH em 8,0.

- Tampão Lise: Tampão TBE 0,045M com 2,5% de SDS.

25g de SDS em 1000ml de TBE 0,045M.

- Tampão PBS pH 7,4

NaCl 8g

KCl 0,2g

Na₂HPO₄.7H₂O 2,68g (= 1,44g de Na₂HPO₄)

KH₂PO₄ 0,24g

Com HCl acertar o pH em 7,4 e completar para 1000ml com água destilada.

Autoclavar.

- Preparo da primeira agarose 0,5% L-agarose

50mg (0,05g) de L-agarose em 10ml de água destilada. Cozinhar no bico de Bunsen até ficar transparente. Levar a banho maria a aproximadamente 50°C, tampada para não perder a concentração.

- Preparo da segunda agarose 0,8% L-agarose em PBS

80mg (0,08g) de L-agarose em 10ml de PBS, cozinhar até ficar transparente e levar ao banho maria a aproximadamente 50°C onde deve ficar tampada.

- Solução fixadora

15% TCA 150g

5% ZnSO₄.7H₂O 80g (5% ZnSO₄ 50g)

5% Glicerina 50g = 40ml

Completar com água destilada para 1L.

- Solução de coloração:

A: 5% Na₂CO₃ 50g em 1000ml de água destilada

B: 0,02% (NH₄)NO₃ 200mg = 0,2g

0,02% AgNO₃ 200mg = 0,2g

0,1% ácido silicotungstic 1000mg = 1g

0,05% formaldehído (37%) 500µL

Completar para 1000ml com água destilada.

Para coloração em uma cubeta para 10 lâminas: 32ml da solução A + 68ml da solução B

- Solução finalizadora: 1% de ácido acético
990 ml de água destilada + 10 ml de ácido acético.

4.3.2 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado conforme critério adotado por Kawamura *et al* (1996b). A casca externa dos caroços foi removida, exceto para tomate, sendo obtidos embriões com os seus respectivos endospermos. As quantidades de embriões a serem incubados foram: 12 de melão e melancia, 10 de maçã e 15 de laranja. Pelo fato de os caroços de laranja apresentarem vários embriões, estes foram separados e foram escolhidos aqueles com tamanho maior de endospermo. Os embriões foram acondicionados numa placa petri com papel de filtro umedecido com água destilada, as placas foram cobertas com papel alumínio e levadas em seguida para incubação na estufa em temperatura ótima. Os embriões de maçã foram incubados a 30°C conforme Kawamura *et al* (1995), laranja a 35°C (Kawamura *et al*, 1989b); melão e melancia 32°C. Os caroços de tomate, 20 por dose, foram incubados da mesma forma a 32°C.

Foram registradas as medidas dos comprimentos dos caules e das raízes, em milímetros e, a porcentagem de germinação no período de 1 a 4 dias após incubação para melão e melancia e, de 1 a 7 dias para maçã, laranja e tomate.

4.3.3 Análise estatística

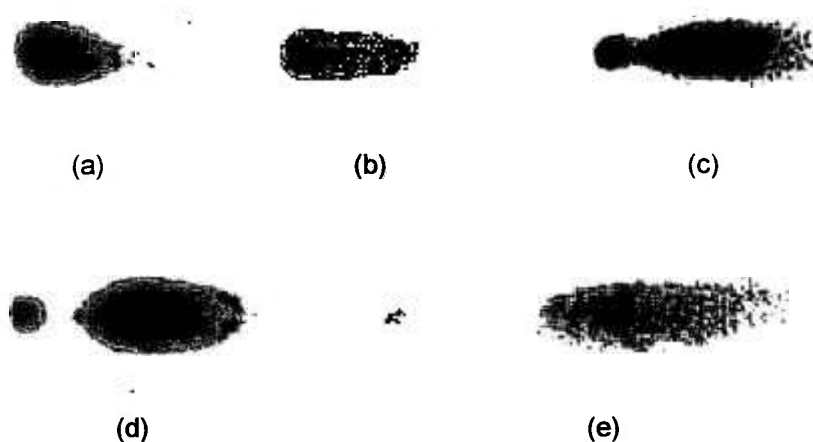
O teste de Tukey foi utilizado para comparar a amostra controle com os outros tratamentos e, os efeitos da radiação gama com os do feixe de elétrons, mediante o programa de computação SAS v. 6.0 (Montgomery, 1984).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DO COMETA EM COXÃO MOLE BOVINO

O aumento gradativo do dano radioinduzido no DNA nas amostras de coxão mole bovino foi caracterizado por células com diferentes padrões de migração dos fragmentos de DNA, similares aos descritos por Cerda & Koppen (1998) em amostras de frango. As células cometa foram classificadas com base a sua morfologia como ilustrados na figura 5.1.

FIGURA 5.1. Fotomicrografias de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino



- a) Tipo 1: Células quase intactas com cauda curta, relativamente pouca fragmentação do DNA.
- b) Tipo 2: Cauda comprida, maior do que o tipo 1.
- c) Tipo 3: Cauda comprida e maior largura da cauda.
- d) Tipo 4: Cauda comprida separada do núcleo, a cauda tem a aparência de nuvem, longe do núcleo.
- e) Tipo 5: O núcleo não tem quase nada de DNA e a cauda do cometa parece uma nuvem bastante longe do núcleo.

5.1.1 Coxão mole bovino congelado

A tabela 5.1 mostra os valores das distâncias de migração dos fragmentos de DNA e das frequências de tipos de cometa em função da dose de radiação, no primeiro dia após irradiação das amostras de coxão mole bovino congelado. Nota-se a presença de cometas tipo 1 (62%) somente no controle, entretanto, os cometas tipo 2 foram observados no controle e nas amostras irradiadas na dose de 2,5 kGy. As amostras expostas à radiação gama, nas doses 4,5; 7,0 e 8,5 kGy, apresentaram 100% de cometas tipo 3, de tamanhos similares, enquanto que, as irradiadas com feixe de elétrons nessas mesmas doses, além do tipo 3, apresentaram cometas tipo 4, mas em baixa proporção (2-3%). Diferenças nítidas, em relação à frequência de tipos de cometa entre o controle e as amostras irradiadas são ilustradas na figura 5.2.

TABELA 5.1. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 1 dia após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	21,71 ± 3,29	62	33,08 ± 4,28	38	-	0	-	0
Radiação								
gama								
2,5	-	0	37,13 ± 2,70	46	61,43 ± 1,79	54	-	0
4,5	-	0	-	0	62,47 ± 2,97	100	-	0
7,0	-	0	-	0	61,85 ± 1,99	100	-	0
8,5	-	0	-	0	61,92 ± 1,96	100	-	0
Feixe de								
elétrons								
2,5	-	0	46,60 ± 5,86	5	54,27 ± 3,07	95	-	0
4,5	-	0	-	0	54,36 ± 3,26	97	61,67 ± 1,53	3
7,0	-	0	-	0	54,04 ± 3,68	97	64,00 ± 1,00	3
8,5	-	0	-	0	54,02 ± 3,37	98	62,50 ± 0,71	2

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros ± desvio padrão

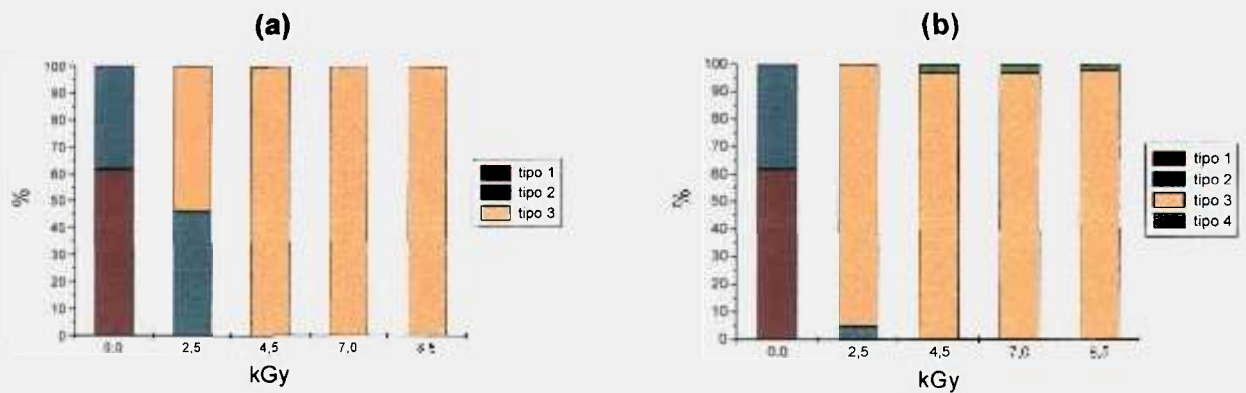


FIGURA 5.2. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 1 dia após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Os valores das distâncias de migração do DNA, quatro dias após irradiação, foram levemente superiores àqueles correspondentes ao primeiro dia. O controle apresentou cometas tipo 1 e 2, sendo que a porcentagem do tipo 2 aumentou de 38% para 66% em relação ao primeiro dia, entretanto, a porcentagem do tipo 1 diminuiu de 62% para 34%. Assim, 28% de cometas tipo 1 tomaram a aparência do tipo 2 devido à degradação do DNA com o tempo. Nas amostras irradiadas com feixe de elétrons foi notada a presença de cometas tipo 4, mas não, nas tratadas com radiação gama. As porcentagens destes cometas aumentaram em relação ao primeiro dia para 42% e 57% nas amostras irradiadas nas doses 7,0 e 8,5 kGy respectivamente, entretanto, a porcentagem de cometas tipo 3 diminuiu nessas doses ao adotarem o aspecto de cometas tipo 4 (tabela 5.2).

Após uma semana, na amostra controle, além dos tipos 1 e 2, foram observadas pequenas quantidades de cometas tipo 3 (2%). Nas amostras irradiadas nas doses de 2,5 e 4,5 kGy houve predominância de cometas tipo 3. Foi verificado um aumento nos valores das porcentagens de cometas tipo 4 nas doses 7,0 e 8,5 kGy em relação ao dia 4 (tabela 5.3).

Estes dados permitiram distinguir claramente a amostra controle das irradiadas nos dias 4 e 7 após irradiação, como são ilustrados nas figuras 5.3 e 5.4 respectivamente.

TABELA 5.2. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 4 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	24,91 \pm 2,93	34	34,47 \pm 5,09	66	-	0	-	0
Radiação								
gama								
2,5	-	0	-	0	61,18 \pm 2,05	100	-	0
4,5	-	0	-	0	66,04 \pm 3,74	100	-	0
7,0	-	0	-	0	67,95 \pm 3,04	100	-	0
8,5	-	0	-	0	67,87 \pm 3,28	100	-	0
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	-	0	54,61 \pm 3,09	98	62,50 \pm 0,71	2
4,5	-	0	-	0	55,23 \pm 2,77	98	63,50 \pm 2,12	2
7,0	-	0	-	0	54,66 \pm 3,32	58	62,57 \pm 2,11	42
8,5	-	0	-	0	55,07 \pm 2,76	43	63,23 \pm 1,99	57

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

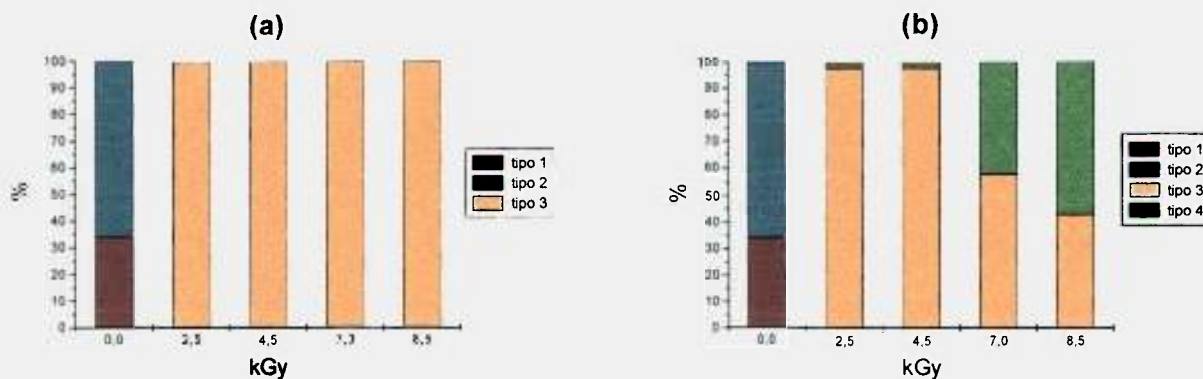


FIGURA 5.3. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 4 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

TABELA 5.3. Distância de migração do DNA e freqüência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 7 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	27,07 ± 2,79	15	36,78 ± 6,39	83	52,50 ± 3,54	2	-	0
Radiação								
gama								
2,5	-	0	-	0	68,80 ± 4,62	100	-	0
4,5	-	0	-	0	71,85 ± 3,54	87	79,67 ± 1,30	13
7,0	-	0	-	0	72,14 ± 3,42	36	79,23 ± 1,84	64
8,5	-	0	-	0	72,47 ± 3,13	19	81,73 ± 2,00	81
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	-	0	57,25 ± 1,86	96	63,50 ± 2,38	4
4,5	-	0	-	0	56,18 ± 2,12	92	66,00 ± 4,00	8
7,0	-	0	-	0	57,22 ± 2,62	41	65,03 ± 3,55	59
8,5	-	0	-	0	57,08 ± 2,61	12	67,10 ± 4,69	88

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

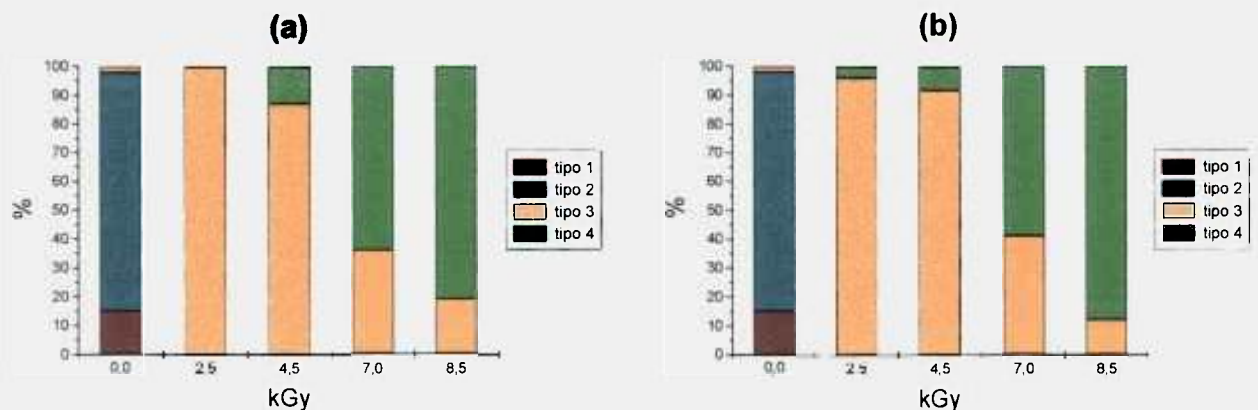


FIGURA 5.4. Freqüência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 7 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

A tabela 5.4 mostra que, após duas semanas, a amostra controle não apresentou cometas tipo 1 como nos dias anteriores e somente foram observados os tipos 2 e 3, sendo este último menos freqüente (19%). Pequenas quantidades de cometas tipo 5, isto é, células extremamente danificadas, foram observadas apenas nas amostras irradiadas com o feixe de elétrons nas doses 7,0 e 8,5 kGy (3% e 4% respectivamente). Embora o controle não ter apresentado células quase intactas, foi possível distingui-lo das amostras irradiadas, 15 dias após irradiação, como mostra a figura 5.5.

TABELA 5.4. Distância de migração do DNA e freqüência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 15 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4		Tipo 5	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	45,57 ± 5,35	81	71,00 ± 2,21	19	-	0	-	0
Radiação								
gama								
2,5	-	0	70,43 ± 3,50	98	72,50 ± 3,54	2	-	0
4,5	-	0	71,88 ± 4,58	72	81,64 ± 3,28	28	-	0
7,0	-	0	71,71 ± 2,98	41	81,76 ± 1,76	59	-	0
8,5	-	0	71,22 ± 2,64	9	81,77 ± 3,37	91	-	0
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	71,93 ± 2,07	41	82,12 ± 3,50	59	-	0
4,5	-	0	72,03 ± 2,07	34	83,53 ± 3,15	66	-	0
7,0	-	0	72,67 ± 2,08	3	83,44 ± 3,24	94	98,33 ± 1,53	3
8,5	-	0	-	0	83,33 ± 3,17	96	102,25 ± 2,06	4

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

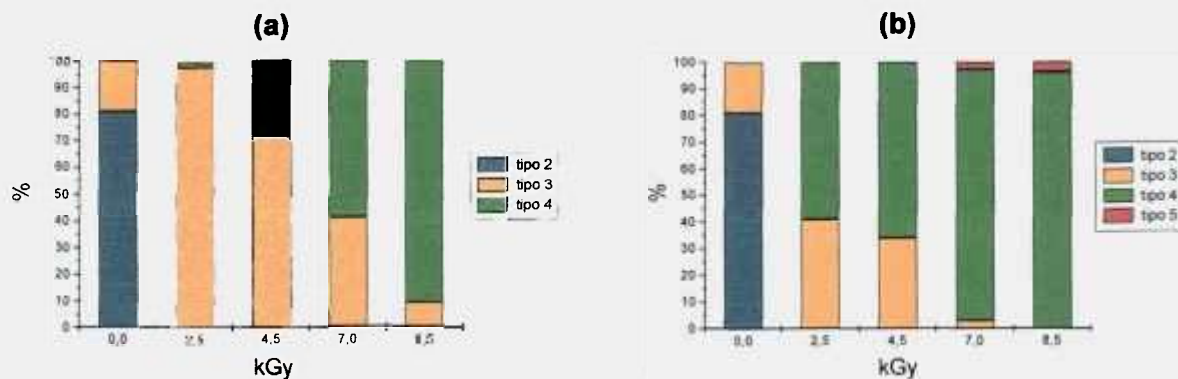


FIGURA 5.5. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 15 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Após um mês do tratamento, os cometas tipo 5 foram observados em todas as amostras irradiadas, mas em proporções baixas como são apresentados na tabela 5.5. Pelo fato de os cometas tipo 2 serem predominantes (78%) no controle foi possível distinguir as amostras irradiadas das não irradiadas como ilustra a figura 5.6.

Foi verificado um aumento na extensão da migração do DNA concomitante com o aumento da dose de radiação. Além disso, houve diferença significativa ($p < 0,01$) nas distâncias de migração do DNA entre os diferentes tempos de armazenamento exceto entre os dias 1 e 4. Na tabela 5.6 pode-se constatar que as distâncias de migração do DNA das amostras irradiadas com feixe de elétrons resultaram ser superiores do que nas tratadas com radiação gama, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. Conforme a figura 5.7, as amostras irradiadas apresentaram distâncias de migração do DNA pronunciadamente maiores do que o controle, permitindo distinguir o controle das amostras irradiadas até um mês após tratamento.

Em consequência, com a avaliação de tipos de cometas nas amostras de coxão mole bovino congelado, a presença de cometas tipo 1, nos dias 1, 4 e 7 após irradiação facilitou a rápida discriminação entre amostras irradiadas e não irradiadas a

partir da dose de 2,5 kGy. Esta discriminação foi possível nos dias 15 e 30 com a ocorrência de uma maior proporção de cometas tipo 2.

TABELA 5.5. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino congelado, 30 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4		Tipo 5	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	45,08 \pm 3,28	78	70,26 \pm 2,94	19	80,67 \pm 1,53	3	-	0
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	70,98 \pm 2,77	92	79,14 \pm 3,72	7	90,00 \pm 0	1
4,5	-	0	70,33 \pm 2,99	12	80,17 \pm 2,67	84	92,50 \pm 0,58	4
7,0	-	0	70,87 \pm 1,68	15	81,13 \pm 1,43	82	91,33 \pm 3,21	3
8,5	-	0	71,10 \pm 3,07	10	80,37 \pm 1,82	83	90,86 \pm 1,35	7
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	72,72 \pm 1,49	25	84,79 \pm 3,21	72	101,33 \pm 3,51	3
4,5	-	0	73,33 \pm 2,29	9	84,76 \pm 3,22	88	102,00 \pm 1,00	3
7,0	-	0	-	0	85,65 \pm 2,76	94	101,67 \pm 2,16	6
8,5	-	0	-	0	86,02 \pm 2,82	95	102,60 \pm 1,82	5

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

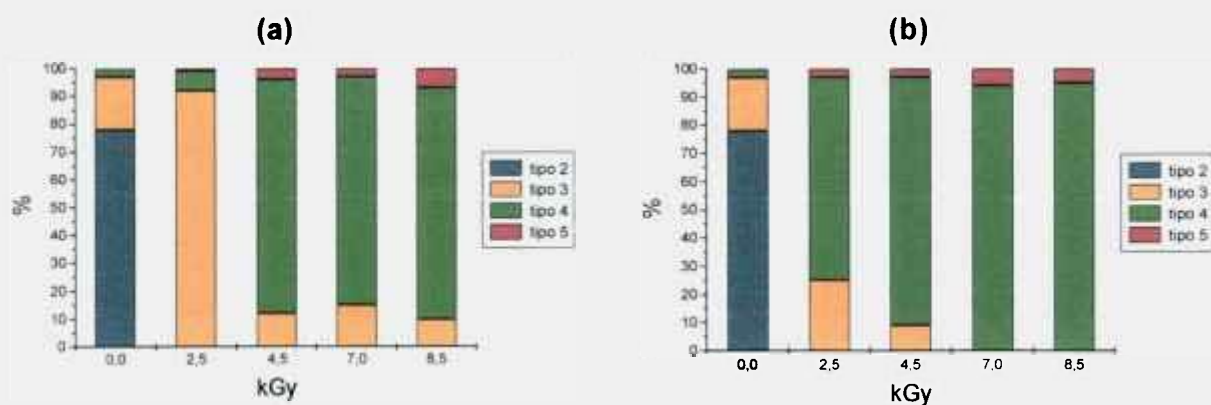


FIGURA 5.6. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, 30 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

TABELA 5.6. Distância total de migração do DNA por tempo de estocagem sob congelamento em amostras irradiadas de coxão mole bovino

Dias após irradiação	Controle	2,5 kGy		4,5 kGy		7,0 kGy		8,5 kGy	
		Raios gama	Feixe de elétrons	Raios gama	Feixe de elétrons	Raios gama	Feixe de elétrons	Raios gama	Feixe de elétrons
1	26,03 ± 6,66	50,25 ± 12,37	53,89 ± 3,63	62,47 ± 2,97	54,58 ± 3,46	61,85 ± 1,99	54,34 ± 4,01	61,92 ± 1,96	54,19 ± 3,55
4	31,22 ± 6,37	61,18 ± 2,05	54,77 ± 3,26	66,04 ± 3,74	55,40 ± 2,98	67,95 ± 3,04	57,98 ± 4,86	67,87 ± 3,28	59,72 ± 4,69
7	35,64 ± 7,28	68,80 ± 4,62	57,50 ± 2,24	72,89 ± 4,29	56,97 ± 3,52	76,68 ± 4,24	61,83 ± 5,01	79,97 ± 4,28	65,90 ± 5,55
15	50,40 ± 11,16	70,47 ± 3,49	77,94 ± 5,86	74,61 ± 6,11	79,62 ± 6,16	77,64 ± 5,49	83,56 ± 4,50	80,82 ± 4,48	84,09 ± 4,86
30	50,93 ± 11,64	71,74 ± 3,96	82,27 ± 6,84	79,48 ± 4,94	84,25 ± 5,49	79,90 ± 4,46	86,61 ± 4,69	80,18 ± 4,49	86,85 ± 4,57

Os resultados são as médias em micrômetros ± desvio padrão, n=100

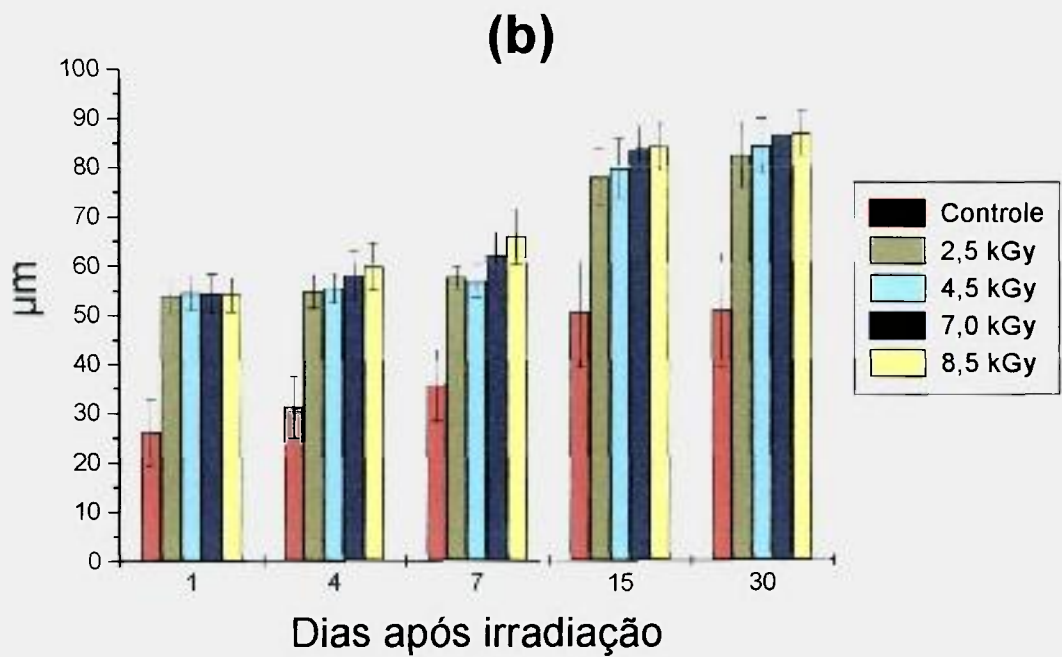
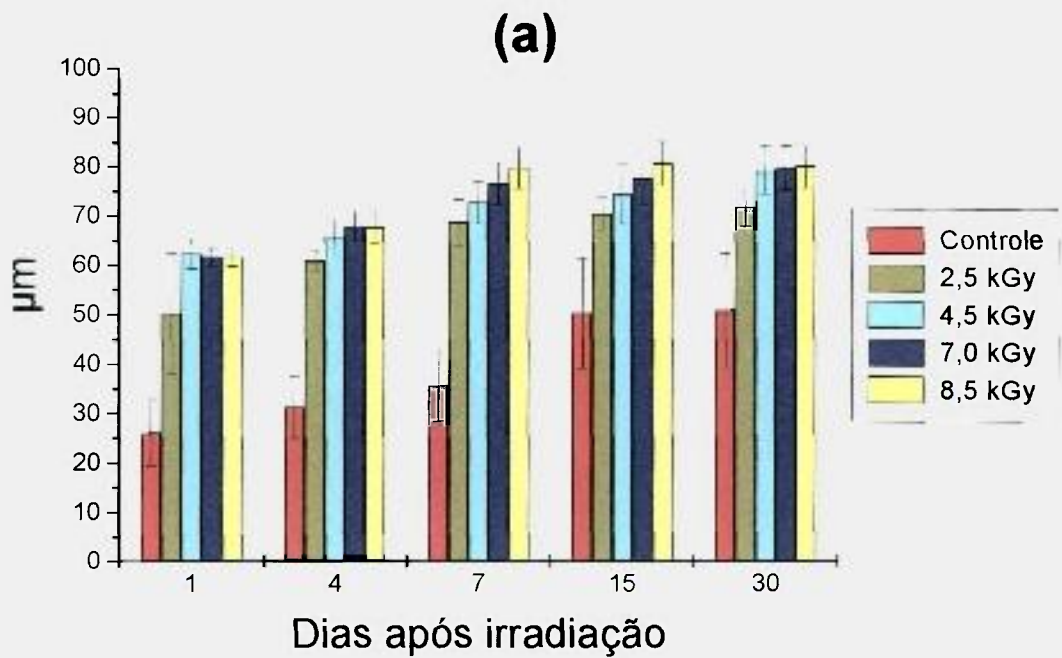


FIGURA 5.7. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de coxão mole bovino congelado, conforme o tempo de estocagem **(a)** radiação gama **(b)** feixe de elétrons

Nas figuras 5.8 e 5.9 estão apresentados os histogramas de distribuição dos valores das distâncias de migração dos fragmentos de DNA em função da dose de radiação de amostras de coxão mole bovino congelado tratadas com radiação gama e com feixe de elétrons respectivamente.

Nos histogramas, nota-se que as diferentes amostras apresentaram diferentes subpopulações de células com diferentes radios sensibilidades. No histograma que corresponde à amostra controle pode-se constatar que nos dias 1, 4 e 7 houve predominância de cometas com distâncias de migração do DNA na faixa de 20 a 40 μ m e, nos dias 15 e 30 estes valores estiveram entre 40 e 60 μ m. No entanto, no 1º dia após irradiação, as amostras expostas à radiação gama apresentaram valores de distância de migração do DNA principalmente na faixa de 60 a 80 μ m enquanto que nas irradiadas com feixe de elétrons estes valores estiveram na faixa de 40 a 60 μ m. Nota-se que há uma tendência ao deslocamento das barras dos histogramas para a direita tanto com o aumento da dose de radiação e com o tempo de estocagem. Assim sendo, houve uma substituição de células menos danificadas a mais danificadas conforme o aumento da dose de radiação. Aliás, foi verificado que o tempo de estocagem teve influência na degradação do DNA.

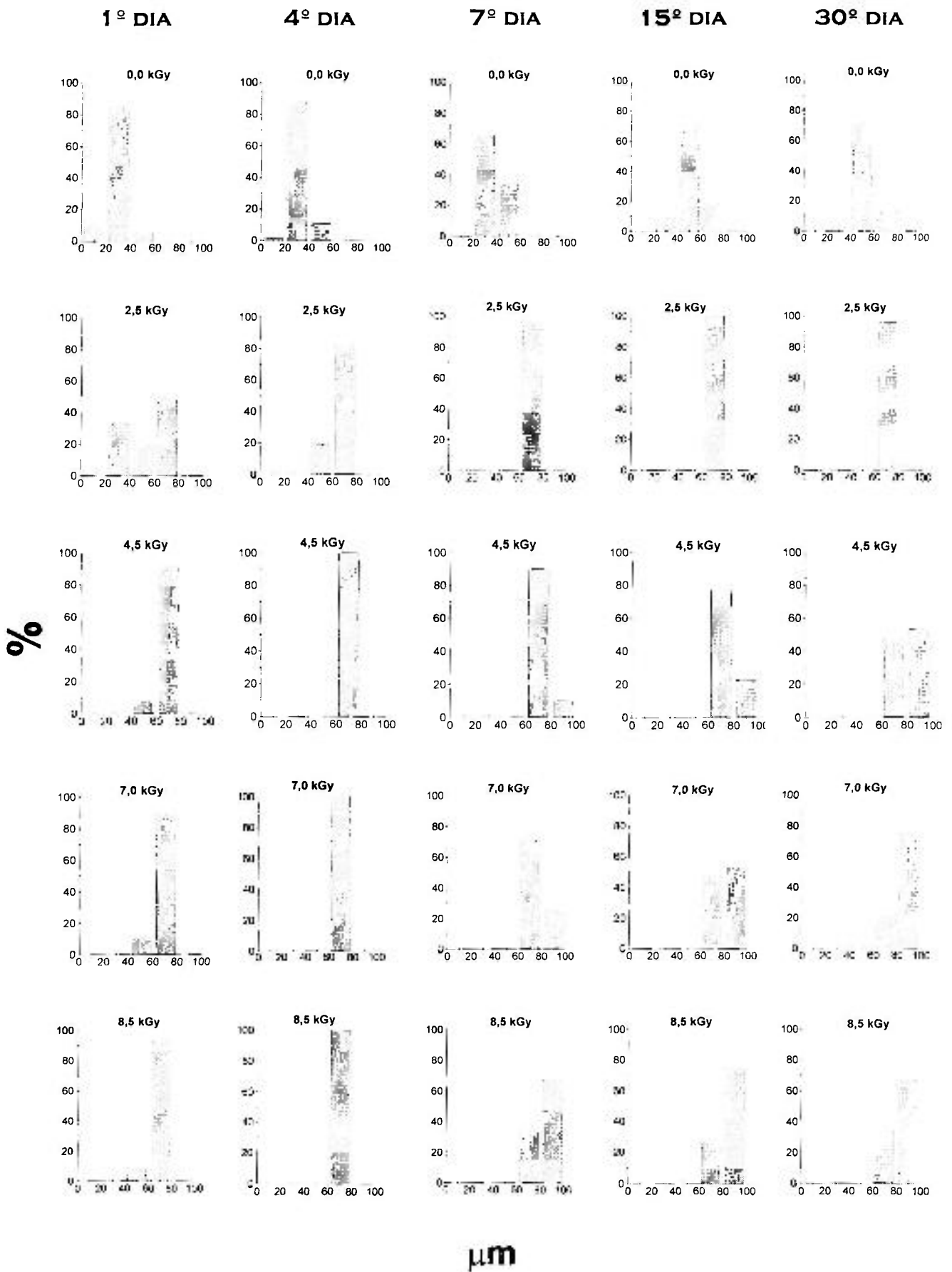


FIGURA 5.8. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino congelado irradiadas com raios gama

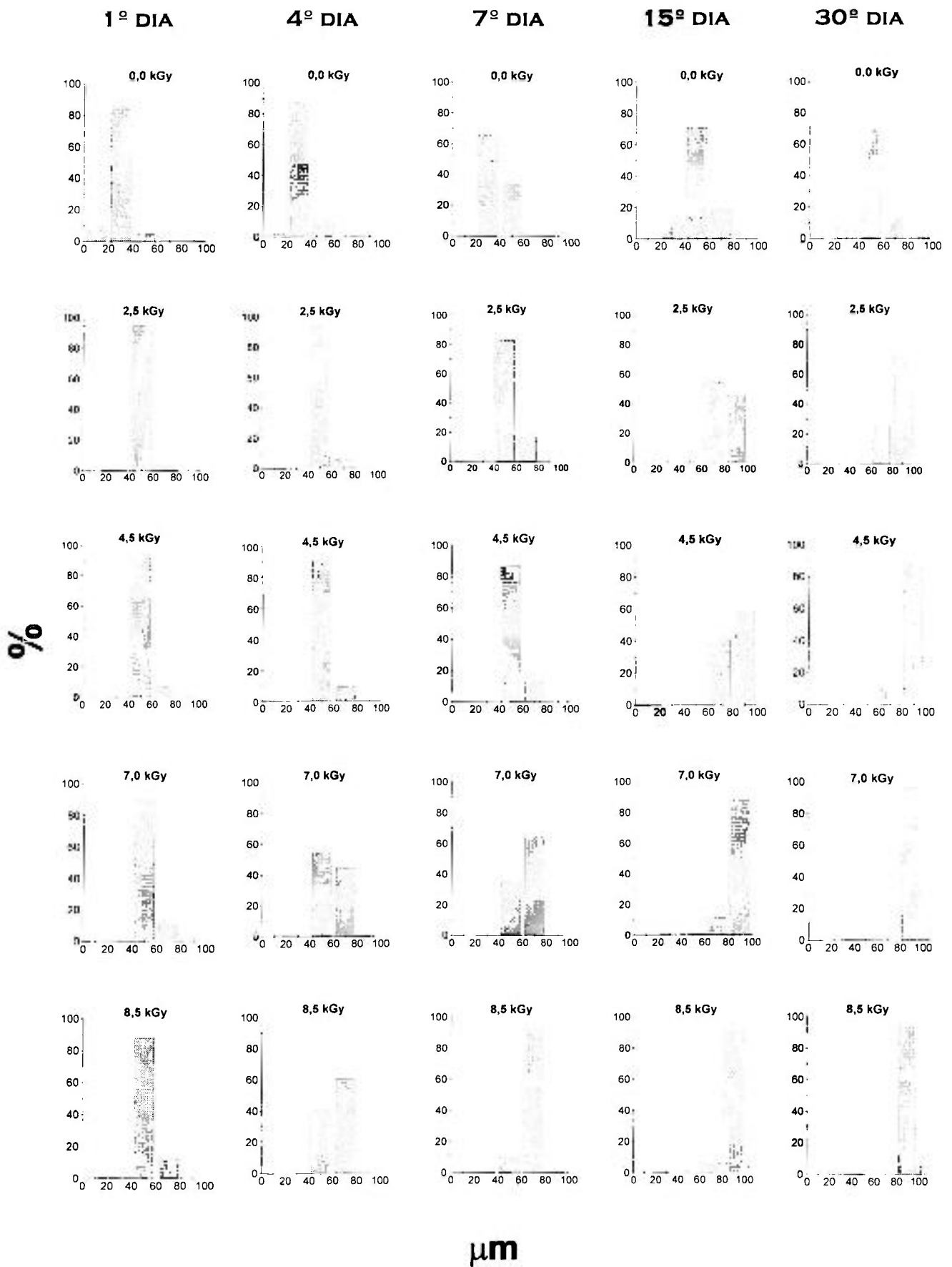


FIGURA. 5.9. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino congelado irradiadas com feixe de elétrons

5.1.2 Coxão mole bovino resfriado

A tabela 5.7 mostra os valores das distâncias de migração do DNA e de freqüências de tipos de cometa em função da dose de radiação no primeiro dia após irradiação de amostras de coxão mole bovino resfriado. Pode-se constatar a presença de cometas tipo 1 e 2 no controle, sendo mais freqüente o primeiro tipo (74%). Cometas tipo 3 foram predominantes nas amostras irradiadas. Diferenças marcantes entre o controle e as amostras irradiadas são ilustradas na figura 5.10.

Quatro dias após irradiação, a porcentagem de cometas tipo 1, no controle, diminuiu (57%) em comparação com o primeiro dia (tabela 5.8), mesmo assim foi possível discernir entre as amostras irradiadas e não irradiadas como ilustra a figura 5.11. Nas amostras irradiadas nas doses 2,5 e 4,5 kGy predominaram cometas tipo 3 enquanto que na dose de 7,0 kGy predominaram cometas tipo 4.

TABELA 5.7. Distância de migração do DNA e freqüência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 1 dia após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	20,68 ± 1,29	74	33,04 ± 2,96	26	-	0	-	0
Radiação								
gama								
2,5	-	0	35,92 ± 3,01	24	59,96 ± 3,38	76	-	0
4,5	-	0	-	0	59,11 ± 4,09	95	71,40 ± 1,95	5
7,0	-	0	-	0	66,86 ± 3,91	43	73,42 ± 2,28	57
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	37,83 ± 2,04	12	51,17 ± 4,78	88	-	0
4,5	-	0	-	0	58,66 ± 3,68	96	70,25 ± 1,71	4
7,0	-	0	-	0	59,01 ± 2,41	72	69,64 ± 2,11	28

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros ± desvio padrão

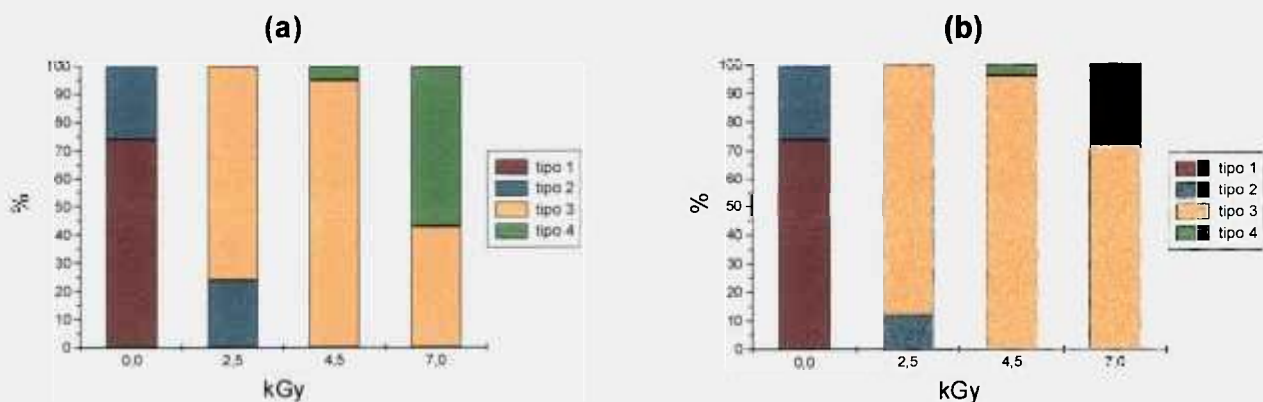


FIGURA 5.10. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 1 dia após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

TABELA 5.8. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 4 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	20,23 ± 1,28	57	34,51 ± 3,66	43	-	0	-	0
Radiação								
gama								
2,5	-	0	-	0	64,98 ± 3,19	100	-	0
4,5	-	0	-	0	66,98 ± 2,67	89	72,73 ± 1,74	11
7,0	-	0	-	0	71,75 ± 2,22	12	82,33 ± 2,69	88
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	-	0	63,92 ± 2,83	100	-	0
4,5	-	0	-	0	63,93 ± 3,73	86	73,07 ± 2,02	14
7,0	-	0	-	0	64,35 ± 3,40	63	72,46 ± 1,76	37

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros ± desvio padrão

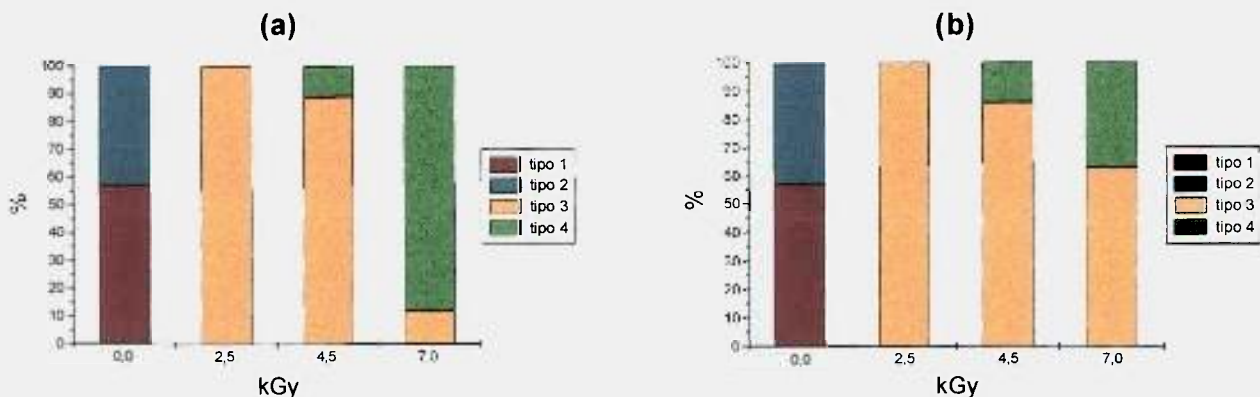


FIGURA 5.11. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 4 dias após irradiação **(a)** radiação gama **(b)** feixe de elétrons

Nas amostras não irradiadas, a ocorrência de cometas tipo 2 foi predominante no 7º dia (93%), a porcentagem do tipo 1 diminuiu a 7% em relação ao 4º dia. Cometas tipo 5 somente foram observados na dose de 7,0 kGy (tabela 5.9).

Após 15 dias, os cometas tipo 1 já não foram observados mas sim, cometas tipo 2 e 3, sendo o primeiro tipo mais freqüente (79%). Além dos tipos 3 e 4, todas as amostras irradiadas mostraram cometas tipo 5 (tabela 5.10).

Diferenças marcantes, quanto à freqüência de tipos de cometas, entre amostras irradiadas e não irradiadas nos dias 7 e 15 são ilustradas nas figuras 5.12 e 5.13 respectivamente.

Portanto, a ocorrência de cometas tipo 1 nas amostras controle de coxão mole bovino resfriado nos dias 1 e 4 após tratamento com a radiação ionizante e, a presença predominante de cometas tipos 2 nos dias 7 e 15 permitiu discriminar nitidamente entre as amostras irradiadas e não irradiadas.

TABELA 5.9. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 7 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4		Tipo 5	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	22,71 ± 1,60	7	42,10 ± 6,35	93	-	0	-	0	-	0
Radiação										
gama										
2,5	-	0	-	0	64,09 ± 2,22	89	72,64 ± 2,01	11	-	0
4,5	-	0	-	0	65,53 ± 1,81	76	74,29 ± 2,44	24	-	0
7,0	-	0	-	0	-	0	82,19 ± 3,66	91	99,56 ± 5,32	9
Feixe de elétrons										
2,5	-	0	-	0	63,87 ± 3,82	92	76,50 ± 3,42	8	-	0
4,5	-	0	-	0	63,94 ± 4,11	68	78,69 ± 3,62	32	-	0
7,0	-	0	-	0	68,63 ± 4,72	27	82,70 ± 1,98	70	97,67 ± 2,52	3

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

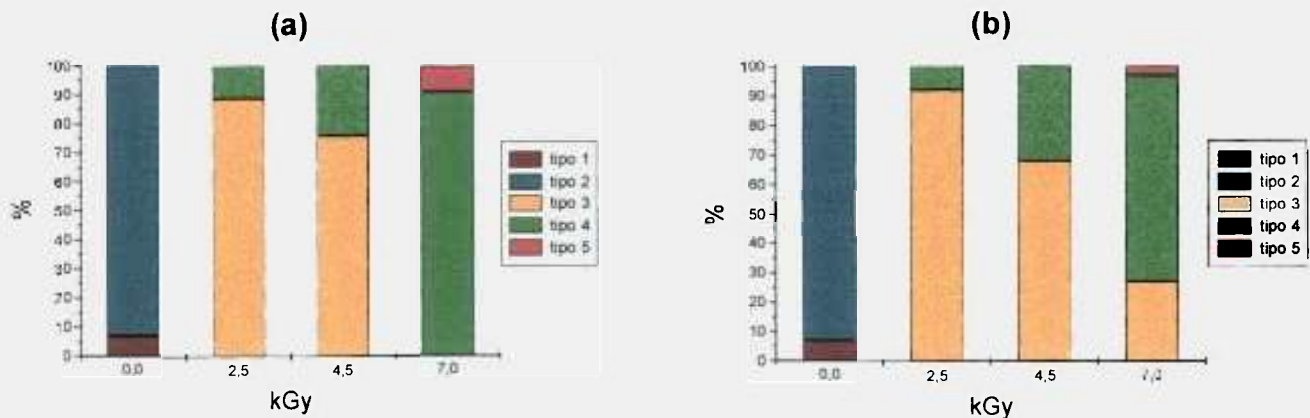


FIGURA 5.12. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 7 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

TABELA 5.10. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras de coxão mole bovino resfriado, 15 dias após irradiação

Dose (kGy)	Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4		Tipo 5	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	55,95 ± 6,86	79	71,86 ± 3,14	21	-	0	-	0
Radiação gama								
2,5	-	0	77,20 ± 3,92	87	85,60 ± 3,24	10	103,67 ± 1,53	3
4,5	-	0	78,04 ± 4,02	23	87,08 ± 3,21	71	103,33 ± 2,94	6
7,0	-	0	-	0	86,74 ± 2,91	84	104,63 ± 2,78	16
Feixe de elétrons								
2,5	-	0	73,04 ± 3,87	83	81,40 ± 3,00	15	90,50 ± 2,12	2
4,5	-	0	73,04 ± 4,09	47	83,16 ± 4,30	51	90,50 ± 0,71	2
7,0	-	0	75,75 ± 2,50	4	84,98 ± 4,68	88	94,50 ± 3,89	8

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

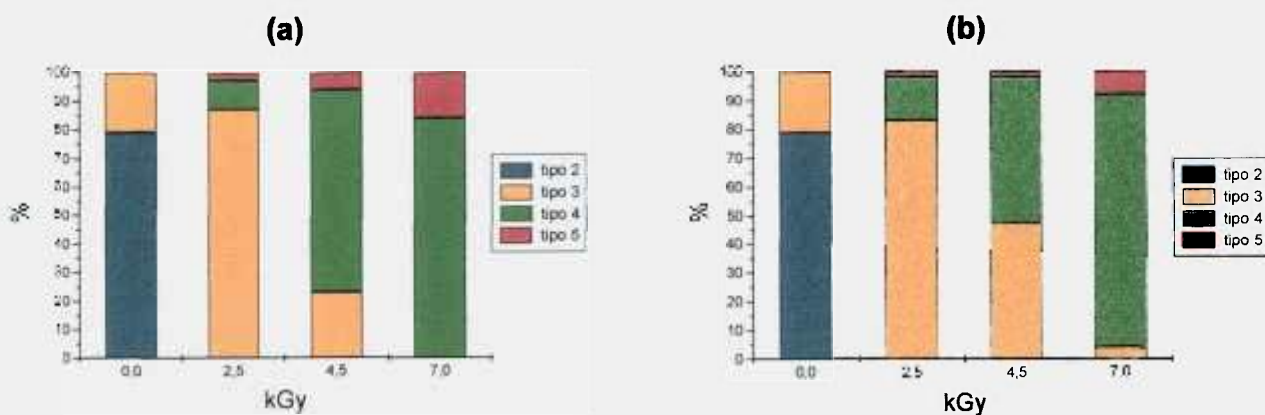


FIGURA 5.13. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, 15 dias após irradiação (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

TABELA 5.11. Distância total de migração do DNA por tempo de estocagem sob refrigeração em amostras irradiadas de coxão mole bovino

Dias após irradiação	Controle	2,5 kGy		4,5 kGy		7,0 kGy	
		Raios gama	Feixe de elétrons	Raios gama	Feixe de elétrons	Raios gama	Feixe de elétrons
1	23,89 ± 5,76	54,19 ± 10,83	49,57 ± 6,29	59,72 ± 4,83	59,12 ± 4,28	70,60 ± 4,48	61,99 ± 5,33
4	26,37 ± 7,56	64,98 ± 3,19	63,92 ± 2,83	67,61 ± 3,15	65,21 ± 4,76	81,06 ± 4,34	67,35 ± 4,88
7	40,74 ± 7,90	65,03 ± 3,47	64,88 ± 5,11	67,63 ± 4,24	68,66 ± 7,96	83,75 ± 6,28	79,35 ± 7,63
15	59,29 ± 9,02	78,83 ± 6,33	74,64 ± 5,28	85,98 ± 6,71	78,55 ± 6,73	89,60 ± 7,19	84,62 ± 5,50

Os resultados são as médias em micrômetros ± desvio padrão, n=100

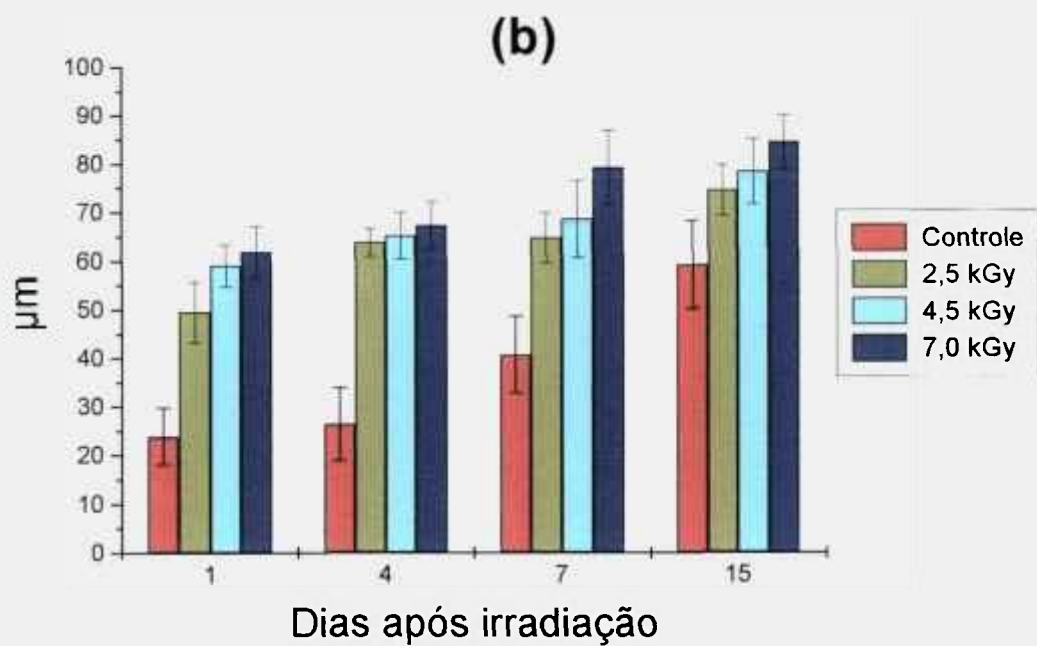
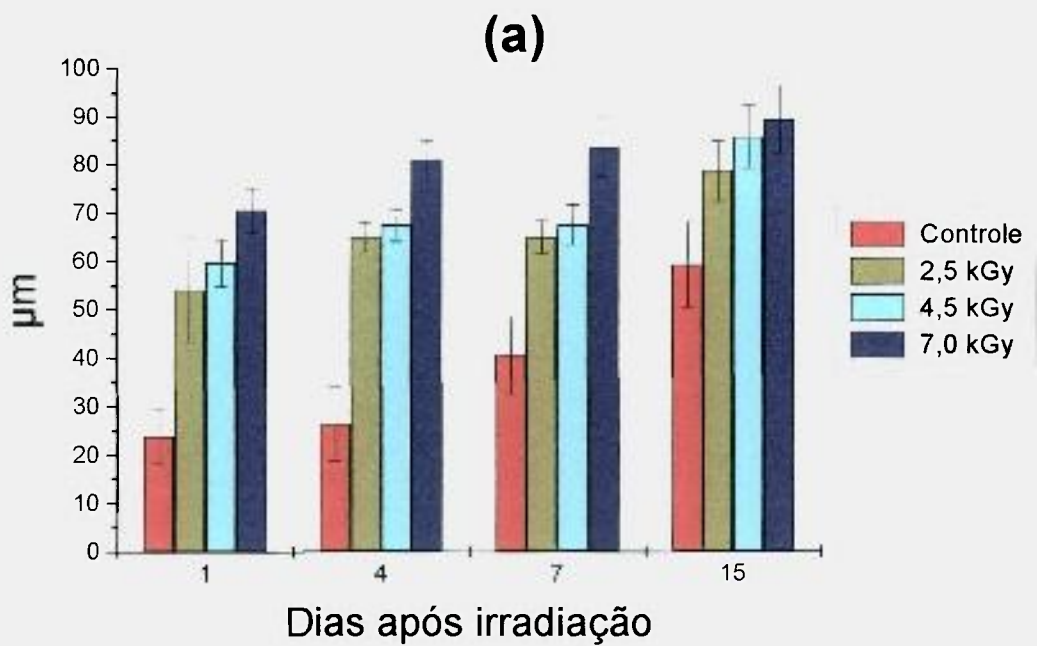


FIGURA 5.14. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de coxão mole bovino resfriado, conforme o tempo de estocagem (a) radiação gama (b) feixe de elétrons

O aumento gradativo das distâncias de migração dos fragmentos de DNA, nas amostras de coxão mole bovino resfriado, foi dependente da dose de radiação. A tabela 5.11 mostra que estas distâncias nas amostras expostas à radiação gama, foram maiores do que as das irradiadas com feixe de elétrons, contudo, as diferenças entre essas distâncias não foram estatisticamente significativas.

Diferenças significativas ($p < 0,01$), quanto aos valores das distâncias de migração do DNA, foram encontradas com o tempo de estocagem tanto com radiação gama como com feixe de elétrons. Estas observações estão expressas na figura 5.14.

As figuras 5.15 e 5.16 apresentam os histogramas de distribuição dos valores das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação de amostras de coxão mole bovino resfriado irradiadas com raios gama e feixe de elétrons respectivamente. Pode-se observar que as amostras controle, apresentaram maior ocorrência de cometas com distâncias de migração do DNA entre 20 e 40 μ m nos dias 1 e 4, entretanto, estes valores estiveram na faixa de 40 a 60 μ m nos dias 7 e 15. Conforme o aumento da dose de radiação e o tempo de estocagem houve uma tendência de as barras dos histogramas se deslocarem para a direita, similar à observada nas amostras de coxão mole bovino congelado.

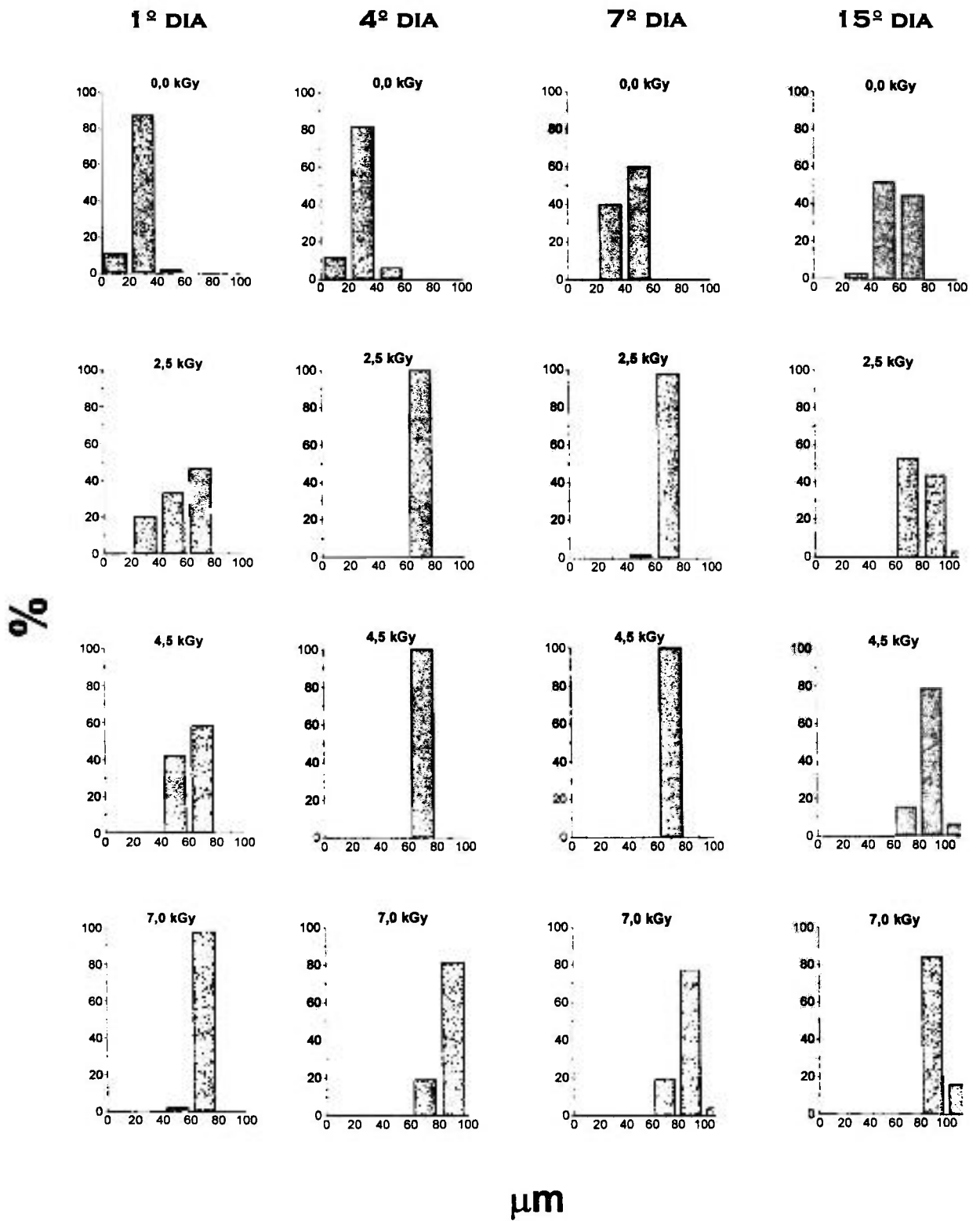


FIGURA 5.15. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino resfriado irradiadas com raios gama

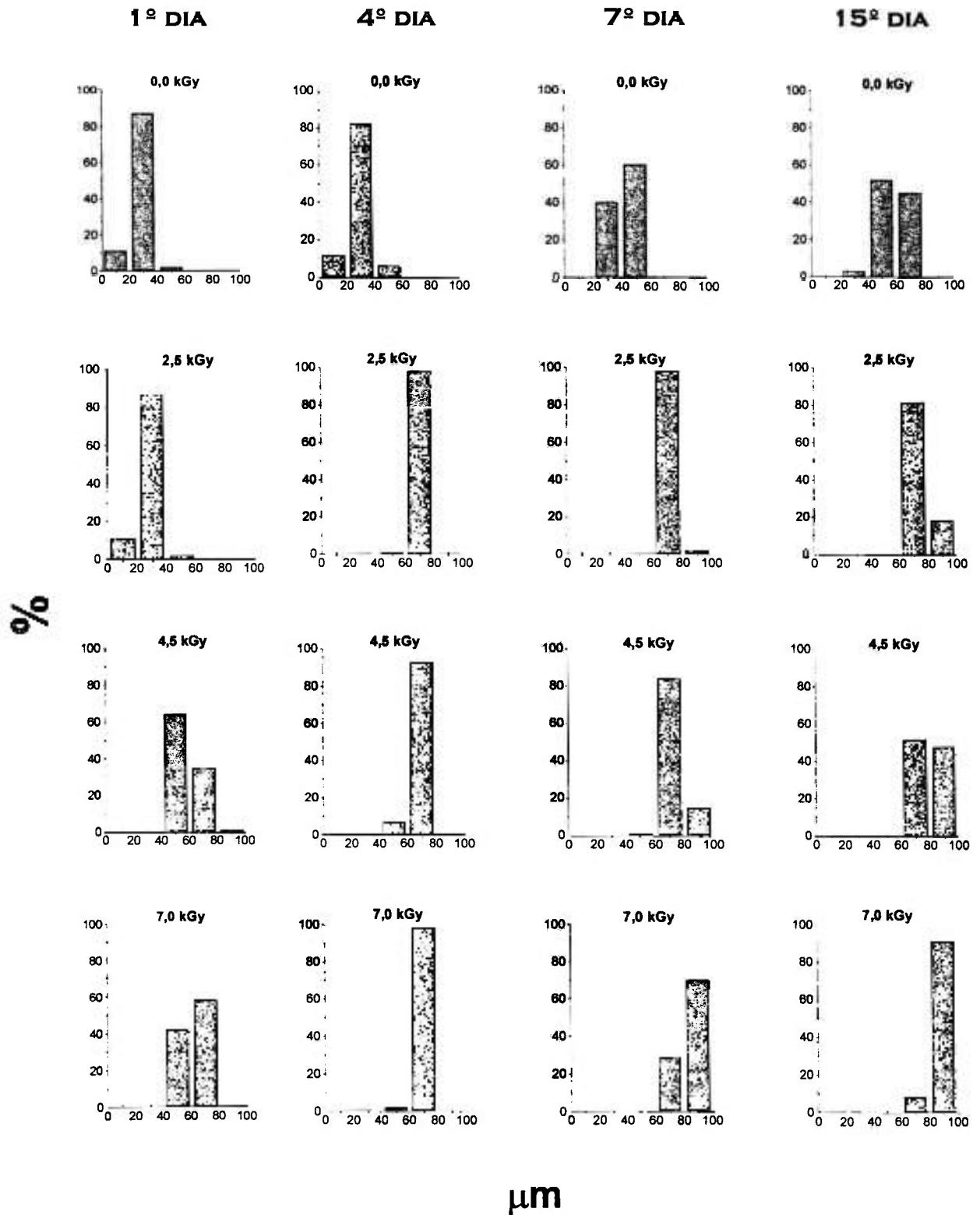


FIGURA 5.16. Histograma de distribuição das distâncias de migração do DNA em função da dose de radiação e o tempo de estocagem das amostras de coxão mole bovino congelado irradiadas com feixe de elétrons

As diferenças entre os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre a distância de migração de DNA, nas amostras de coxão mole bovino congelado ou resfriado, não foram significativas. Além disso, as diferenças das distâncias de migração do DNA entre o controle e as amostras irradiadas, tanto com raios gama como com feixe de elétrons, foram significativas ($p < 0,01$).

O teste do cometa tem sido aplicado na detecção do processamento por irradiação de diversos tipos de carne. Cerda & Koppen (1998) estudaram a fragmentação do DNA em frango resfriado mediante o teste do cometa e observaram que a degradação natural do DNA nas amostras não irradiadas aumentou com o tempo de estocagem, o que foi refletido na forma dos cometas. No 10º dia, a fragmentação do DNA aumentou de maneira pronunciada em comparação com o primeiro dia. Os autores acima mencionados concluíram que o teste do cometa pode ser utilizado como método rápido para verificar o estado higiênico do frango.

No trabalho de Cerda (1998a), amostras irradiadas de frango, carne de porco e salmão, com elétrons de 10MeV e armazenadas a 2°C, puderam ser detectadas mediante a observação dos padrões dos cometas nos dias 1, 7 e 14 após irradiação. Num teste interlaboratorial realizado por Cerda (1998b), com amostras irradiadas de frango e carne de porco congelado, foi feita a estimativa da dose com base à forma dos cometas. Nesse estudo, de um total de 140 amostras avaliadas, 130 foram identificadas corretamente.

Khan & Delincée (1998) conseguiram distinguir trutas irradiadas nas doses 1,0 e 2,0 kGy das não irradiadas após 11 dias armazenadas em estado congelado.

Hambúrgueres não irradiados puderam ser facilmente discriminados de aqueles irradiados, após 9 meses estocados sob congelamento (Delincée, 2001a).

Estudos com carne de boi (Kruszewski *et al.*, 1998; Marín-Huachaca & Villavicencio, 2001b), carnes exóticas - javali, jacaré e capivara (Villavicencio *et al.*, 2000), carne ovina e leporina (Marín-Huachaca *et al.*, 2000a) têm oferecido bons resultados.

Todos estes trabalhos corroboram os resultados obtidos na identificação confiável de coxão mole bovino irradiado mediante a avaliação dos fragmentos de DNA.

5.2 TESTE DE GERMINAÇÃO

5.2.1 Melão

A tabela 5.12 apresenta os valores das porcentagens de germinação, comprimento de caule e de raízes de embriões de melão irradiados tanto com radiação gama como com feixe de elétrons. Pode-se verificar que, no primeiro dia após incubação das amostras tratadas com radiação gama nas doses 0,5 e 0,75 kGy, a porcentagem de germinação atingiu 100% como no controle. No seguinte dia, as amostras irradiadas nas doses de 1,0; 2,0 e 4,0 kGy, germinaram todas. Similares resultados foram obtidos nas amostras irradiadas com o feixe de elétrons com a diferença que na dose de 4,0kGy os embriões não germinaram. O crescimento dos caules e das raízes foi inibido nas amostras expostas aos raios gama como ilustra a foto 5.1. Apenas as raízes das amostras controle apresentaram raízes secundárias a partir do dia 3. Resultados similares foram observados com o feixe de elétrons.

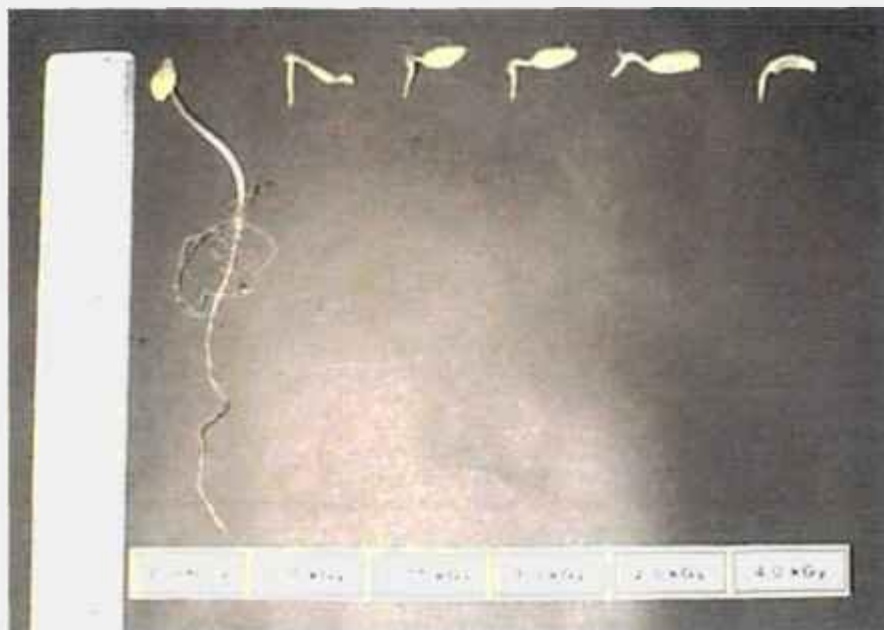


Foto 5.1. Embriões de melão, 4 dias após incubação a 30°C, irradiados com raios gama

TABELA 5.12. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões irradiados de melão

DOSE (kGy)	1º DIA APÓS INCUBAÇÃO			2º DIA APÓS INCUBAÇÃO			3º DIA APÓS INCUBAÇÃO			4º DIA APÓS INCUBAÇÃO		
	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$
Controle	100	0,75 ± 0,45	9,00 ± 1,76	100	4,33 ± 1,15	39,5 ± 6,02	100	12,00 ± 5,34	58,00 ± 8,94	100	22,17 ± 4,80	64,25 ± 11,26
Radiação												
gama												
0,50	100	0	4,75 ± 0,87	100	1,58 ± 0,51	14,08 ± 2,57	100	3,25 ± 0,87	14,58 ± 2,39	100	4,67 ± 1,07	15,17 ± 2,69
0,75	100	0	3,67 ± 1,44	100	1,58 ± 0,67	11,92 ± 1,73	100	2,92 ± 0,90	12,08 ± 1,93	100	4,67 ± 0,99	13,83 ± 2,48
1,0	91,7	0	2,08 ± 1,00	100	1,67 ± 0,65	7,42 ± 1,88	100	3,00 ± 1,13	7,67 ± 1,92	100	4,83 ± 1,12	8,58 ± 1,56
2,0	83,3	0	1,00 ± 0,60	100	0,50 ± 0,52	4,50 ± 0,90	100	1,75 ± 0,75	4,67 ± 0,98	100	3,67 ± 0,65	4,83 ± 1,12
4,0	75	0	0,75 ± 0,45	100	0,92 ± 0,51	2,50 ± 0,52	100	3,58 ± 0,51	2,58 ± 0,51	100	3,67 ± 0,49	3,08 ± 0,67
Feixe de												
elétrons												
0,50	100	0	3,25 ± 1,48	100	1,42 ± 0,67	11,42 ± 4,74	100	3,42 ± 1,16	11,92 ± 4,74	100	5,17 ± 1,70	13,00 ± 2,86
0,75	100	0	2,58 ± 0,79	100	1,17 ± 0,39	7,08 ± 1,56	100	3,17 ± 1,11	7,83 ± 2,25	100	4,75 ± 1,29	8,08 ± 2,19
1,0	100	0	1,75 ± 0,45	100	0,67 ± 0,65	5,17 ± 0,58	100	2,58 ± 0,79	5,33 ± 0,98	100	4,17 ± 0,84	6,00 ± 1,04
2,0	41,7	0	0,42 ± 0,51	100	0,75 ± 0,75	2,00 ± 0	100	2,92 ± 0,9	1,92 ± 0,29	100	3,17 ± 0,58	2,00 ± 0
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento do caule em milímetros ± desvio padrão; $\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento da raiz em milímetros ± desvio padrão; n=12

%G : porcentagem de germinação

As diferenças entre o controle e as amostras irradiadas foram significativas apenas com aquela irradiada na dose de 4,0 kGy, assim sendo, a porcentagem de germinação não foi um bom parâmetro para discriminar melões irradiados dos não irradiados.

As análises estatísticas mostraram que não houve diferenças entre os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre o comprimento do caule e da raiz. Diferenças marcantes no crescimento do caule foram observados a partir do 3º dia após incubação (figura 5.17). Foram obtidas diferenças significativas ($p < 0,01$) do comprimento do caule entre o controle e as amostras expostas à radiação gama, porém, com o feixe de elétrons, estas diferenças foram observadas apenas nas amostras irradiadas nas doses 1,0; 2,0 e 4,0 kGy.

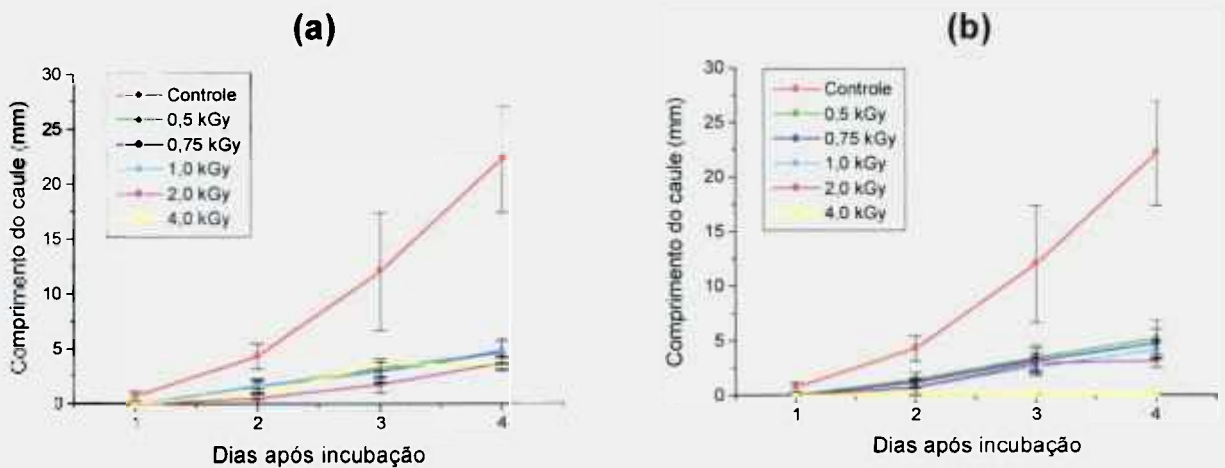


FIGURA 5.17. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de embriões de melão
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Diferenças nítidas, quanto ao crescimento da raiz, entre o controle e as amostras irradiadas foram observadas a partir do 2º dia como ilustra a figura 5.18.

As análises estatísticas mostraram que houve diferenças significativas ($p < 0,01$) no comprimento da raiz entre o controle e as amostras irradiadas tanto com radiação gama quanto com feixe de elétrons. Com estes dados e em virtude de o crescimento das raízes, nos primeiros dias de incubação, ser mais rápido do que o caule, o parâmetro comprimento da raiz foi considerado melhor parâmetro na discriminação de melões irradiados e não irradiados.

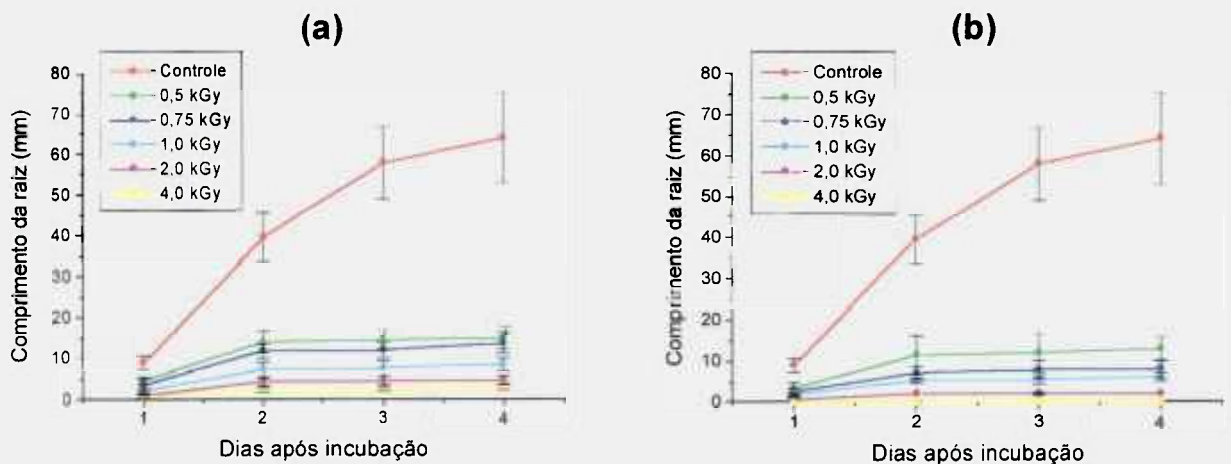


FIGURA 5.18. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de embriões de melão
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

5.2.2 Melancia

Na tabela 5.13 pode-se notar diferenças nas porcentagens de germinação entre o controle e as amostras irradiadas, porém não são tão marcantes. De acordo às análises estatísticas não houve diferenças nas porcentagens de germinação dos embriões de melancia não irradiados em relação com os tratados com raios gama nas doses 0,5 e 0,75 kGy, estas diferenças foram significativas ($p < 0,01$) apenas com a amostra irradiada na dose de 4,0 kGy. No entanto, o controle apresentou diferenças

significativas ($p < 0,01$) em relação às amostras irradiadas com feixe de elétrons nas doses de 2,0 e 4,0 kGy. Neste caso, a porcentagem de germinação não foi um parâmetro útil na identificação confiável de melancias irradiadas e não irradiadas. A foto 5.2 mostra diferenças do crescimento de caules e de raízes dos embriões de melancias tratadas com radiação gama. Apenas o controle apresentou raízes secundárias a partir do 4º dia.

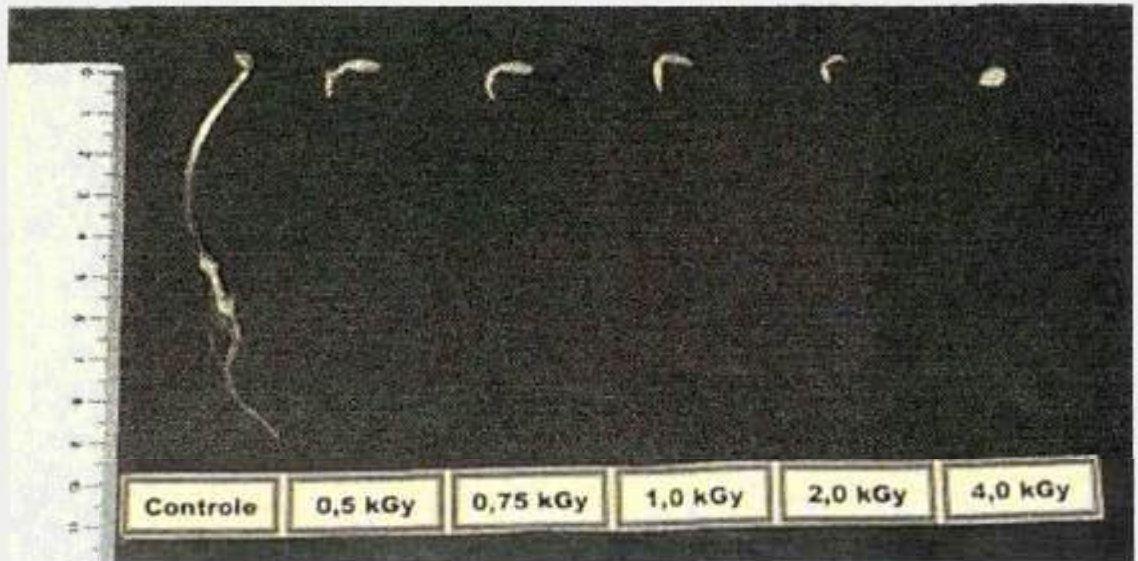


Foto 5.2. Embriões de melancia, 4 dias após incubação a 32°C, irradiados com raios gama

As diferenças entre os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre o crescimento de caules e de raízes dos embriões de melancia não resultaram ser estatisticamente significativas.

Diferenças no comprimento de caule entre o controle e as amostras irradiadas tanto com radiação gama quanto com feixe de elétrons foram significativas ($p < 0,01$). Na figura 5.19, pode-se observar claras diferenças entre melancias irradiadas e não irradiadas a partir do 2º e 3º dia após incubação com o tratamento com radiação gama e com feixe de elétrons respectivamente.

TABELA 5.13. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões irradiados de melancia

DOSE (kGy)	1º DIA APÓS INCUBAÇÃO			2º DIA APÓS INCUBAÇÃO			3º DIA APÓS INCUBAÇÃO			4º DIA APÓS INCUBAÇÃO		
	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$
Controle	83,3	0,92 ± 0,90	3,00 ± 2,34	100	1,92 ± 1,44	6,33 ± 3,42	100	3,08 ± 1,73	15,42 ± 8,03	100	5,42 ± 3,82	28,75 ± 13,75
Radiação												
gama												
0,50	83,3	0,17 ± 0,39	2,50 ± 1,31	100	1,00 ± 0,60	5,00 ± 2,04	100	1,50 ± 1,00	5,33 ± 2,10	100	1,92 ± 0,51	6,00 ± 2,17
0,75	83,3	0	2,00 ± 1,21	100	1,08 ± 0,67	4,83 ± 1,34	100	1,67 ± 0,89	5,33 ± 1,67	100	1,83 ± 0,94	5,92 ± 1,78
1,0	16,7	0	0,33 ± 0,89	92	0,50 ± 0,67	4,58 ± 1,93	92	0,58 ± 0,67	5,50 ± 2,02	92	1,00 ± 0,74	5,83 ± 2,08
2,0	0	0	0	92	0	2,17 ± 0,94	100	0,17 ± 0,39	3,42 ± 1,08	100	0,25 ± 0,45	4,00 ± 1,13
4,0	0	0	0	25	0	0,25 ± 0,45	33,3	0	0,75 ± 1,22	33,3	0	0,83 ± 1,27
Feixe de elétrons												
0,50	58,3	0	0,92 ± 0,90	83,3	0,42 ± 0,51	1,83 ± 1,34	100	0,58 ± 0,51	5,50 ± 1,73	100	1,00 ± 0,60	6,50 ± 2,15
0,75	41,7	0	0,67 ± 0,89	66,7	0,17 ± 0,39	1,83 ± 1,75	91,7	0,67 ± 0,49	5,42 ± 2,43	91,7	0,92 ± 0,51	6,17 ± 2,52
1,0	50	0	0,67 ± 0,78	75	0	1,75 ± 1,29	91,7	0,50 ± 0,52	4,33 ± 1,72	100	0,92 ± 0,51	6,00 ± 1,76
2,0	8,3	0	0,08 ± 0,29	41,7	0	0,83 ± 1,19	75	0,17 ± 0,39	2,08 ± 1,62	91,7	0,25 ± 0,45	3,25 ± 1,76
4,0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0,17 ± 0,39	25	0	0,33 ± 0,65

$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento do caule em milímetros ± desvio padrão; $\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento da raiz em milímetros ± desvio padrão; n=12

%G : porcentagem de germinação

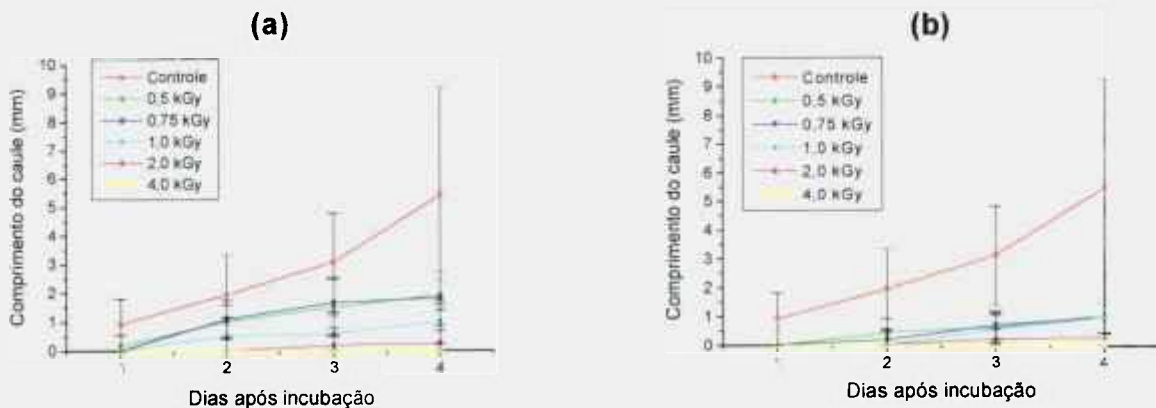


FIGURA 5.19. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de embriões de melancia
(a) radiação gama **(b)** feixe de elétrons

Com relação ao crescimento da raiz (figura 5.20), foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$), entre o controle e as amostras expostas aos raios gama, apenas com as doses de 2,0 e 4,0 kGy. No entanto, estas diferenças foram significativas com todas as amostras irradiadas com feixe de elétrons. Pelo fato de as raízes apresentarem um crescimento mais rápido do que os caules, o parâmetro comprimento da raiz permitiu discriminar mais claramente melancias irradiadas das não irradiadas a partir do 3º dia após incubação.

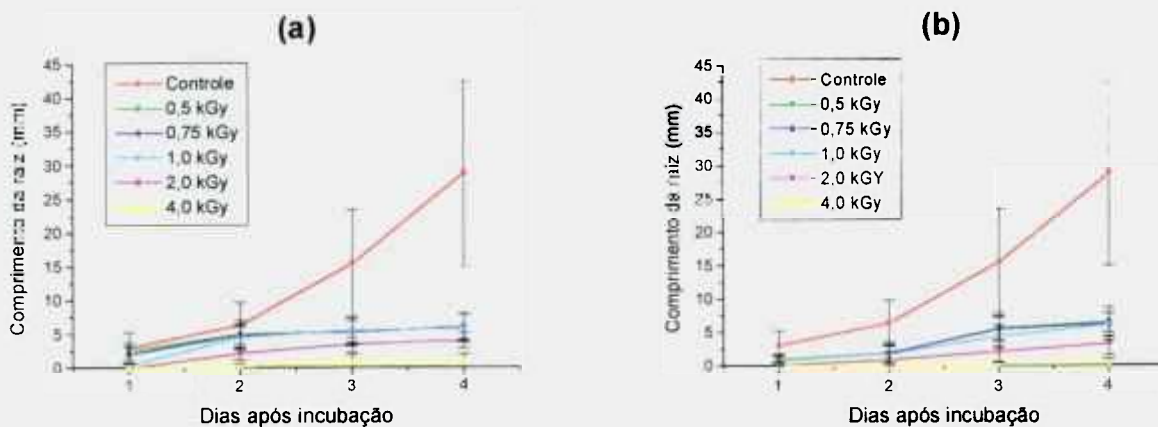


FIGURA 5.20. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de embriões de melancia
(a) radiação gama **(b)** feixe de elétrons

5.2.3 Maçã

Os embriões controle de maçã apresentaram porcentagens de germinação acima do que as irradiadas e atingiram 100% de germinação no 7º dia após incubação (tabela 5.14). As diferenças nas porcentagens de germinação entre o controle e as amostras tratadas tanto com radiação gama como com feixe de elétrons mostraram ser significativas ($p < 0,01$). No controle, o aparecimento de folha foi observado no 4º dia. Diferenças entre os embriões de maçã irradiados e não irradiados são ilustradas na foto 5.3.

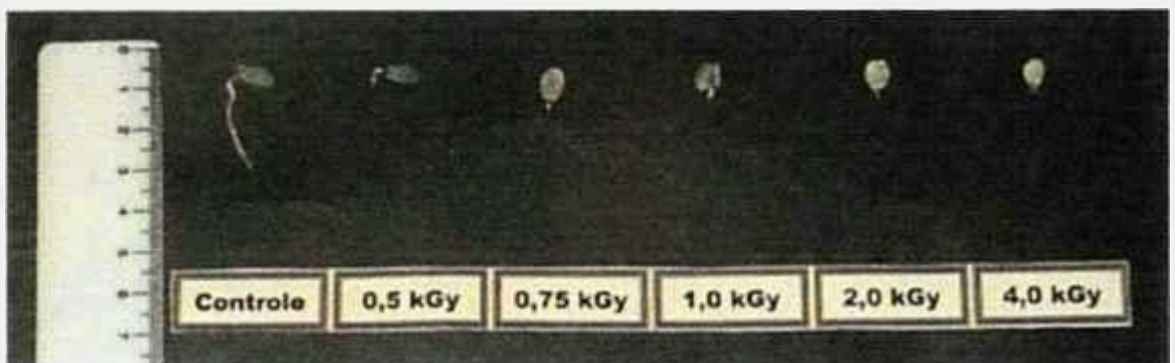


Foto 5.3. Embriões de maçã, 7 dias após incubação a 30°C, irradiados com raios gama

No teste de germinação realizado por Kawamura *et al.* (1995), nas doses a partir de 0,15 kGy, o crescimento de caules e de raízes dos embriões de maçã tratados com radiação gama, foi bem menor do que o controle. Os autores determinaram que se a porcentagem de germinação for 50% ou mais dentro de 3 dias, as maçãs são identificadas como não irradiadas; caso contrário, são identificadas como irradiadas.

Conforme aos resultados obtidos neste trabalho, no 3º dia após irradiação, os embriões não irradiados de maçã atingiram 60% de germinação, o que concorda com os dados de Kawamura *et al.* (1995).

TABELA 5.14. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões irradiados de maçã

DOSE (kGy)	2º DIA APÓS INCUBAÇÃO			3º DIA APÓS INCUBAÇÃO			4º DIA APÓS INCUBAÇÃO			7º DIA APÓS INCUBAÇÃO		
	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$
Controle	40	0,40 ± 0,70	0,40 ± 0,52	60	2,10 ± 1,85	1,20 ± 1,23	80	3,50 ± 2,51	2,0 ± 2,41	100	5,10 ± 2,77	6,60 ± 3,72
Radiação												
gama												
0,50	30	0,10 ± 0,32	0,30 ± 0,48	50	0,70 ± 0,95	0,70 ± 0,82	50	1,20 ± 1,32	1,10 ± 1,29	50	1,60 ± 1,78	1,30 ± 1,57
0,75	30	0,20 ± 0,42	0,30 ± 0,48	40	0,50 ± 0,85	0,40 ± 0,52	50	1,20 ± 1,62	0,60 ± 0,70	50	1,80 ± 2,10	0,80 ± 1,03
1,0	0	0	0	20	0,10 ± 0,32	0,20 ± 0,42	30	0,50 ± 0,85	0,40 ± 0,70	40	1,50 ± 2,01	0,80 ± 1,03
2,0	0	0	0	30	0,10 ± 0,32	0,30 ± 0,48	30	0,50 ± 0,97	0,30 ± 0,48	40	1,00 ± 1,41	0,50 ± 0,71
4,0	0	0	0	0	0	0	20	0,10 ± 0,32	0,20 ± 0,42	20	0,30 ± 0,67	0,20 ± 0,42
Feixe de												
elétrons												
0,50	20	0,10 ± 0,32	0,20 ± 0,42	30	0,50 ± 0,85	0,30 ± 0,48	30	0,60 ± 1,07	0,30 ± 0,48	40	1,20 ± 1,75	0,50 ± 0,71
0,75	0	0	0	20	0,10 ± 0,32	0,20 ± 0,42	20	0,30 ± 0,67	0,20 ± 0,42	40	0,90 ± 1,20	0,50 ± 0,71
1,0	0	0	0	10	0,10 ± 0,32	0,10 ± 0,32	20	0,30 ± 0,67	0,20 ± 0,42	30	0,70 ± 1,16	0,40 ± 0,70
2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,20 ± 0,42	20	0,30 ± 0,67	0,30 ± 0,67
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento do caule em milímetros ± desvio padrão; $\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento da raiz em milímetros ± desvio padrão; n=10

%G : porcentagem de germinação

Os comprimentos dos caules e das raízes das amostras de maçã tratadas com a radiação ionizante, foram bem menores dos que o controle o que permitiu distinguir a amostra controle das irradiadas já desde o 3º dia após incubação como ilustrado nas figuras 5.21 e 5.22. As análises estatísticas mostraram que houve diferenças ($p < 0,01$) no comprimento do caule entre o controle e as amostras irradiadas tanto com radiação gama quanto com feixe de elétrons. Diferenças no comprimento da raiz foram observadas entre a amostra controle e as irradiadas com raios gama apenas nas doses de 4,0 kGy e, com feixe de elétrons nas doses de 2,0 e 4,0 kGy.

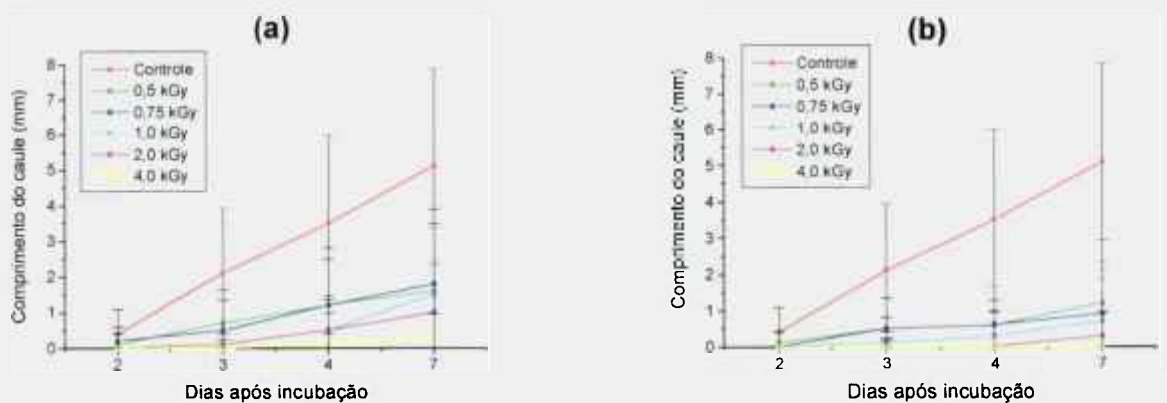


FIGURA 5.21. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de embriões de maçã
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

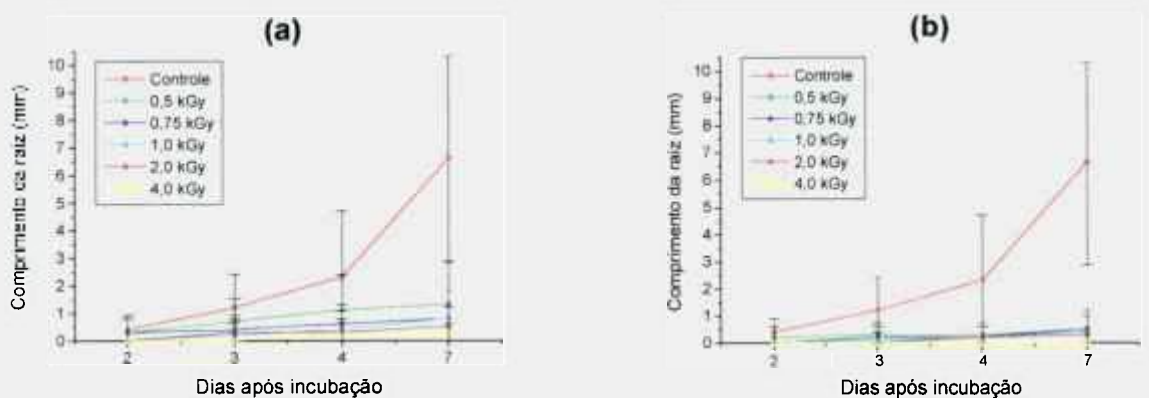


FIGURA 5.22. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de embriões de maçã
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

5.2.4 Laranja

Os embriões de laranja mostraram ser bastante radiosensíveis porque nenhum dos irradiados germinou. Assim, o crescimento dos caules e das raízes foi inibido totalmente como ilustra a foto 5.4. A tabela 5.27 mostra que já a partir do 2º dia após incubação pode-se discernir entre o controle e as amostras irradiadas mediante a avaliação da porcentagem de germinação. No entanto, com a avaliação do crescimento do caule, este discernimento apenas foi possível a partir do 4º dia e, com a avaliação do crescimento das raízes, a partir do 3º dia. Em consequência, a porcentagem de germinação foi um parâmetro útil na discriminação de laranjas irradiadas das não irradiadas.

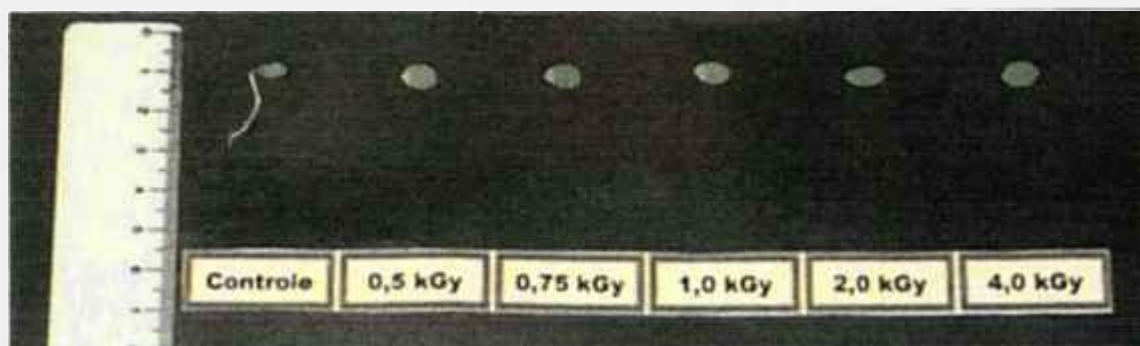


Foto 5.4. Embriões de laranja, 7 dias após incubação a 35°C, irradiados com raios gama

No trabalho de Kawamura *et al* (1989), os embriões de laranja e de limão, expostos à radiação gama, com doses a partir de 0,3 kGy, não germinaram. Nesse estudo foi concluído que quando a porcentagem de germinação for maior a 50% as laranjas são identificadas como não irradiadas, se não, são consideradas irradiadas.

No presente trabalho, os embriões controle de laranja apresentaram porcentagens de germinação superiores a 50%, isto é 93%, a partir do 3º dia em doses de pelo menos 0,5 kGy. Estes resultados concordam com os de Kawamura *et al* (1989).

TABELA 5.15. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de embriões de laranja irradiados com radiação gama

DOSE (kGy)	2º DIA APÓS INCUBAÇÃO			3º DIA APÓS INCUBAÇÃO			4º DIA APÓS INCUBAÇÃO			7º DIA APÓS INCUBAÇÃO		
	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$
Controle	40	0	0,53 ± 0,74	93	0	1,80 ± 0,86	100	1,07 ± 0,26	3,67 ± 1,59	100	1,27 ± 0,70	6,07 ± 2,02
0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento do caule em milímetros ± desvio padrão; $\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento da raiz em milímetros ± desvio padrão; n=15

%G : porcentagem de germinação

5.2.5 Tomate

A foto 5.5 ilustra as diferenças do crescimento de caules e de raízes de caroços irradiados de tomate. Quanto à porcentagem de germinação, a tabela 5.16 mostra diferenças notáveis nos dias 2 e 3 após incubação entre as amostras controle e as expostas à radiação gama enquanto que com o tratamento com feixe de elétrons estas diferenças foram observadas somente no 2º dia. Não foi encontrada diferença significativa na porcentagem de germinação entre o controle e as amostras irradiadas exceto na dose de 4,0 kGy. Assim sendo, a porcentagem de germinação não foi um parâmetro eficaz na detecção de tomates irradiados e não irradiados.

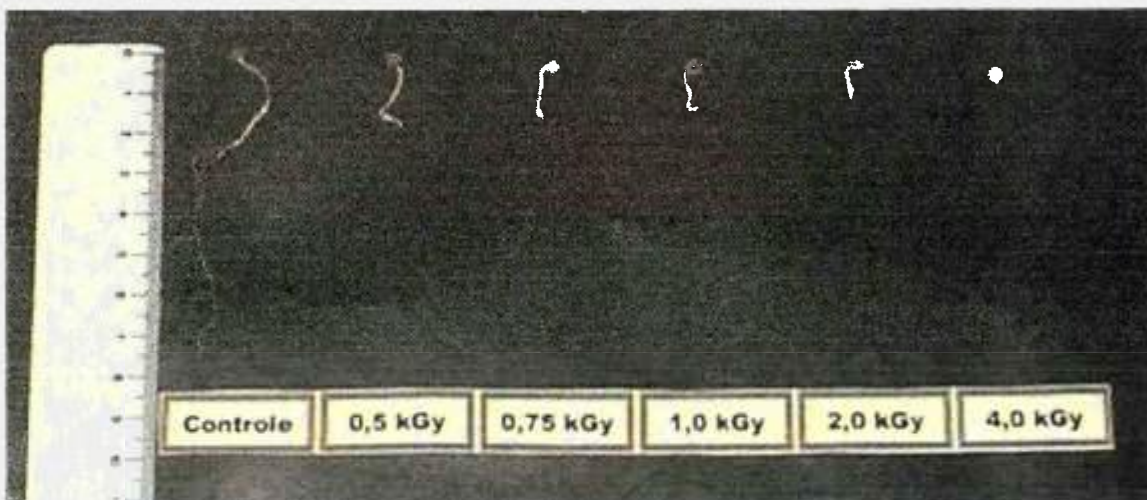


Foto 5.5. Caroços de tomate, 7 dias após incubação a 32°C, irradiados com raios gama

Não houve diferenças significativas entre os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre o crescimento do caule e da raiz. Com a avaliação do crescimento dos caules a discriminação das amostras controle das irradiadas foi possível já desde o 3º dia após incubação enquanto que com a avaliação do crescimento das raízes esta discriminação foi possível a partir do 2º dia como mostram as figuras 5.23 e 5.24 respectivamente.

TABELA 5.16. Porcentagem de germinação e comprimento do caule e da raiz de caroços irradiadas de tomate

DOSE (kGy)	2° DIA APÓS INCUBAÇÃO			3° DIA APÓS INCUBAÇÃO			4° DIA APÓS INCUBAÇÃO			7° DIA APÓS INCUBAÇÃO		
	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$	%G	$\mu_{\text{caule}} \pm \sigma$	$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$
Controle	35	0,85 ± 1,57	3,15 ± 5,42	50	3,25 ± 5,34	6,10 ± 8,39	70	6,90 ± 9,45	8,30 ± 10,16	100	12,1 ± 14,66	16,65 ± 17,05
Radiação												
gama												
0,50	0	0	0	10	0,10 ± 0,31	0,35 ± 1,09	75	1,80 ± 1,36	2,20 ± 1,44	80	3,55 ± 2,68	2,35 ± 1,39
0,75	0	0	0	20	0,15 ± 0,37	0,40 ± 1,14	70	1,85 ± 1,50	2,20 ± 1,79	85	3,80 ± 2,46	2,55 ± 1,23
1,0	0	0	0	25	0,20 ± 0,41	0,50 ± 1,00	70	1,95 ± 1,88	2,10 ± 1,62	75	4,55 ± 3,19	2,00 ± 1,30
2,0	0	0	0	20	0,10 ± 0,31	0,20 ± 0,41	60	1,35 ± 1,27	1,45 ± 1,32	80	3,25 ± 2,45	1,70 ± 0,98
4,0	0	0	0	0	0	0	25	0,35 ± 0,67	0,35 ± 0,67	30	1,05 ± 1,73	0,55 ± 0,89
Feixe de elétrons												
0,50	0	0	0	35	0,10 ± 0,31	1,05 ± 1,90	70	1,35 ± 1,42	5,15 ± 4,72	90	7,30 ± 4,46	12,00 ± 6,00
0,75	0	0	0	45	0,20 ± 0,41	1,15 ± 1,84	70	1,40 ± 1,64	4,20 ± 3,81	90	7,25 ± 5,01	12,10 ± 6,94
1,0	0	0	0	40	0,05 ± 0,22	0,75 ± 1,07	55	0,65 ± 0,99	2,05 ± 2,37	90	3,05 ± 2,19	5,20 ± 2,78
2,0	0	0	0	10	0,05 ± 0,22	0,25 ± 0,91	55	0,40 ± 0,75	1,00 ± 1,08	85	3,40 ± 2,37	2,05 ± 1,10
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento do caule em milímetros ± desvio padrão; $\mu_{\text{raiz}} \pm \sigma$: média de comprimento da raiz em milímetros ± desvio padrão; n=20

%G : porcentagem de germinação

As diferenças nos comprimentos do caule e de raiz entre o controle e as amostras expostas à radiação gama foram significativas ($p < 0,01$). No entanto, com o feixe de elétrons, estas diferenças foram observadas somente nas doses de 1,0; 2,0 e 4,0 kGy.

O crescimento das raízes foi levemente mais rápido do que os caules, assim sendo, o comprimento da raiz foi considerado melhor parâmetro para distinguir tomates irradiados dos não irradiados.

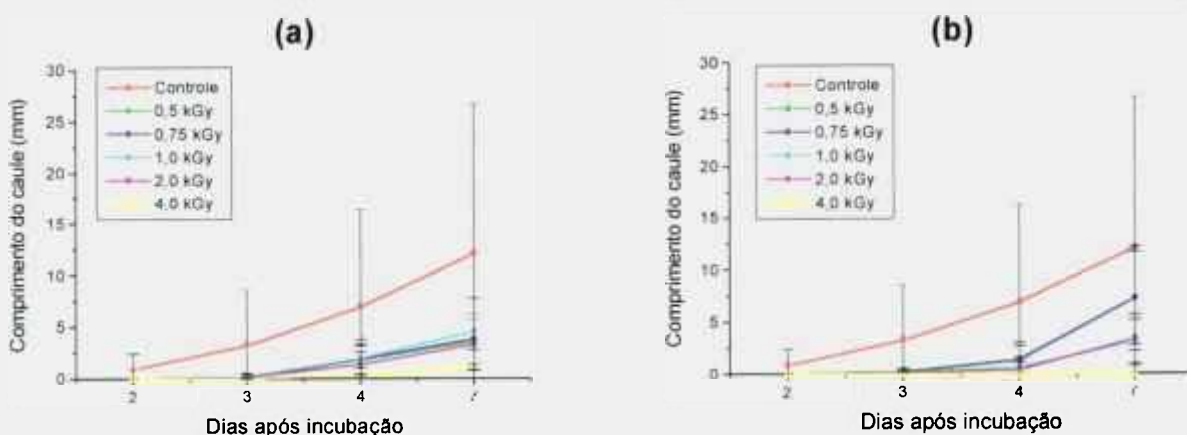


FIGURA 5.23. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento do caule de caroços de tomate
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

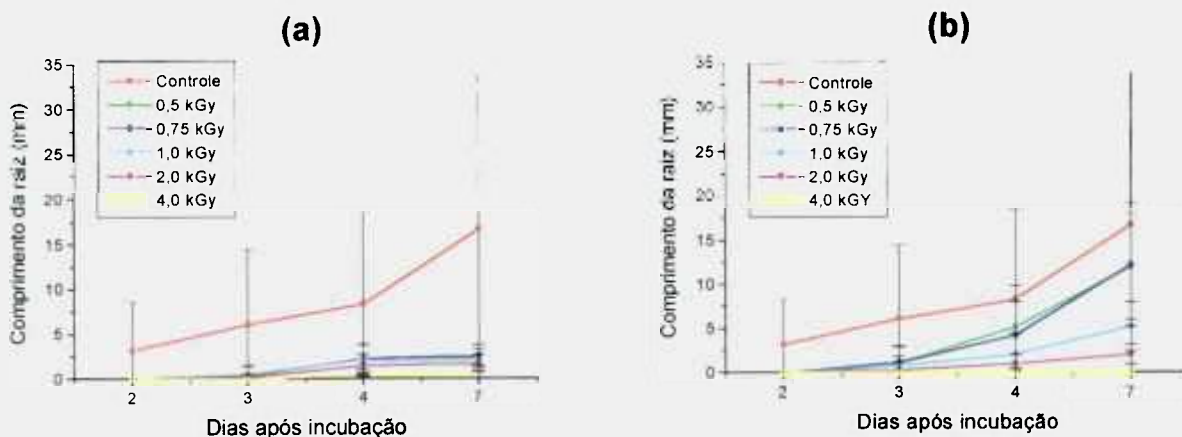


FIGURA 5.24. Efeito da radiação ionizante sobre o crescimento da raiz de caroços de tomate
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Nos frutos avaliados, os parâmetros comprimento de caule e comprimento de raiz apresentaram altas variabilidades principalmente nas amostras controle. Os desvios padrão dos valores de comprimento de caule e de raiz foram maiores com o tempo de incubação dos embriões e dos caroços.

Similar às pesquisas anteriores, o teste de germinação resultou ser eficaz na detecção de frutos irradiados avaliados neste trabalho.

Conforme a literatura, a inibição da germinação de sementes tem sido usada também para identificar grãos de cereais irradiados – arroz, amendoim, milho, e legumes (Qiongying *et al.*, 1993). A elongação de raízes e caules de grãos em germinação foi inibida em arroz (Kawamura, 1992a) e trigo (Kawamura *et al.*, 1992b; Zhu, 1993; Barros *et al.*, 2001). No entanto, esta elongação pode ser retardada por outros fatores tais como alta temperatura, alta umidade, períodos longos de armazenamento e contaminação (Kawamura *et al.*, 1996b).

Kawamura (1992a) reportou que se o comprimento da raiz dos grãos de arroz incubados a 30°C era de 10 mm ou mais dentro de 3 dias, o arroz era identificado como não irradiado. A dose limite de detecção foi de 0,15 kGy.

No caso de trigo, Kawamura (1992b) reportou que, se o comprimento da raiz era de 20 mm ou mais dentro de 4 dias, o trigo era identificado como não irradiado. As doses limites de detecção foram de 0,5 kGy e 1,0 kGy.

A germinação dos caroços de *grapefruits* foi afetada por doses tão baixas como 50 Gy (Uchiyama *et al.*, 1989), porém, o teste precisou 6 a 14 dias de incubação. O tempo requerido para este teste foi melhorado consideravelmente (2 a 4 dias) com a remoção da

casca e incubação dos embriões (Kawamura *et al.*, 1989a). Nessas condições, a porcentagem de germinação foi melhor parâmetro para discriminar entre *grapefruits* não irradiados e irradiados a 0,15 kGy ou mais. Quando a porcentagem de germinação era de 50% ou mais dentro de 4 dias, o *grapefruit* era identificado como não irradiado. Quando era menor a 50% após 4 dias, o *grapefruit* era identificado como irradiado. A dose limite de detecção foi de 0,15 kGy (Kawamura, 1989a).

Embriões de cereja demoraram 7 dias para atingir 50% de germinação e, para diminuir esse tempo, foram utilizados hormônios vegetais para estimular a germinação. Dessa maneira, os embriões de cereja foram incubados com 10 μ M *benzyladenine*. Quando a porcentagem de germinação era 50% ou mais dentro de 4 dias as cerejas foram identificadas como não irradiadas, sendo a dose limite de detecção de 0,15 kGy (Kawamura, 1995).

A identificação de duas variedades de feijão irradiado, *Phaseolus vulgaris* L., var. carioca e *Vigna unguiculata* (L.) Walp, var. macaçar, foi descrita por Villavicencio *et al* (1997b). O teste de germinação foi realizado logo após a irradiação e após 6 meses de armazenamento, sendo o tempo de incubação de 3 dias. O crescimento de brotos e de raízes dos feijões irradiados foi marcadamente inibido em doses superiores a 1,0 kGy. A variedade carioca mostrou maior sensibilidade do que a variedade macaçar.

5.3 TESTE DO COMETA EM FRUTOS

Neste teste, as diferentes formas de cometas observadas foram classificadas visualmente da mesma maneira como no caso das amostras de coxão mole bovino.

5.3.1 Melão

A tabela 5.17 mostra os valores das distâncias de migração dos fragmentos de DNA e das freqüências de tipos de cometa em função da dose de radiação de amostras de melão. No controle, pode-se notar a presença de cometas tipo 1 e 2, o primeiro tipo em maior porcentagem (79%).

TABELA 5.17. Distância de migração do DNA e freqüência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melão

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	12,86 ± 1,94	79	21,76 ± 1,48	21	-	0	-	0
Radiação								
gama								
0,5	-	0	26,06 ± 2,62	100	-	0	-	0
0,75	-	0	26,41 ± 2,83	100	-	0	-	0
1,0	-	0	28,46 ± 3,00	100	-	0	-	0
2,0	-	0	36,83 ± 3,00	66	43,71 ± 3,43	34	-	0
4,0	-	0	37,86 ± 3,64	70	42,50 ± 2,87	30	-	0
Feixe de elétrons								
0,5	-	0	27,18 ± 2,67	100	-	0	-	0
0,75	-	0	27,03 ± 2,26	100	-	0	-	0
1,0	-	0	33,41 ± 2,72	66	40,94 ± 2,37	34	-	0
2,0	-	0	35,26 ± 3,66	35	42,57 ± 2,12	65	-	0
4,0	-	0	-	0	42,25 ± 2,49	32	47,26 ± 1,82	68

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros ± desvio padrão

Mediante a avaliação das freqüências de tipos de cometa pode-se discernir claramente as amostras controle das irradiadas como pode se verificar na figura 5.25.

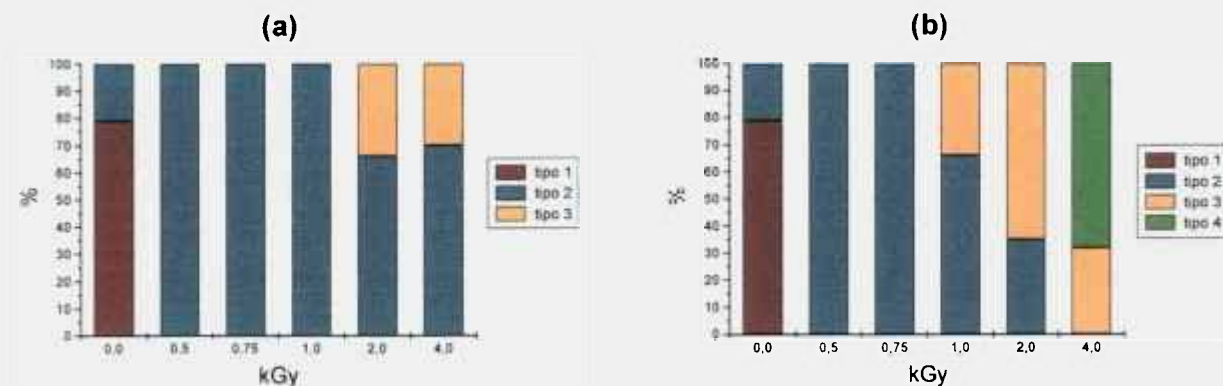


FIGURA 5.25. Freqüência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melão
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Os valores das distâncias totais de migração do DNA nas amostras de melão são apresentados na tabela 5.18. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre a distância de migração do DNA. Foi encontrada diferença significativa ($p < 0,01$) entre a amostra controle de melão em relação às irradiadas.

TABELA 5.18. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de melão

Dose (kGy)	Radiação gama	Feixe de elétrons
Controle	14,73 ± 4,08	14,73 ± 4,08
0,5	26,06 ± 2,62	27,18 ± 2,67
0,75	26,41 ± 2,83	27,03 ± 2,26
1,0	28,46 ± 3,00	35,97 ± 4,43
2,0	39,17 ± 4,53	40,01 ± 4,45
4,0	40,06 ± 4,80	45,64 ± 3,09

Os resultados são as médias ± desvio padrão, n=100

5.3.2 Melancia

A tabela 5.19 mostra os valores das distâncias de migração do DNA e das frequências de tipos de cometa em função da dose de radiação de amostras de melancia. Pode-se observar que estes valores foram bem similares até a dose de 2,0 kGy entre as amostras tratadas com radiação gama e com feixe de elétrons.

TABELA 5.19. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melancia

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	13,09 ± 1,47	65	24,46 ± 3,29	35	-	0	-	0
Radiação								
gama								
0,5	13,44 ± 1,76	18	24,63 ± 2,26	82	-	0	-	0
0,75	13,30 ± 1,34	10	25,49 ± 2,52	90	-	0	-	0
1,0	-	0	27,67 ± 2,94	100	-	0	-	0
2,0	-	0	28,42 ± 3,24	100	-	0	-	0
4,0	-	0	28,56 ± 3,45	18	42,7 ± 2,81	82	-	0
Feixe de								
elétrons								
0,5	13,95 ± 1,81	42	24,72 ± 2,95	58	-	0	-	0
0,75	13,42 ± 1,44	12	25,01 ± 2,93	88	-	0	-	0
1,0	0	0	27,24 ± 4,55	100	-	0	-	0
2,0	0	0	27,99 ± 3,92	100	-	0	-	0
4,0	0	0	-	0	49,73 ± 3,50	73	55,48 ± 2,74	27

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros ± desvio padrão

Embora os cometas tipo 1 terem sido observados nas doses 0,5 e 0,75 kGy, a sua porcentagem na amostra controle foi maior (65%), como ilustrado na figura 5.26, desta forma foi possível discriminar amostras de melancia irradiadas e não irradiadas.

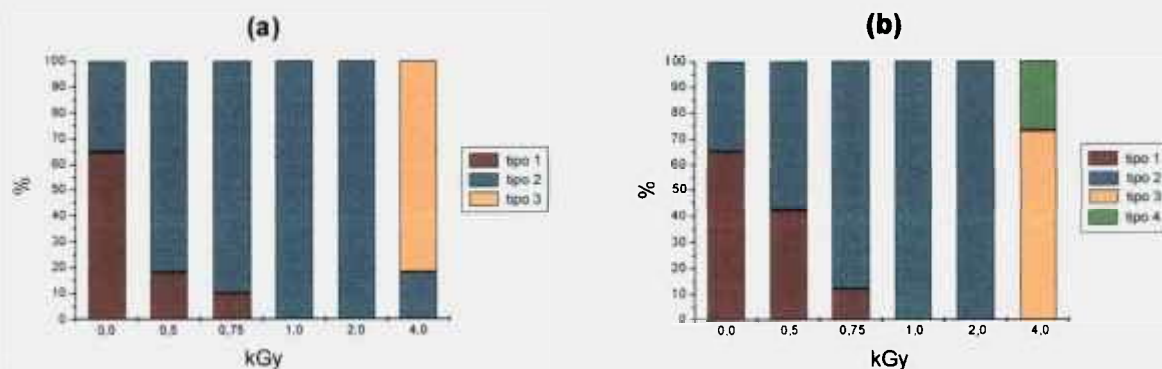


FIGURA 5.26. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de melancia
(a) radiação gama **(b)** feixe de elétrons

Os valores das distâncias totais de migração do DNA das amostras irradiadas de melancia foram superiores dos que o controle conforme a tabela 5.20, no entanto não resultaram ser significativamente diferentes, exceto entre o controle e a amostra tratada com dose de 4,0 kGy. Não houve diferença significativa entre os efeitos da radiação gama e os do feixe de elétrons.

TABELA 5.20. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de melancia

Dose (kGy)	Radiação gama	Feixe de elétrons
Controle	17,07 ± 5,90	17,07 ± 5,90
0,50	22,62 ± 4,83	20,19 ± 5,92
0,75	24,27 ± 4,40	23,62 ± 4,70
1,0	27,67 ± 2,94	27,24 ± 4,55
2,0	28,42 ± 3,24	27,99 ± 3,92
4,0	40,15 ± 6,19	51,28 ± 4,18

Os resultados são as médias ± desvio padrão, n=100

5.3.3 Maçã

Nas amostras de maçã, os cometas tipo 1 foram observados tanto no controle como nas amostras irradiadas até a dose de 1,0 kGy, no entanto, na amostra controle, estes cometas estiveram em maior proporção (61%) do que nas outras doses. Os cometas tipo 2 foram mais freqüentes nas amostras irradiadas até a dose de 2,0 kGy (tabela 5.21).

TABELA 5.21. Distância de migração do DNA e freqüência de tipos de cometa em amostras irradiadas de maçã

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	12,30 ± 2,12	61	20,92 ± 3,50	39	-	0	-	0
Radiação								
gama								
0,5	12,50 ± 1,73	20	23,55 ± 2,28	80	-	0	-	0
0,75	13,29 ± 1,33	14	25,03 ± 3,03	86	-	0	-	0
1,0	13,80 ± 1,47	15	25,47 ± 2,93	85	-	0	-	0
2,0	-	0	27,92 ± 3,65	76	40,63 ± 3,36	24	-	0
4,0	-	0	-	0	44,11 ± 2,35	100	-	0
Feixe de elétrons								
0,5	15,24 ± 1,71	17	25,61 ± 2,90	83	-	0	-	0
0,75	15,38 ± 1,60	8	26,65 ± 3,99	92	-	0	-	0
1,0	14,70 ± 1,34	10	25,62 ± 2,70	90	-	0	-	0
2,0	-	0	33,16 ± 2,90	100	-	0	-	0
4,0	-	0	-	0	49,13 ± 3,84	93	57,6 ± 2,19	7

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

Claras diferenças, quanto à freqüência de tipos de cometas, entre a amostra controle de maçã e as tratadas com a radiação ionizante são ilustradas na figura 5.27.

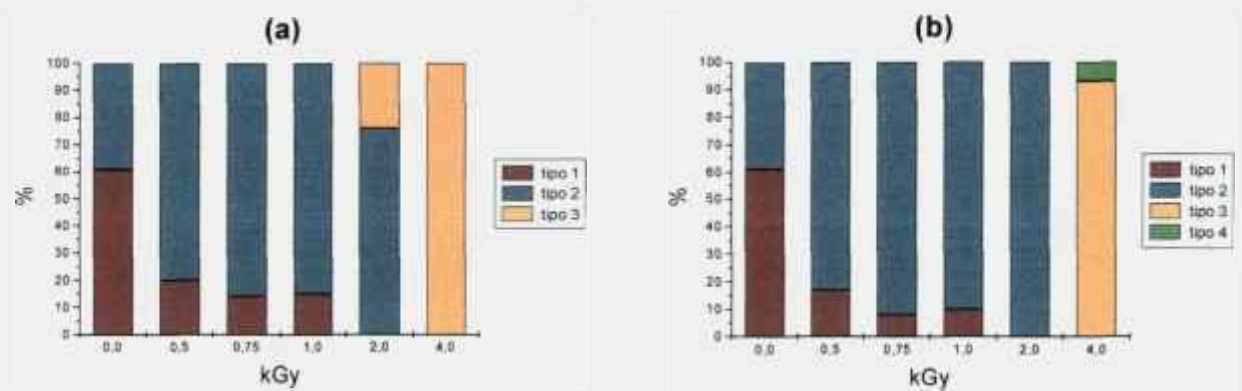


FIGURA 5.27. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de maçã
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

As amostras irradiadas com feixe de elétrons apresentaram distâncias totais de migração do DNA levemente maiores do que nas tratadas com radiação gama (tabela 5.22), resultando estas diferenças significativas ($p < 0,05$). Estatisticamente, foram encontradas diferenças ($p < 0,01$), em relação à distância de migração do DNA, entre a amostra controle de maçã e as irradiadas.

TABELA 5.22. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de maçã

Dose (kGy)	Radiação gama	Feixe de elétrons
Controle	15,66 ± 5,03	15,66 ± 5,03
0,5	21,34 ± 4,94	23,85 ± 4,77
0,75	23,39 ± 4,99	25,75 ± 4,93
1,0	23,72 ± 5,02	24,71 ± 4,13
2,0	30,97 ± 6,52	33,16 ± 2,90
4,0	44,11 ± 2,35	49,74 ± 4,37

Os resultados são as médias ± desvio padrão, n=100

5.3.4 Mamão

Na tabela 5.23 pode-se constatar que unicamente a amostra controle de mamão apresentou cometas tipo 1 e em alta porcentagem (73%), o que permitiu discriminá-la nitidamente das amostras irradiadas. Cometas tipo 2 foram observados nas amostras irradiadas nas doses 0,5; 0,75 e 1,0 kGy todos com freqüência de 100%. Da mesma forma, a amostra tratada com raios gama na dose de 4,0 kGy apresentou 100% de cometas tipo 3, enquanto que, aquela tratada com feixe de elétrons teve predominantemente cometas tipo 4.

TABELA 5.23. Distância de migração do DNA e freqüência de tipos de cometa em amostras irradiadas de mamão

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	12,66 ± 2,02	73	22,89 ± 4,20	27	-	0	-	0
Radiação gama								
0,5	-	0	30,69 ± 4,47	100	-	0	-	0
0,75	-	0	31,22 ± 4,31	100	-	0	-	0
1,0	-	0	33,50 ± 4,44	100	-	0	-	0
2,0	-	0	39,96 ± 5,97	100	-	0	-	0
4,0	-	0	-	0	51,52 ± 5,51	100	-	0
Feixe de elétrons								
0,5	-	0	28,73 ± 3,67	100	-	0	-	0
0,75	-	0	28,57 ± 3,39	100	-	0	-	0
1,0	-	0	31,93 ± 4,13	100	-	0	-	0
2,0	-	0	38,22 ± 5,51	79	57,81 ± 2,58	21	-	0
4,0	-	0	-	0	56,79 ± 2,49	14	60,10 ± 1,73	86

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros ± desvio padrão

Com relação à frequência de tipos de cometas, diferenças marcantes entre as amostras irradiadas e não irradiadas de mamão são ilustradas na figura 5.28.

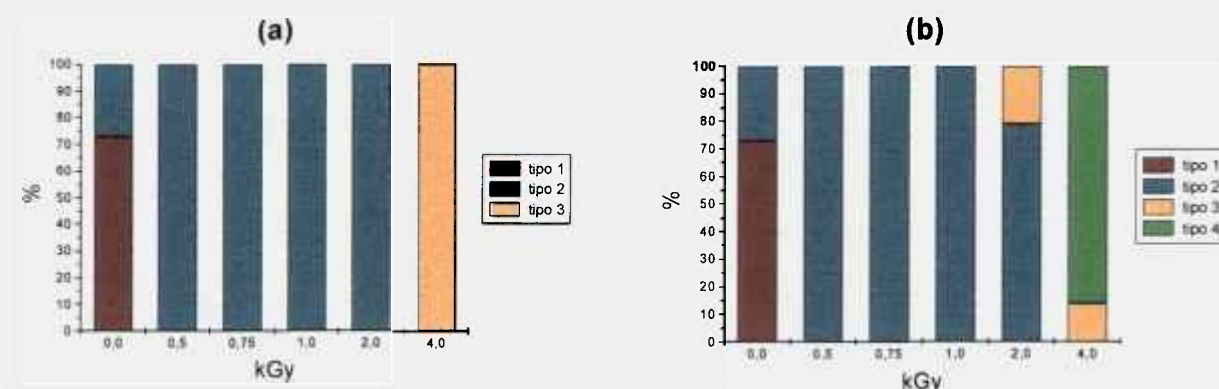


FIGURA 5.28. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de mamão
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Embora as amostras irradiadas com feixe de elétrons terem mostrado maiores distâncias totais de migração do DNA do que as tratadas com radiação gama (tabela 5.24), as diferenças não foram estatisticamente significativas. As diferenças entre o controle e as amostras irradiadas de mamão resultaram ser significativas ($p < 0,05$).

TABELA 5.24. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de mamão

Dose (kGy)	Radiação gama	Feixe de elétrons
Controle	15,42 ± 5,33	15,42 ± 5,33
0,5	30,69 ± 4,47	28,73 ± 3,67
0,75	31,22 ± 4,31	28,57 ± 3,39
1,0	33,50 ± 4,44	31,93 ± 4,13
2,0	39,96 ± 5,97	42,33 ± 9,47
4,0	51,52 ± 5,51	59,64 ± 2,17

Os resultados são as médias ± desvio padrão, n=100

5.3.5 Tomate

Na tabela 5.25 pode-se observar que somente a amostra não irradiada de tomate apresentou cometas tipo 1 em relação às tratadas com raios gama. Apesar de a amostra irradiada com feixe de elétrons na dose de 0,5 kGy ter também apresentado cometas tipo 1, foi possível distingui-la da amostra controle porque esta teve maior porcentagem de cometas tipo 1 (82%).

TABELA 5.25. Distância de migração do DNA e frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de tomate

Dose (kGy)	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4	
	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%	$\mu \pm \sigma$	%
Controle	12,59 ± 1,61	82	19,83 ± 2,28	18	-	0	-	0
Radiação								
gama								
0,5	-	0	33,20 ± 3,32	100	-	0	-	0
0,75	-	0	36,82 ± 2,95	76	44,00 ± 1,87	24	-	0
1,0	-	0	36,24 ± 2,65	62	43,18 ± 1,83	38	-	0
2,0	-	0	39,00 ± 2,29	17	43,45 ± 1,49	83	-	0
4,0	-	0	0	0	44,47 ± 2,16	57	56,28 ± 2,81	43
Feixe de								
elétrons								
0,0	12,59 ± 1,61	82	19,83 ± 2,28	18	-	0	-	0
0,5	13,33 ± 1,23	12	25,43 ± 3,52	88	-	0	-	0
0,75	-	0	26,86 ± 4,08	100	-	0	-	0
1,0	-	0	31,71 ± 4,25	100	-	0	-	0
2,0	-	0	30,44 ± 4,67	9	37,13 ± 3,63	91	-	0
4,0	-	0	-	0	46,14 ± 4,04	72	56,14 ± 3,64	28

$\mu \pm \sigma$: média da distância de migração do DNA em micrômetros \pm desvio padrão

Na figura 5.29 são ilustradas as mudanças na frequência de tipos de cometa entre as amostras irradiadas e não irradiadas de tomate.

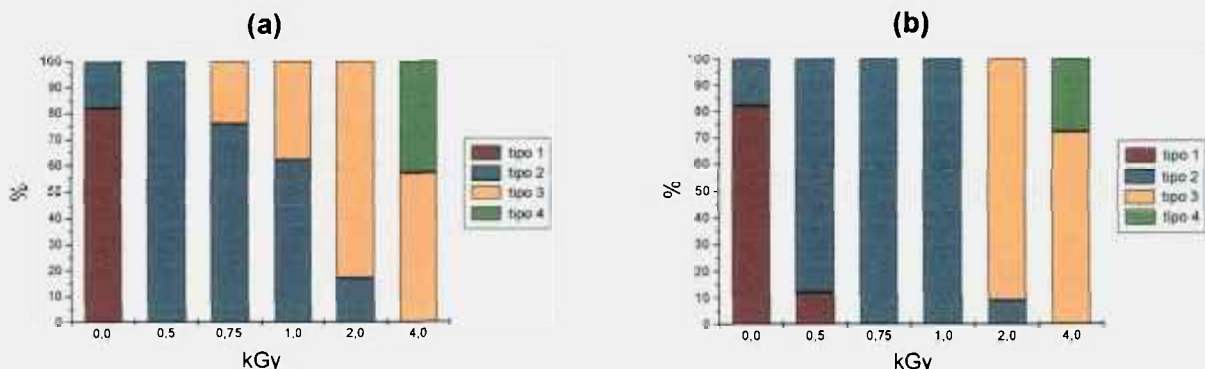


FIGURA 5.29. Frequência de tipos de cometa em amostras irradiadas de tomate
(a) radiação gama (b) feixe de elétrons

Os dados de distância total de migração do DNA nas amostras irradiadas de tomate são mostrados na tabela 5.26. Pode-se observar que estes valores são maiores com a radiação gama em comparação com os de feixe de elétrons, sendo estas diferenças significativas ($p < 0,05$). Foram encontradas diferenças entre o controle e as amostras irradiadas ($p < 0,01$).

TABELA 5.26. Distância total de migração do DNA em amostras irradiadas de tomate

Dose (kGy)	Radiação gama	Feixe de elétrons
Controle	13,89 ± 3,29	13,89 ± 3,29
0,5	33,20 ± 3,32	23,98 ± 5,16
0,75	38,54 ± 4,11	26,86 ± 4,08
1,0	38,88 ± 4,13	31,71 ± 4,25
2,0	42,69 ± 2,35	36,53 ± 4,17
4,0	49,55 ± 6,36	48,94 ± 5,97

Os resultados são as médias ± desvio padrão, n=100

Neste trabalho, as amostras controle estiveram caracterizadas pela ocorrência de altas porcentagens de cometas tipo 1. Este fato permitiu a discriminação de frutos não irradiados dos irradiados a partir da dose de 0,5 kGy.

Vários trabalhos foram publicados referentes ao uso do teste do cometa para a detecção de diversos vegetais irradiados. De acordo com Koppen & Cerda (1997), este método pode ser usado para detectar grãos irradiados tais como soja, lentilha, girassol, gergelim e linhaça, em doses menores a 100 Gy, um ano após irradiação. Os autores acima mencionados encontraram diferenças significativas na extensão da migração do DNA entre o controle e as amostras irradiadas.

O teste do cometa em amostras de frutos irradiados facilitou a rápida identificação de uva, ameixa morango, pêsego, maçã, nectarinas (Oh, 2000), melancia, melão, laranja, tomate e mamões irradiados. Com o acréscimo da dose de radiação, foi observada maior distância de deslocamento dos filamentos danificados de DNA em direção ao anodo (Marín-Huachaca, *et al.*, 2000b, 2001; Marín-Huachaca & Villavicencio, 2001a). *Grapefruits* irradiados com 0,1 kGy foram difíceis de discriminar visualmente dos controles, mas aqueles irradiados com 0,2 kGy ou mais mostraram fragmentação marcada do DNA (Delincée, 1998a).

Mediante o teste do cometa foi possível identificar o tratamento por irradiação de trigo (Barros *et al.*, 2001) e diferentes tipos de leguminosas (Khan *et al.*, 2001). Uma clara distinção, entre lentilhas não irradiadas e irradiadas, na dose 1,0 kGy ou mais, foi observada por Khan & Delincée (1998). Amostras irradiadas de duas variedades de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., var. carioca e *Vigna unguiculata* (L.) Walp, var. macaçar, avaliadas após 6 meses de estocagem, apresentaram extensiva fragmentação do DNA na dose de 10,0 kGy (Villavicencio *et al.*, 1998).

6. CONCLUSÕES

- O teste do cometa foi um método sensível na discriminação entre amostras irradiadas e não irradiadas de coxão mole bovino e de frutos em doses de pelo menos 2,5 kGy e 0,5 kGy respectivamente.
- Os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre a distância de migração dos fragmentos de DNA nas amostras de coxão mole bovino foram similares. Nas amostras de melão, melancia e mamão estas diferenças também foram similares exceto em maçã e tomate.
- Houve um aumento gradativo das distâncias de migração do DNA com o tempo de estocagem e com a dose de radiação nas amostras de coxão mole bovino, sendo este aumento menos pronunciado no controle.
- O teste de germinação foi um método eficaz na detecção de frutos irradiados em doses de 0,5 kGy ou mais. O comprimento da raiz foi melhor parâmetro na discriminação de melões, melancias e tomates irradiados dos não irradiados, enquanto que, em maçã e laranja, o melhor parâmetro foi a porcentagem de germinação.
- Os efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons sobre o crescimento de caules e de raízes dos embriões de melão, melancia, maçã e laranja e, dos caroços de tomate, foram similares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANON, 1989. International Document on Food Irradiation in *Acceptance, Control of, and Trade in Irradiated Food*, pp. 135-143, IAEA, Vienna, Austria.
- BARROS, A.C., LAMY-FREUND, M.T., VILLAVICENCIO, A.C.L.H., DELINCÉE, H., ARTHUR, V. Identification of Irradiated Wheat by Germination, DNA Comet Assay, and Electron Spin Resonance. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001, in press.
- BETTS, R.P., FARR, L., BANKES, P., STRINGER, M.F. *J. Appl. Bacteriol.*, 1988, 64, 329.
- BLANK, G., CORRIGAN, D. Comparison of resistance of fungal spores to gamma and electron beam radiation. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 26:269-277.
- BUTLER, J., LAND, E.J., SWALLOW, A.J. Chemical mechanism of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 24, N° 3/4, pp. 273-282, 1984.
- BRASIL. Decreto N° 72.718 de 29 de agosto de 1973. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília. D.F. 30 de agosto de 1973.
- BRASIL. Resolução-RDC N° 21, de 26 de janeiro de 2001. Publicada no Diário Oficial da União de 29 de janeiro de 2001. Seção 1.
- CEN EN 1784 (1996a) Foodstuffs –Detection of Irradiated Food Containing Fat, Gas Chromatographic Analysis of Hidrocarbons, Comité Européen de Normalisation, Brussels, Belgium.
- CEN EN 1785 (1996b) Foodstuffs –Detection of Irradiated Food Containing Fat, Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis of 2-Alkylcyclobutanones, Comité Européen de Normalisation, Brussels, Belgium.
- CEN EN 1786 (1996c) Foodstuffs –Detection of Irradiated Food Containing Bone, Method by ESR-Spectroscopy, Comité Européen de Normalisation, Brussels, Belgium.
- CEN EN 1787 (1996d) Foodstuffs –Detection of Irradiated Food Containing Cellulose, Method by ESR-Spectroscopy, Comité Européen de Normalisation, Brussels, Belgium.
- CEN EN 1788 (1996e) Foodstuffs –Detection of Irradiated Food from which Silicate Minerals can be isolated, Method by Thermoluminescence, Comité Européen de Normalisation, Brussels, Belgium.
- CERDA, H., HOFSTEN, B., JOHANSON, K.J. Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. In: *Recent advances of new methods of detection of irradiated food. Proceedings of the workshop*. Ancona, 24-26 Sept. 1991, (Leonardi, M., Belliaro, J.J., Raffi, J.J., eds.), Luxembourg: Commission of the European Communities. EUR 14315, pp. 401-405, 1993.
- CERDA, H., DELINCÉE, H., HAINE, H., RUPP, H. The DNA "comet assay" as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Research*, v. 375, p. 167-181, 1997.

- CERDA, H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA Comet Assay. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31, 89-92, 1998a.
- CERDA, H. Detection of irradiated frozen food with the DNA Comet Assay: Interlaboratory Test. *J. Sci. Food Agric.* 1998b, 76, 435-442.
- CERDA, H., KOPPEN, G. DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 207, 22-25, 1998.
- CHOUCROUN, P., GILLET, D., DORANGE, G., SAWICKI, B., DEWITTE, J.D. Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research*, 478(2001)89-96.
- CHUAQUI-OFFERMANN, N., McDOUGALL, T. An HPLC method to determine o-tirosine in chicken meat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1991, 39, 300-302.
- DE JESUS, E.F.O., ROSSI, A.M., LOPES, R.T. An ESR study on identification of gamma-irradiated kiwi, papaya and tomato using fruit pulp. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34, 173-178, 1999.
- DEL MASTRO, N.L. Development of Food Irradiation in Brazil. *Progress in Nuclear Energy*, Vol. 35, N° 3-4, pp. 229-248, 1999.
- DELINCÉE, H. Control of Irradiated Food: Recent Developments in Analytical Detection Methods. *Radiat. Phys. Chem.*, Vol. 42, N° 1-3, pp. 351-357, 1993.
- DELINCÉE, H. Rapid and simple screening test to detect the radiation treatment of foods. *Radiat. Phys. Chem.*, Vol. 46, N° 4-6, pp. 653-658, 1995.
- DELINCÉE, H. Introduction to DNA methods for identification on irradiated foods. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996a.
- DELINCÉE, H. Application of the DNA "comet assay" to detect irradiation treatment of foods. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996b.
- DELINCÉE, H. Safety Aspects in Food irradiation. Second Symposium on Food Safety and Human Health. Doha, Qatar, April, 1997.
- DELINCÉE, H. Detection of irradiated food: DNA fragmentation in grapefruit. *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 52, N° 1-6, pp. 135-139, 1998a.
- DELINCÉE, H. Detection of food treated with ionizing radiation. *Trends in Food Science & Technology*, 9(1998b)73-82.
- DELINCÉE, H., SOIKA, C. Improvement of the ESR detection of irradiated food containing cellulose employing a simple extraction method. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001, in press.
- DELINCÉE, H. Rapid detection of irradiated frozen hamburgers. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001a, in press.

- DELINCÉE, H. Analytical methods to identify irradiated food –a review. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001b, in press.
- DESROSIERS, M.F. Current Status of the EPR Method to Detect Irradiated Food. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 1621-1628, 1996.
- DIEHL, J.F. Safety of Irradiated Food. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995.
- FAIRBAIRN D.W., OLIVE, P.L., O'NEIL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339(1995)37-59.
- FAO. Codex General Standard for Irradiated Foods and Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatment of Food. (CAV/Vol. XV-Ed.1) Rome, 1984.
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1998) 189-201.
- FINDLAY, D.J.S., PARSON, T.V., SENÉ, M.R. Irradiation of food and the induction of radioactivity. *Radiat. Phys. Chem.*, Vol. 42, N° 1-3, pp. 417-420, 1993.
- FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C., SIEDE, W. DNA repair and mutagenesis. Washington, USA, 1995.
- GIROUX, M., LACROIX, M. Nutricional Adequacy of Irradiated Meat –A Review. *Food Research International*, vol. 31, N° 4, pp. 257-264, 1998.
- GLIDEWELL, S.M., GOODMAN, B.A. The nature and origen of the EPR spectra from irradiated bone and hidroxyapatite. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996.
- HAIRE, D.L., CHEN, G., JANZEN, E.G., FRASER, L., LYNCH, J.A. Identification of irradiated foodstuffs: a review of the recent literature. *Food Research International*, vol. 30, N° 3/4, pp. 249-264, 1997.
- HAMMERTON, K.M. Biological Methods for the Detection of Irradiated Foods. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996.
- HAYASHI, T., TODORIKI, S., OTOBE, K., SUGIYAMA, J. Detection of irradiated potatoes by impedance measurement. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996.
- HELLE, N. *et al.* Identifizierung bestrahlter Eiprodukte: Ein kombiniertes Verfahren zum Einsatz in der Routinekontrolle. *Z. Lebensm. Unsters. Forsch.*, 1993, 197, 321-331.
- HITCHCOCK, C.H.S. Detection of irradiated foods via the determination of hydrogen. *Food Science and Technology Today*, 1994, 8, 102-103.

- ICGFI. Irradiation as a quarantine treatment of fresh fruits and vegetables. A Report of the Working Group Convened by The International Consultive Group on Food Irradiation. Document N° 17. Vienna, Austria, 1994.
- ICGFI. The development of X-ray machines for food irradiation. Vienna, Austria, 1995.
- ICGFI. Facts about food irradiation. Vienna, Austria, 1999.
- JAY, J.M. Modern Food Microbiology. Sixth edition. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- JOHANSON, K.J. (1991) The microelectrophoresis method, a method for determination of irradiated food. In: J.J. Raffi and J.J. Belliardo (Eds.), *Potencial New Methods of Detection of Irradiated Food*, Commission of the European Communities, Luxembourg, EUR-13331, pp. 52-54.
- KARAM, L.R., SIMIC, M.G. Detecting irradiated foods: Use of hydroxyl radical biomarkers. *Analytical Chemistry*, 1988, 60, 1117A-1119A.
- KASSIE, F., PARZEFALL, W., KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring. *Mutation Research*, 463(2000)13-31.
- KAWAMURA, Y., UCHIYAMA, S., SAITO, Y. A Half-Embryo Test for Identification of Gamma-Irradiated Grapefruit. *Journal of Food Science*, 54, N° 2, pp. 379-382, 1989a.
- KAWAMURA, Y., UCHIYAMA, S., SAITO, Y. Improvement of the Half-Embryo Test for Detection of Gamma-Irradiated Grapefruits and its Application to Irradiated Oranges and Lemons. *Journal of Food Science*, vol. 54, N° 6, pp. 1501-1504, 1989b.
- KAWAMURA, Y. Germination test for identification of gamma-irradiated rice. *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 39, N° 2, pp. 203-207, 1992a.
- KAWAMURA, Y., SUZUKI, N., UCHIYAMA, S., SAITO, Y. Germination test for identification of gamma-irradiated wheat. *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 40, N° 1, pp. 17-22, 1992b.
- KAWAMURA, Y., MIURA, A., SUGITA, T., YAMADA, T., SAITO, Y. Application of half-embryo test to irradiated apples and cherries. *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 46, N° 3, pp. 371-375, 1995.
- KAWAMURA, Y.; SUGITA, T.; YAMADA, T.; SAITO, Y. Half-embryo test for identification of irradiated citrus fruit: collaborative study. *Radiat. Phys. Chem.*, Oxford, Vol. 48, N° 5, pp. 665-668, 1996a.
- KAWAMURA, Y., MURAYAMA, M., UCHIYAMA, S., SAITO, Y. Development of half-embryo test and germination test for detection of irradiated fruits and grains. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996b.
- KHAN, H.M., DELINCÉE, H. Detection of irradiation treatment of foods using DNA "Comet Assay". *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 52, N° 1-6, pp. 141-144, 1998.
- KHAN, A.A, KHAN, H.M., DELINCÉE, H. Detection of Radiation Treatment of Beans Using DNA Comet Assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001, in press.

- KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363(1996)89-96.
- KOPPEN, G., VERSCHAEVE, L. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research*, 360(1996)193-200.
- KOPPEN, G., CERDA, H. Identification of low dose irradiated seeds using the neutral comet assay. *Lebensm. – Wiss. – Technol.*, 30, 452-457, 1997.
- KOPPEN, G., TONCELLI, L.M., TRIEST, L., VERSCHAVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mechanisms of Ageing and Development*, 110(1999)13-24.
- KRACH, C., SONTAG, G., SOLAR, S. A simple chemical method for identification of irradiated industrial processed food. *Food Research International*, 32 (1999) 43-47.
- KRUSZEWSKI, M., MALEC-CZECHOWSKA, K., DANCEWICZ, A.M., IWANENKO, T., SZOT, Z., WOJEWODZKA, M. Application of the DNA Comet Assay for Detection of Irradiated Meat. *Nucleonika*, 43, 1998, 147-160.
- MALYAPA, R.S., BI, CH., AHERN, E.W., ROTI ROTI, J.L. Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiation Research*, 194(1998)396-400.
- MARCHIONI, E., BERGAENTZLE, M., KUNTS, F., TODORIKI, S., HASSELMANN, C. Detection of irradiated fresh, chilled and frozen foods by the mitochondrial DNA method. In: *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996.
- MARCOTTE, M. Irradiation as a disinfestation method –Update on methyl bromide phase out, regulatory action and emerging opportunities. *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 52, Nº 1-6, pp. 85-90, 1998.
- MARIN-HUACHACA, N.S., SEBASTIÃO, K.L., ROMANELLI, M.F., LEITE, Q.R., HAMASAKI, K., DELINCÉE, H., VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Detecção de carne ovina e leporina irradiadas. XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 8-10 de Agosto de 2000a, Fortaleza – Brasil, pág. 195.
- MARÍN-HUACHACA, N.S., VILLAVICENCIO, A.L.C.H., DELINCÉE, H. Avaliação dos fragmentos de DNA e germinação em frutas irradiadas. V Encontro Nacional de Aplicações Nucleares, 15-20 de outubro de 2000b, Rio de Janeiro, Brasil, pág. 377.
- MARIN-HUACHACA, N.S., LAMY-FREUND, M.T., MANCINI-FILHO, J., DELINCÉE, H., VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Detection of irradiated fruits by e-beam and gamma ray as a food processing. *Radiation Physics and Chemistry*, 2001, in press.
- MARIN-HUACHACA, N.S., VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Identificação de mamão irradiado mediante o teste do “Comet Assay”. III Encontro Nacional de Biociências Nucleares, 3-6 de Setembro de 2001a, Gramado – Rio Grande de Sul, pág. 54.

- MARÍN-HUACHACA, N.S., VILLAVICENCIO, A.L.C.H. DNA Comet Assay as a rapid detection method of irradiated bovine meat by electron beam. In: International Symposium on Utilization of Accelerators, organizado pela Agencia Internacional de Energia Atômica (IAEA) em cooperação com a Comissão Nacional de Energia Nuclear CNEN/IPEN-SP, 26-30 de novembro de 2001b, São Paulo, Brasil, pág. 98.
- McKELVEY-MARTIN, V.J., GREEN, M.H.L., SCHMEZER, P., POOL-ZOBEL, B.L., De MEO, M.P., COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288(1993)47-63.
- McMURRAY, C. H., STEWART, E.M., GRAY, R., PEARCE, J., eds. *Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 1996.
- MEIER, W., ARTHO, A., NÄGELI, P. Detection of irradiation of Fat-containing Foods by On-line LC-GC-MS of Alkylcyclobutanones. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, 87, 118-122, 1996.
- MONK, J.D., BEUCHAT, L.R., DOYLE, M.P. Irradiation Inactivation of Food-Borne Microorganisms. *Journal of Food Protection*, Vol. 58, Nº 2, pp. 197-208.
- MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments. 2da. Ed. New York: Wiley, 538 pag., 1984.
- MURANO, P.S. Quality of Irradiated Food. In: *Food Irradiation: A Source Book*. Edited by E.A. Murano. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1995.
- MURANO, E.A. Microbiology of Irradiated Food. In: *Food Irradiation: A Source Book*. Edited by E.A. Murano. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1995.
- NIČIFOROVIĆ, A., RADOJČIĆ, M., MILOSAVLJEVIĆ, B.H. Detection of irradiated food by the changes in protein molecular mass distribution. *Radiation Physics and Chemistry*, 55 (1999) 731-735.
- OH, K., PARK, J., KIM, K., YANG, J. Detection of Irradiated Fruits Using the DNA Comet Assay. *Korean J. Food Sci. Technol.*, vol. 32, Nº 3, pp. 531-537, 2000.
- OLIVE, P.L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1999, vol. 75, Nº 4, 395-405.
- ÖSTLING, O., JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 1984, 291-298.
- ÖSTLING, O., HOFSTEN, B.V. (1988) Radiation-induced DNA strand breaks in single cells. In: *Health Impact, Identification, and Dosimetry of Irradiated Foods*. Report of a WHO Working Group. Neuherberg, 17-21 November 1986, ISH-125, Bericht des Instituts für Strahlenhygiene des Bundesgesundheitsamtes, pp. 305-307.
- QIONGYING, L., YANHUA, K., YUEMEI, Z. Studies on the Methods of Identification of Irradiated Food -Seedling Growth Test. *Radiat. Phys. Chem.*, 42, 387-389, 1993.
- RAFFI, J., STEVENSON, M.H., KENT, M., THIÉRY, J.M., BELLUARDO, J.J. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27 (1992) 111.

- RAFFI, J. *et al* (1994) Concerted Action of the Community Bureau of Reference on Methods of Identification of Irradiated Foods, EUR-15261 EN, European Commission, Luxembourg.
- RAFFI, J., STOCKER, P. Electron Paramagnetic Resonance Detection of Irradiated Foodstuffs. *Appl. Magn. Reson.*, 10, 357-373, 1996.
- RAFFI, J. Identifying Irradiated Foods. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 17, N° 4, pp. 226-233, 1998.
- ROJAS, E., LOPEZ, M.C., VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722(1999) 225-254.
- ROSS, G.M., McMILLAN, T.J., WILCOX, P., COLLINS, A.R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. *Mutation Research*, 337(1995)57-60.
- SANDERSON, D.C.W., CARMICHAEL, L.A., NI RIAIN, S., NAYLOR, J., SPENCER, J.Q. Luminiscence Studies to Identify Irradiated Food. *Food Sci. Technol. Today*, 1994, 8, 93-96.
- SATIN, M. Food Irradiation –A Guidebook. USA, 1993.
- SCHULZKI, G., SPIEGELBERG, A., BÖGL, K.W., SCHREIBER, G.A. Detection of Radiation-Induced Hydrocarbons in Irradiated Fish and Prawns by Means of On-Line Coupled Liquid Chromatography–Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3921-3927, 1997.
- SECEX/MDIC – Secretaria de Comércio Exterior/ Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio do Brasil (www.mdic.gov.br).
- SINGH, N.P., STEPHENS, R.E. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Research*, 383(1997)167-175.
- STEVENSON, M.H., GRAY, R. The Use of ESR Spectroscopy for the Identification of Irradiated Food. *Annu. Rep. on NMR Spectroscopy*, 31, 123-142, 1995.
- STEVENSON, M.H. Validation of the cyclobutanone protocol for detection of irradiated lipid containing foods by interlaboratory trials. In: *Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status*. Edited by: Cecil H. McMurray, Eileen M. Stewart, Richard Gray and Jack Pearce. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996.
- STEWART, E.M. The application of ESR for the identification of Irradiated Crustacea. *Appl. Magn. Reson.*, 10, 375-393, 1996.
- SULLIVAN, R., FASSOLITIS, A.C., LARKIN, E.P. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl. Microbiol.*, 22:61-65, 1971.
- SZEKELY, J.G., CHUAQUI-OFFERMANN, N., GOODWIN, M., DELANEY, S. An evaluation of the genotoxicity of o-tyrosine, a proposed marker for irradiated food. *Journal of Food Protection*, 1992, 55, 1006-1008.
- TAUB, I.A. Reaction mechanisms, irradiation parameters, and product formation. In: *Preservation of Food by Ionizing Radiation*, volume II, Edited by Edward Josephson and Martin Peterson. Florida, USA, 1983.

UCHIYAMA, S., KONNO, S., TOYOOKA, T., KAWAMURA, Y., SAITO, Y.
J. Food Hyg Soc. Japan, 1989, 30, 152.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H., MANCINI-FILHO, J., DELINCÉE, H. Thermoluminescence investigation of gamma irradiated bean. In: Proceedings of XV CBCTA - "Qualidade de Vida", Poço de Caldas, vol. 1, 4-p.99, 1996.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H., MANCINI-FILHO, J., HARTMANN, M., AMMON, J., DELINCÉE, H. Formation of Hydrocarbons in Irradiated Brazilian Beans: Gas Chromatographic Analysis to Detect Radiation Processing. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, pp. 4215-4220, 1997a.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H., MANCINI-FILHO, J., DELINCÉE, H. Utilization of half-embryo test to identify irradiated beans. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, v. 136:11, 670-673, 1997b.

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*, vol. 52:1-6, 161-166, 1998.

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(2000) 295-298.

WAKEFORD, C.A.; BLACKBURN, R., SWALLOW, A.J. Induction and detection of radioactivity in foodstuffs irradiated with 10 MeV electrons and X-rays. *Radiat. Phys. Chem.*, 38, 29-38, 1991.

WHO. Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Geneva, World Health Organization, 1981 (WHO Technical Report Series, Nº 659).

WHO. Safety and nutritional adequacy of irradiated food. Geneva, 1994.

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

WOODS, R.J., PIKAEV, A.K. Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing. New York, USA, 1994.

YORDANOV, N.D., GANCHEVA, V. A new approach for extension of the identification period of irradiated cellulose-containing foodstuffs by EPR spectroscopy. *Appl. Radiat. Isot.*, 52, 195-198, 2000.

ZHU, S., KUME, T., ISHIGAKI, I. Detection of irradiated wheat by germination. *Radiat. Phys. Chem.*, 1993, 42, 421-424.