



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**TESTE DO COMETA COMO FERRAMENTA DE CONTROLE DA  
CADEIA DO FRIO**

**RENATO CÉSAR DUARTE**

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

**Orientadora:**

**Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio**

**SÃO PAULO**

**2009**



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**TESTE DO COMETA COMO FERRAMENTA DE CONTROLE DA  
CADEIA DO FRIO**

**RENATO CÉSAR DUARTE**

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

**Orientadora:**

**Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio**

**SÃO PAULO**

**2009**

**Aos meus pais, Bartolomeu e Márcia,**

**meus irmãos Flávio e Eduardo**

**e à minha filha Lívia,**

**por tudo.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais uma etapa vencida;

À Orientadora e amiga, Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio pela confiança;

Ao IPEN, especialmente ao Centro de Tecnologia das Radiações, representado por Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, gerente do CTR, e pela Dra. Margarida Hamada, chefe de divisão de pesquisa e desenvolvimento do CTR, pelo constante apoio e disponibilidade na busca de soluções;

Ao Dr. Leonardo Gondim de Andrade e Silva;

Ao Dr. Eric Marchioni pela valiosa ajuda no planejamento e no desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Sueli Borrely, por suas observações importantes e por cessão de equipamentos;

A Valter Artur do CENA por suas valiosas informações muito importantes;

Às Doutoradas Olga Zazuco Higa e Andrea Cecilia Dorión Rodas, do Centro de Biotecnologia (IPEN), por terem disponibilizado o laboratório e equipamentos, imprescindíveis para este trabalho;

À MSc. Yasco Kodama e Paulo de Souza Santos por ajudarem no tratamento por radiação;

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira, pela colaboração no processamento por irradiação das amostras no Gammacell;

Ao Marcos e Claudia pelo valoroso auxílio nos assuntos administrativos;

Ao Doutor Tomas Prates Ong, por importantes informações e conselhos muito importantes para este trabalho;

Aos colegas do laboratório, agora grandes amigos, que também muito me ajudaram, Simone, Ingrid, Patrícia, Camilo, Priscila, Michel, Gustavo, Débora, Fernanda, Thaíse, Renata, Vladimir, Vera, Reginaldo, Helberti, Amanda, Fábio, Marcela, Neto, Marco Antônio, Natália, Alessandro, Gabriel e Renata;

Aos meus amigos, Thiago Risocamuba, Fábio Ramalho, Rubens Fuzaro, Tony Junior, Candido Brito, Gustavo Siqueira, Gustavo, Ricardo, Leandro Fortes, Bruno Siqueira, Bruno Fabreti, Humberto Fabreti, João Henrique, Henrique Buongermino, Luis Virgilio e Rodrigo Musse, pelo apoio de todas as horas;

Aos profissionais do Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN pelo grande apoio para a realização do meu trabalho;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, tornando possível a concretização deste projeto;

Aos meus pais, Bartolomeu e Márcia, meus irmãos Flávio e Eduardo, minha filha Lívia, minha avó Egídia e à minha namorada Viviane, pelo constante apoio, paciência, estímulo e, acima de tudo, pelo amor incondicional;

À minha tia Marines;

Também aos que não foram citados, mas que estão guardados no meu coração.

**"Um povo sem conhecimento, saliência de seu passado histórico,  
origem e cultura, é como uma árvore sem raízes."**

Bob Marley

# **TESTE DO COMETA COMO FERRAMENTA DE CONTROLE DA CADEIA DO FRIO**

**RENATO CÉSAR DUARTE**

## **RESUMO**

Tendo em vista um mercado cada vez mais exigente na qualidade dos alimentos, faz-se necessário o desenvolvimento de processos que atendam às expectativas do consumidor. Dentre os processos existentes, destacam-se a cadeia do frio e a irradiação. A cadeia do frio compreende todas as etapas de conservação do alimento, desde a produção, resfriamento, congelamento, armazenamento, e transporte até o consumidor final. A irradiação, como processo de conservação de alimentos, estende a vida de prateleira, inibe o brotamento e reduz a contaminação por patógenos, entre outros benefícios. É importante a identificação da degradação dos alimentos em função de falhas nos processos a que foram submetidos. O teste do cometa (DNA Comet Assay) é um método de varredura largamente estudado, considerado rápido e de baixo custo, pelo fato de identificar quebras no DNA, é possível considerar sua utilização como mais uma ferramenta no controle de falhas na cadeia do frio que podem degradar e prejudicar os alimentos. Algumas etiquetas e selos usados no controle dos processos do frio não consideram a situação anterior do alimento, indicando falhas a partir do momento em que forem colocadas em contato com o mesmo, já o teste do cometa verifica a degradação ocorrida no alimento até o momento de sua realização podendo ainda, acompanhar o aumento da degradação.

## **COMET ASSAY AS A COLD CHAIN CONTROL TOOL**

**RENATO CÉSAR DUARTE**

### **ABSTRACT**

Bearing in mind an ever more demanding market regarding the quality of food, it has been necessary to develop processes that meet the demands of consumers. Within the existing processes the cold chain and irradiation stand out. The cold chain comprises all the stages of conserving food from production, cooling, freezing, storing and transportation to the final consumer. Irradiation, as a means of conserving food, prolongs the shelf life, inhibits budding and reduces pathogenic contamination among other benefits. Is very important the identification of food degradation in function of failure on the processes which they were subjected. The comet assay is a screening test widely studied, considerate fast and with low cost. By the fact of the test identify breaks on the DNA, may be possible use the comet test on the control of cold chain failures that degrade de food. The labels and stamp, do not consider the previous food situation and indicate failures from the moment where they be placed in contact with the product. With the comet assay is possible to check the degradation that has occurred in liver chicken samples until the moment of comet's test realization.



## SUMÁRIO

## Página

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
3.1 Carne de frango.....	20
3.2 Fígado de frango.....	20
3.3 Contaminação dos alimentos.....	21
3.4 Preservação dos alimentos.....	22
3.4.1 Cadeia do frio.....	22
3.4.1.1 Refrigeração e congelamento.....	23
3.4.1.2 Alimentos rapidamente congelados.....	24
3.4.1.3 Armazenamento.....	25
3.4.1.4 Transporte de alimentos e legislação.....	26
3.4.1.5 Descongelamento.....	27
3.4.2 Irradiação.....	28
3.4.2.1 Legislação brasileira.....	30
3.4.2.2 Legislação internacional.....	31
3.5 Detecção e controle.....	32
3.5.1 Etiquetas, selos e embalagens.....	32
3.5.2 Teste do Cometa.....	34
3.5.2.1 Custos do teste do cometa.....	36
3.5.2.1.1 Tampão TBE 0,45M (Solução estoque).....	36
3.5.2.1.2 Tampão Lise.....	36
3.5.2.1.3 Tampão PBS.....	37
3.5.2.1.4 Agarose.....	37
3.5.2.1.5 Coloração (apenas para Sybr Gold).....	37
3.5.2.1.6 Solução fixadora (apenas para Nitrato de prata).....	37
3.5.2.1.7 Coloração (apenas para Nitrato de prata).....	38
3.5.2.1.8 Solução finalizadora (Apenas para Nitrato de prata).....	38

3.5.2.1.9 Equipamentos do laboratório.....	38
3.5.2.2 Kit para o teste do cometa.....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 Teste do Cometa.....	40
4.1.2 Preparação das soluções.....	40
4.1.2.1 Tampão TBE 0,45M (pH 8.4) (solução estoque).....	40
4.1.2.2 Tampão Lise.....	41
4.1.2.3 Tampão PBS pH 7.4.....	41
4.1.2.4 Agarose.....	41
4.1.2.4.1 1º AGAROSE 0,5 % L-agarose * (L = Low melting).....	41
4.1.2.4.2 2º AGAROSE 0,8 % L-agarose em PBS.....	42
4.1.2.5 Coloração.....	42
4.2 Preparação do Teste (Depois de prontas as soluções).....	42
4.2.1 Preparação das lâminas.....	42
4.2.2 Preparação, primeira agarose (L-agarose low melting, 0,5%).....	42
4.2.3 Preparação da suspensão de células das amostras.....	42
4.2.4 Preparação da suspensão de células nas lâminas.....	43
4.2.5 Lise.....	43
4.2.6 Eletroforese.....	43
4.2.7 Preparação das lâminas para a etapa de coloração.....	43
4.2.8 Contagem das células (cometas).....	44
4.3 Amostras.....	44
4.4 Irradiação.....	44
4.5 Cadeia do Frio.....	45
4.5.1 Reprodução de falhas na cadeia do frio.....	45
4.5.2 Congelamento rápido e congelamento lento.....	45
4.5.3 Tempo e temperatura de armazenamento.....	45
4.5.4 Descongelamento rápido e lento.....	45
4.5.5 Irradiação antes ou depois do congelamento.....	45
4.5.6 Comparação da irradiação com o congelamento.....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
5.1 Classificação visual e morfológica dos cometas.....	47
5.2 Cadeia do frio.....	48
5.2.1 Abuso de temperatura na cadeia do frio.....	48

5.2.2	Degradação celular no congelamento rápido e lento.....	51
5.2.3	Armazenamento.....	54
5.2.3.1	Degradação celular em função do tempo de armazenamento.....	54
5.2.3.2	Degradação em diferentes temperaturas de armazenamento.....	56
5.2.4	Degradação no descongelamento rápido e lento.....	59
5.3	Irradiação.....	62
5.3.1	Irradiação antes ou depois do congelamento de alimentos.....	62
5.3.2	Degradação celular em função da dose de radiação.....	65
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Médias dos diferentes tipos de cometas analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 2 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango submetidas à cadeia do frio sem falhas de temperatura e com falha de 3 horas na temperatura. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 3 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, congeladas em nitrogênio líquido e congeladas em freezer. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 4 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura* e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 5 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de - 15°C e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de - 10°C. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 6 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango descongeladas em diferentes temperaturas. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 7 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango congeladas antes da irradiação e amostras congeladas depois da irradiação. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 8 – Médias dos diferentes tipos de cometas formados em função do aumento da dose de radiação (controle, 1,5, 3,0 e 4,5kGy) aplicada em fígado de frango *in natura*. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

TABELA 9 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango irradiado com 1,5kGy e cometas encontrados em amostras de fígado de frango congeladas por 48 horas. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Escala dos diferentes tipos de cometas. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita.

FIGURA 2 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango *in natura* (A), amostras armazenadas por 48 horas à -15°C (B) e amostras armazenadas por 48 horas à -15°C com 3 horas de falha de temperatura (C). Coloração: SyBr Gold; aumento de 100X; anodo à direita.

FIGURA 3 - Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango submetidas à cadeia do frio sem falhas de temperatura e amostras com falha de 3 horas na temperatura.

FIGURA 4 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango controle (A), congeladas em nitrogênio líquido (B) e congeladas no freezer (C). Coloração: SyBr Gold; aumento 400X; anodo à direita.

FIGURA 5 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, congeladas em nitrogênio líquido e congeladas em freezer.

FIGURA 6 – Diferentes tipos de cometas formados em amostras de fígado de frango *in natura* e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita.

FIGURA 7 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura* e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias.

FIGURA 8 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango *in natura*, armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -15°C (A) e amostras armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -10°C (B). Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita.

FIGURA 9 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -15°C (A) e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de - 10°C (B).

FIGURA 10 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango descongeladas em geladeira com a temperatura de - 5°C (A), amostras descongeladas à temperatura ambiente de 24°C (B) e amostras descongeladas à temperatura de 30°C (C). Coloração: SyBr Gold; aumento de 100X; anodo à direita.

FIGURA 11 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango descongeladas em diferentes temperaturas.

FIGURA 12 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango congeladas antes da irradiação (A) e amostras de fígado de frango congeladas depois da irradiação. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400 e 1000X; anodo à direita.

FIGURA 13 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango congeladas antes da irradiação e amostras congeladas depois da irradiação.

FIGURA 14 – Cometas encontrados em amostras de fígado de frango *in natura* e amostras irradiadas com 1,5kGy, 3,0kGy e 4,5kGy. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita.

FIGURA 15 – Frequência de tipos de cometas em função do aumento da dose de radiação (controle, 1,5, 3,0 e 4,5kGy).

FIGURA 16 – Cometa encontrado em amostras de fígado de frango irradiadas com 1,5kGy e cometa encontrado em amostras de fígado de frango congeladas por 48 horas. Coloração SyBr Gold; aumento de 1000X; anodo à direita.

FIGURA 17 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango irradiado com 1,5kGy (A) e cometas encontrados em amostras de fígado

de frango congeladas por 48 horas (B). Coloração SyBr Gold; aumento 400X; anodo à direita.

FIGURA 18 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango irradiadas com 1,5kGy e amostras congeladas 48 horas.



## 1 INTRODUÇÃO

Durante séculos a humanidade procura formas de conservar os alimentos que consomem. A preservação e o armazenamento desses alimentos a baixa temperatura estão entre as técnicas mais antigas que se conhece. Além dessa, outro processo de preservação dos alimentos é o tratamento por radiação ionizante (Lee *et al.*, 2006).

Tanto a cadeia do frio quando a irradiação, assim como outras técnicas de preservação dos alimentos, devem estar integradas a estudos de logística, métodos de controle e fiscalização. Na cadeia do frio as fases de armazenamento, climatização e distribuição dos produtos possuem relevante importância nos custos de comercialização das empresas, além de exigirem uma quantidade importante de recursos destinados a investimentos em infra-estrutura (Oliveira & Simon, 2008).

A refrigeração e o congelamento são os métodos mais empregados na conservação de produtos cárneos. As baixas temperaturas retardam o crescimento microbiano e também as reações químicas que causam deterioração dos alimentos (Andrade *et al.*, 2004; Shimokomaki *et al.*, 2006). Variações de temperaturas em toda a cadeia de produção do alimento podem acarretar perdas de sua qualidade. Processos industriais de baixa temperatura normalmente usados são: pratos gelados, circulação forçada de ar, congelamento rápido, spray e nitrogênio líquido (Roça, 1999).

O tratamento de alimentos com radiação ionizante é uma técnica que melhora a qualidade higiênica do alimento e contribui na redução de incidência de doenças causadas por patógenos. A irradiação pode prolongar a vida útil ou de prateleira do alimento, minimizando suas perdas (WHO, 1994; Diehl, 1995).

A irradiação possibilita o tratamento dos alimentos após a embalagem e conservação dos produtos próximos a seu estado original. Assim sendo, alimentos perecíveis podem ser conservados por mais tempo sem perda de

qualidade e praticamente sem alterações de temperatura durante o respectivo tratamento (Farkas, 2006; Villavicencio, 1998).

Nas doses de até 1kGy, as perdas nutricionais e as alterações nos alimentos irradiados são consideradas insignificantes, dentro dos limites encontrados normalmente (Delincée *et al.*, 1998).

Métodos de detecção e controle devem ser desenvolvidos e normatizados para que maior número de alimentos possa ser submetido aos processos de conservação. Alguns métodos baseados em alterações no DNA, como o teste do cometa, podem ser aplicados em vários tipos de alimentos (Cerde *et al.*, 1997; Delincée, 1998, 2002a, 2002b). O teste do cometa (DNA Comet Assay) é um método de varredura largamente estudado e considerado rápido e de baixo custo (Marín-Huachaca *et al.*, 2005). Introduzido como técnica eletroforética para a direta visualização do dano no DNA em células individuais (Östling & Johanson, 1984), o dano ou a fragmentação do DNA é um processo que ocorre nas células, quando expostas ao calor, a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, a longos períodos de armazenamento e a irradiação (Faullimel *et al.*, 2005; Cerde, 1998a, 1998b; Delincée, 2002b).

O Teste do cometa, através de degradações no DNA geradas pelo incorreto manuseio do alimento, pode identificar falhas de temperatura, sendo considerado seu uso como ferramenta de controle da cadeia do frio, com a vantagem de ser rápido, sendo realizado em algumas horas e identificando degradações anteriores a sua realização, ou seja, ocorridas desde o abate do animal ou colheita dos vegetais até o momento do teste.

Com a evolução dos corantes usados, microscópios mais avançados e softwares cada vez mais completos, as análises fornecem resultados mais específicos, garantindo maior segurança no controle dos processos em indústrias alimentícias de produção, armazenamento e distribuição. Os gastos com esse teste dependem muito da tecnologia que se pretende usar. Pode ser usado também em pequenas empresas devido ao baixo custo e entidades fiscalizadoras por fornecer mais uma ferramenta de controle.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o Teste do Cometa como ferramenta de controle na cadeia do frio

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar a influência da irradiação antes e depois do congelamento de fígado de frango utilizando o teste do cometa
- Avaliar a velocidade de congelamento e descongelamento de fígado de frango utilizando o teste do cometa
- Analisar a influência do tempo e temperatura de armazenamento de fígado de frango utilizando o teste do cometa

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Carne de frango**

Durante os últimos trinta anos, mudanças globais no mercado de aves têm colocado o Brasil entre os mais importantes produtores e fornecedores de produtos industrializados de frango (Santos *et al.*, 2004).

Considerada uma das mais acessíveis fontes de proteína animal, dado o baixo custo e preço de comercialização no mercado, e com menor teor de gordura, a carne de frango é largamente consumida pela população brasileira de menor renda. Segundo o USDA (US Department of Agriculture), cada brasileiro consome 27,7 kg por ano, ocupando o quinto lugar atrás da União Européia, EUA, Arábia Saudita e Canadá (IDEC, 2004).

Segundo Portal do Agronegócio (2006), em 1976, o consumo per capita de carne de frango no Brasil era de apenas 5,5 kg. Em 1986, quase dobrou, atingindo 10,3 kg. Dez anos mais tarde, registrava incremento de 110%.

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango – ABEF, em 2005, o país exportou 29% do total produzido, sobrando 71% para o abastecimento do mercado interno. A evolução da produção brasileira de frango atingiu 9,297 milhões de toneladas em 2005, tendo nos últimos dez anos um incremento de 129,5%, segundo a ABEF.

#### **3.2 Fígado de frango**

O serviço oficial de inspeção sanitária dos abatedouros avícolas, representado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e suas representações estaduais e municipais, constitui os órgãos responsáveis pela garantia da qualidade da carne e vísceras para consumo (Pontes, 2004).

Os critérios de condenação das vísceras de frango, especialmente do fígado, consideram o aspecto visual, consistência e odor do órgão, de acordo com a Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950, atualizada pela Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998 do MAPA.

A condenação de carnes e vísceras impróprias para o consumo visa a zelar pela saúde pública, uma vez que a carne de frango e seus subprodutos, assim como outros de origem animal, podem ser fontes de enfermidades (Jay, 1994). O fígado de frango pode ser acometido por toxicoses, doenças infecciosas (virais, bacterianas, parasitárias) e neoplásicas (Hoerr & Riddell, 1996).

### **3.3 Contaminação dos alimentos**

Doenças transmitidas por alimentos podem ser problemas de saúde pública causando perdas econômicas substanciais (Santos *et al.*, 2004)

Segundo dados do Centro de Controle de Doenças (CDC, 2004), a cada ano ocorrem 76 milhões de infecções, 325 mil hospitalizações, e aproximadamente 5 mil mortes causadas por patógenos alimentares.

Em carnes de frango, o crescimento de microrganismos e as atividades enzimáticas são os principais fatores limitantes da vida-útil, frequentemente prolongada com a proteção das embalagens e a aplicação de agentes descontaminantes. A umidade, a composição de voláteis e, principalmente, os lipídeos podem ser alterados de acordo com o material utilizado na embalagem (Blumenthal, 1997). Da mesma forma, os agentes descontaminantes, associados ao efeito bactericida, devem manter a aparência e o sabor do alimento sem deixar resíduos prejudiciais à saúde (Bolder, 1997).

O prolongamento da vida-útil de carcaças de frango é uma preocupação constante da indústria avícola. Nos abatedouros, as carcaças são geralmente resfriadas por imersão em água para minimizar o crescimento bacteriano. Apesar de reduzir o índice de crescimento, isso também pode gerar contaminação cruzada entre as carcaças. É importante ressaltar que o

crescimento de microrganismos, durante o armazenamento refrigerado, ocorre principalmente no tecido muscular lesado, dependendo das contaminações do tipo de tecido e do pH (Lamuka *et al.*, 1992).

### **3.4 Preservação dos alimentos**

Os alimentos têm a vida-de-prateleira limitada devido ao crescimento de bactérias resistentes a baixas temperaturas (Paul *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1991), podendo se proliferar durante o armazenamento. A qualidade inicial e a forma de manuseio do alimento influenciam consideravelmente na sua conservação (Lambert *et al.*, 1991; Schofield, 1992).

Para garantirem a qualidade dos alimentos, as indústrias dispõem de vários métodos focando prioritariamente a saúde pública e o aumento de vida-de-prateleira dos seus produtos. A refrigeração, o congelamento, a desidratação, a fermentação e a adição de conservantes, pasteurização, a esterilização e a irradiação são alguns exemplos. (Andrews, *et al.*, 1998).

#### **3.4.1 Cadeia do frio**

Em 1927, o termo “logística” foi definido de modo similar ao utilizado hoje (ABIAP, 2006).

A logística trata de todas as atividades de movimentação e armazenagem, que facilitam o fluxo de produtos desde o ponto de aquisição da matéria-prima até o ponto de consumo final, assim como dos fluxos de informações que colocam os produtos em movimento, com o propósito de providenciar níveis de serviços adequados aos clientes a um custo razoável (Ballou, 1995).

Com o crescimento do transporte e distribuição dos alimentos, as empresas passaram a se especializar em vários mercados logísticos. Aquele que

se relaciona com a “cadeia do frio”, nas etapas de armazenamento e distribuição, é considerado o que mais necessita de eficiência operacional (Oliveira & Simon, 2008).

“Cadeia do frio é uma sucessão de estabelecimentos ou locais frios que mantém a baixa temperatura nos produtos refrigerados ou congelados. O alimento descongelado não deve ser congelado novamente, deve ser consumido rapidamente para evitar a multiplicação e aceleração do crescimento de microrganismos que propiciam sua deterioração e conseqüentemente, a perda de nutrientes” (Silva Jr, 2002).

“Cadeia do frio é constituída pelo conjunto de etapas que se inter-relacionam, mantendo o valor na cadeia de abastecimento (supply chain) na forma de produtos e/ou serviços, desde os produtores até o consumidor final” (Benoir, 2005).

Segundo a ABIAF (2006), um conceito integrado à cadeia do frio define logística como um processo de planejamento, implementação, controle do fluxo, armazenamento eficiente e econômico de matérias-primas, materiais semi-acabados e produtos acabados, com informações necessárias, desde a origem até de consumo, atendendo a todas as exigências.

#### **3.4.1.1 Refrigeração e congelamento**

A refrigeração e o congelamento são os métodos mais empregados na conservação de produtos cárneos. As baixas temperaturas retardam o crescimento microbiano e também as reações químicas que causam deterioração dos alimentos. Apesar de serem métodos onde as características são mantidas,

os processos são muito onerosos e apresentam tempo de ação limitado (Shimokomaki *et al.*, 2006). Variações de temperaturas em toda a cadeia de produção acarretam perdas de qualidade do alimento. Assim, são usados processos industriais de baixa temperatura, como pratos gelados, circulação forçada de ar, congelamento rápido, spray e nitrogênio líquidos (Roça, 1999).

Devido ao processo de congelamento, a água livre nos alimentos cristaliza aumentando a concentração de solutos (Becker *et al.*, 1999), provocando mudanças no pH e outras características que afetam o produto (Neves, 1991).

#### **3.4.1.2 Alimentos rapidamente congelados**

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), com o Decreto-Lei nº 986, de 21/10/69, estabelece os padrões de identidade e qualidade, com normas específicas para diferentes produtos e grupos de alimentos rapidamente congelados. Define também que o alimento rapidamente congelado, supergelado ou supercongelado devem ser submetidos a uma velocidade apropriada de congelamento com temperaturas muito baixas. Essa operação precisa ser conduzida de tal forma que a faixa de cristalização máxima seja ultrapassada rapidamente, de acordo com o tamanho e o tipo de alimento.

No armazenamento desses produtos, além da temperatura apropriada, especificada nos padrões individuais, não poder ultrapassar menos dezoito graus centígrados (-18°C), deve conter um mínimo possível de flutuações.

Para o transporte, efetuado em veículos e equipamentos capazes de manter essa temperatura, será tolerada apenas uma pequena elevação por curtos períodos, não podendo ser superior a menos quinze graus centígrados (-15°C).

Quanto à distribuição e entrega desses alimentos exige-se equipamentos adequados para assegurar sua manutenção à temperatura igual ou inferior a menos dezoito graus centígrados (-18°C), com uma tolerância de elevação, por curtos períodos, nunca superior a menos quinze graus centígrados



(-15°C). Os balcões frigoríficos de exposição deverão exibir termômetros devidamente aprovados pelo órgão competente.

### 3.4.1.3 Armazenamento

As principais alterações na carne de frango durante o congelamento e o armazenamento se referem à maciez, cor e sabores estranhos (Yoon, 2002). Porém, segundo Lyon & Lyon (2002), as propriedades sensoriais do alimento no congelamento e o armazenamento parece não serem afetadas significativamente.

Panetta (1998) e Góes *et al.* (2004), nos relatam que o aspecto mais importante a considerar no armazenamento é o cumprimento de cuidados especiais para a obtenção e conservação de um produto final de excelente qualidade. Os processos de produção devem ser seguros, especialmente para os produtos perecíveis, uma vez que temperaturas elevadas convertem-se em ponto crítico de controle da qualidade dos alimentos.

No armazenamento da carne de frango congelada, enquanto algumas reações deteriorativas podem ser inibidas com o emprego de baixas temperaturas, a oxidação lipídica, mesmo agindo numa velocidade reduzida, destrói as membranas celulares, diminuindo a suculência e o peso da carcaça. Os produtos da oxidação lipídica são responsáveis não somente pela produção de odores, *flavours* ofensivos e compostos voláteis, como também pela destruição de constituintes essenciais, diminuindo o valor nutricional e formando compostos tóxicos durante o processamento (Kahl & Hilderbrandt, 1996; Frankel, 1996; Yang, 2002).

O armazenamento de mercadorias constitui etapa fundamental em todo o processo. Sendo assim, a matéria prima deve ser seguramente armazenada para preservar a qualidade nutricional, garantir a proteção contra contaminantes e impedir a deterioração dos produtos, reduzindo ao mínimo inevitáveis perdas (ABERC, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Silva Jr., 2002).

#### 3.4.1.4 Transporte de alimentos e legislação

A Diretoria Técnica do Centro de Vigilância Sanitária, com a necessidade de uniformizar a fiscalização de veículos para o transporte de alimentos de consumo humano, normatiza:

- os meios de transporte de alimentos, refrigerados ou não, destinados ao consumo humano, devem garantir sua integridade e qualidade, evitando contaminação e deterioração, sendo proibidos de manter ou transportar pessoas, animais e substâncias estranhas que possam contaminá-los ou corrompê-los;

- os produtos perecíveis devem ser transportados em veículo fechado;

- dependendo da natureza, os alimentos aquecidos devem estar acima de 65°C, os resfriados, ao redor de 6°C, não ultrapassando 10°C ou conforme expresso pelo fabricante na rotulagem, os refrigerados, ao redor de 4°C, não ultrapassando 6°C e os congelados, ao redor de -18°C e nunca superior a -15°C.

O Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento editou a RESOLUÇÃO N° 10, DE 31 DE JULHO DE 1984, que dispõe instruções para conservação nas fases de transporte, comercialização e consumo dos alimentos perecíveis, industrializados, beneficiados e acondicionados em embalagens.

Esses alimentos devem apresentar, no rótulo, informações para sua conservação. As empresas produtoras deverão classificá-los e, de acordo com suas categorias indicarem a temperatura adequada, resfriados até 10°C e congelados até -8°C.

Registro de medições de temperatura: Portaria CVS-6/99 de 10/03/99:

Nos locais onde existe manipulação, conservação e distribuição de alimentos deverá haver termômetros próprios para verificação de temperaturas

adequadas. Deve-se dar preferência aos termômetros que trabalhem com grandes diferenciais de temperatura (- 40°C a + 150°C). No caso de se utilizar termômetros de inserção, estes deverão ser higienizados e desinfetados antes de serem colocados nos alimentos. Os termômetros deverão ser periodicamente aferidos através de aparelhos próprios ou através de empresas especializadas.

As aferições deverão ser registradas em planilhas próprias, constando sempre, o produto aferido, o dia, a hora, o local e o nome do aferidor. O período variará de acordo com a necessidade ou definido em manual de boas práticas de fabricação.

#### **3.4.1.5 Descongelamento**

Segundo a ANVISA (2006), além de um bom congelamento, os alimentos precisam de um correto processo de descongelamento que garanta as suas qualidades e, em especial, o seu teor nutritivo (vitaminas e minerais). Após o descongelamento e com uma temperatura favorável, os microrganismos retomam a sua atividade e crescimento, sendo que, o líquido resultante é especialmente propício ao crescimento de bactérias, e por isso o alimento deve ser descongelado e consumido assim que possível.

De acordo com a ANVISA (2006), para evitar contaminação os alimentos podem ser descongelados rapidamente no microondas quando forem submetidos imediatamente ao cozimento. Podem também ser descongelados em imersão em água fria (neste caso, sempre dentro da embalagem para evitar perda de nutrientes solúveis, como as vitaminas e os sais minerais), ou no frigorífico, evitando deixá-los à temperatura ambiente (especialmente as peças grandes). Alguns alimentos, como peixe ou vegetais, podem ser cozidos ainda congelados. Para evitar que os microrganismos se multipliquem rapidamente, é aconselhável não deixar os alimentos a temperatura ambiente, procurando, para retardar esse processo mante-lo sempre abaixo dos 5°C e acima dos 60°C.

### 3.4.2 Irradiação

Em 1966 ocorreu o primeiro Simpósio Internacional de Irradiação de Alimentos, com a representação de 28 países que revisaram o progresso feito nos programas de pesquisas nacionais (IAEA, 1966). Em 1970, um projeto internacional foi criado com o objetivo de patrocinar programas de pesquisas mundiais sobre a salubridade de alimentos irradiados. Foram 10 anos de pesquisas patrocinadas pela IAEA (International Atomic Energy Atomic), FAO (Food and Agriculture Organization), OECD (Organization for Economic Cooperation and development) e WHO (World Health Organization), com participação de 24 países.

A história da irradiação de alimentos caminhou com a própria história da radiação, quando em 1895 Roentgen descobriu o raio-X e, em 1896 Becquerel reconheceu a radioatividade. Estudos Realizados pelos Estados Unidos estimularam a realização de experimentos por outros países. O primeiro uso comercial da irradiação de alimentos ocorreu em 1957, na Alemanha, quando produtores de condimentos começaram a melhorar a qualidade higiênica de seus produtos (Diehl, 2002).

No início, a principal vantagem da irradiação de alimentos, observada pelos pesquisadores, era a ausência do uso de compostos químicos, porém nenhuma aplicação imediata foi possível por que as fontes de radiações disponíveis na época, máquinas de raios-x e isótopos radioativos, não tinham poder suficiente para tratar alimentos em quantidades industriais (Diehl, 2002). A irradiação surgiu como uma alternativa segura no processo de redução dos organismos patogênicos e também para aumentar a vida de prateleira (Farkas, 2006). Esta tecnologia possui grande potencial na preservação, estocagem e distribuição do alimento de forma segura (Del-Mastro, 1999).

A irradiação é o fenômeno físico pelo qual ocorre a emissão e propagação de energia através do espaço ou de uma matéria (Radomyski *et al.*, 1994). É um meio de preservar os alimentos, através de uma exposição

controlada e adequada, evitando degradação e ao mesmo tempo produzindo um resultado desejado (WHO, 1994).

Em 1980, concluiu-se que a irradiação de qualquer alimento na dose de até 10kGy não apresenta risco toxicológico, microbiológico ou nutricional no seu consumo (WHO, 1981). Como resultado, foi aprovada a aplicação e comercialização de alimentos irradiados, com a adesão de 34 países, dentre eles, o Brasil (Thakur & Smith, 1994; Giroux & Lacroix, 1998). Em 1983 foi criado o ICGFI – International Consultive Group on Food Irradiation, grupo consultivo formado por 45 países membros fornecendo publicações sobre segurança e métodos de detecção de alimentos irradiados, aspectos legislativos, comercialização e controle das empresas, aceitação e informações sobre a nova tecnologia. Nesse mesmo ano, o Codex Alimentarius adotou a padronização geral para alimentos irradiados e o código internacional para operação de empresas de irradiação (Diehl, 2002).

A Organização Mundial de Saúde incentiva o uso deste processo, descrito como uma técnica para preservar e aumentar a segurança dos alimentos (WHO/FAO, 1988). Em 1997, um grupo de estudos, para aplicação de altas doses de irradiação, formado pela FAO/IAEA/WHO, examinou os resultados de experimentos que utilizaram doses maiores do que 10kGy, indicando que poucos alimentos toleraram-nas sem perda da qualidade sensorial. Por outro lado, rações irradiadas com dose de 70kGy, não demonstrarão nenhum efeito adverso à saúde dos animais que pudessem ser relacionado com este consumo (WHO, 1999).

Vários anos de pesquisa chegaram a um consenso sobre diferentes aplicações da irradiação, principalmente a de alimentos. Doses baixas (<1kGy) podem reduzir parasitas em carnes, retardar o amadurecimento de vegetais e o envelhecimento de frutas, como também destruir insetos e parasitas de grãos e frutas; Doses médias (1-10kGy) têm efeito de pasteurização, prolongando a vida-útil e Doses elevadas (>10kGy) basicamente servem para esterilizar (Miyagusku, 2003).

A irradiação pode interferir positivamente na qualidade de produtos frescos, prolongando a boa aparência, odor, sabor e a manutenção do valor nutritivo (Smith & Pillai, 2004). É um tratamento eficaz contra insetos que provocam uma barreira técnica para a livre exportação limitando o comércio internacional (Radomyski, 1994).

Nos últimos anos, a irradiação tem se destacado como técnica promissora entre os recursos atuais disponíveis para a preservação de alimentos. Cerca de 500 milhões de toneladas por ano de vários produtos alimentícios são irradiados em todo o mundo. Países, como Argentina, Bélgica, Chile, Dinamarca, Estados Unidos, França, Hungria, Holanda, Japão e outros, utilizam a irradiação para diminuir o risco de toxinfecções alimentares e aumentar a vida-de-prateleira (ICGFI, 1995). Desde então, todo o processo de irradiação de alimentos tem sido tema de várias conferências internacionais, abordando aspectos da saúde pública, segurança microbiológica, transformações químicas, instalações e tecnologia de irradiadores, esclarecimentos aos consumidores, regulamentação de produtos, dosagens e métodos de detecção de alimentos irradiados.

#### **3.4.2.1 Legislação brasileira**

O decreto nº 72.718, de 28/08/1973 e posteriormente a RDC21/2001, estabelecem e regulamentam a irradiação de alimentos. Sua autorização deve ser concedida pela Comissão Nacional de energia Nuclear (CENEN), mediante comprovação da inocuidade para o consumo e considerando que o efeito causado nos nutrientes deve ser comparável aos demais processos de preservação (Brasil, 1973).

As fontes de radiação são aquelas autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, conforme normas pertinentes, a saber:

- Isótopos radioativos emissores de radiação gama: Cobalto 60 e Césio 137;
- Raios X gerados por máquinas que trabalham com energias de até 5 MeV e

- Elétrons gerados por máquinas que trabalham com energias de até 10 MeV.

A Resolução RDC21/2001 da ANVISA alterando a legislação anterior dispõe:

De acordo com a dose absorvida, qualquer alimento poderá ser tratado por radiação desde que sejam observadas as seguintes condições:

- a dose mínima, suficiente para alcançar a finalidade pretendida;
- a dose máxima, inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento.

### **3.4.2.2 Legislação internacional**

Nos Estados Unidos, o FDA (2008) é o órgão regulador primário envolvido com a irradiação de alimentos, processo também controlado pelo Departamento de Agricultura Americano (USDA), assim como os alimentos de origem animal são regulados pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (FSIS). Esse órgão aprovou em 1992 o uso da irradiação em carne de ave fresca e congelada, a fim de controlar microrganismos causadores de toxinfecções alimentares (Greenberg, 1996).

A primeira autorização para o uso da irradiação na esterilização de alimentos ocorreu em março de 1995 quando o FDA permitiu a irradiação de carnes congeladas para serem utilizadas em um Programa Espacial da NASA (National Aeronautics and Space Administration). A norma publicada em 1997 estendeu a aprovação da irradiação para as carnes vermelhas e os seus produtos prevenindo a ação patógenos causadores de toxinfecções alimentares e outras bactérias. Este procedimento foi aprovado e autorizado pelo USDA em dezembro de 1999 (FSIS, 1999). Nos Estados Unidos, doses mínimas de 1,5kGy e máximas de 3,0kGy são estabelecidas para carne de frango (Crawford & Rehe, 1990).

### 3.5 Detecção e controle

#### 3.5.1 Etiquetas, selos e embalagens

Embalagem ativa é aquela associada à função de conservação e proteção do alimento utilizando sistemas capazes de alterar as condições que o produto está exposto, através da incorporação de componentes que, por libertação ou absorção de substâncias, tem impacto positivo na vida útil do produto. Os absorvedores de oxigênio, os agentes antimicrobianos e materiais cuja permeabilidade depende da temperatura são exemplos que encontramos nesse tipo de embalagem (Poças *et al.*, 2008; Poças & Delgado 2008).

Embalagens inteligentes estão associadas à monitoração das condições do produto embalado ou do ambiente que o circunda, são sistemas com a finalidade de detectar, sentir, registrar, rastrear e fornecer informações esclarecedoras ao consumidor, em nível de qualidade, vida útil do produto e de segurança no consumo. Incluem-se nessa tecnologia os indicadores de tempo-temperatura (TTIs), de gás, de queda, os biosensores, etiquetas de radiofrequência e as tintas termocrômicas (Poças *et al.*, 2008; Poças & Delgado 2008).

As embalagens ativas e inteligentes têm maior expressão em mercados como os EUA e o Japão comparativamente à Europa. Sua aplicação tem sido voltada para produtos de elevado valor agregado, sensíveis às condições de manuseamento na distribuição e priorizando medicamentos componentes eletrônicos em relação ao setor alimentar que apresenta margens pequenas, lucros demorados e cadeia de distribuição mais lenta. Sua legislação, ainda em elaboração, e os custos associados são também fatores que limitam sua aplicação comercial (Poças *et al.*, 2008; Poças & Delgado 2008).

A temperatura constitui um parâmetro determinante não apenas na vida útil, segurança e qualidade final do produto processado, como também são de fundamental importância seu acompanhamento e registro durante a distribuição e armazenagem (Taoukis, 2001; Taoukis & Labuza, 2003).



Indicadores Tempo/Temperatura (TTIs) são dispositivos utilizados para controlar, gravar e traduzir o efeito global da temperatura sobre a qualidade dos alimentos na cadeia do frio. Dependendo do seu princípio de funcionamento, são classificados como físico, químico ou biológico e, de acordo com o tempo e a temperatura, manifestam-se com mudança irreversível da cor (Taoukis & Labuza, 1989; Taoukis, 2001; Giannakourou *et al.*, 2005).

As Color Tag são etiquetas que mudam de cor quando o produto ultrapassa um limiar predefinido. Um dos problemas desta tecnologia é a logística adicional de uma etiqueta por produto e a possibilidade dela não estar em contato com o mesmo, devido à forma da embalagem e à possibilidade de corresponder a uma combinação incerta de temperatura e superfície do produto (Infoqualidade, 2008).

Os iButtons são registadores de contato que permitem obter rigorosamente a temperatura, sendo, no entanto, inviável sua colocação de um sensor por produto, devido ao custo do dispositivo e à logística adicional de transferir os dados para suporte digital (Infoqualidade, 2008).

Tecnologia mais recente, a T-RFID é uma etiqueta com sensor de temperatura que, além do preço e uma etiqueta por produto, a empresa deve dispor de aparelhos de leitura dos valores registrados em cada ponto de entrega (Infoqualidade, 2008).

Selos de tempo/temperatura ou auto-adesivos indicam o tempo a que os alimentos ficaram expostos a temperaturas inadequadas, mudando sua cor de forma permanente e irreversível. Os selos reversíveis de temperatura, com validade de um ano, têm encapsulado cristais que mudam de cor conforme a variação de temperatura e voltando ao normal quando a mesma se normaliza, podendo resultar falsos positivos (Coleparmer, 2008).

### 3.5.2 Teste do Cometa

O teste do cometa (DNA Comet Assay), também denominado eletroforese em microgel, foi introduzido por Östling & Johanson, em 1984, como uma técnica eletroforética para a direta visualização e monitoração do dano no DNA em células individuais (Östling & Johanson, 1984). Nas células submetidas a um campo elétrico, os fragmentos de DNA migram para o ânodo, adquirindo a aparência de um cometa. A região nuclear dá origem a sua cabeça e os fragmentos originam a caudas, cuja extensão está intimamente relacionada com a intensidade do respectivo dano (Fairbairn *et al.*, 1995; McKelvey-Martin *et al.*, 1993).

Um dos princípios determinantes no padrão de formação do cometa é que a extensão da migração dos fragmentos de DNA inicialmente aumenta com o dano, porém atinge um máximo definido pelas condições da eletroforese e não pelo tamanho dos fragmentos. Virtualmente, todas as células eucarióticas podem ser analisadas usando o teste do cometa (Fairbairn *et al.*, 1995; McKelvey-Martin *et al.*, 1993).

Esse teste sofreu várias modificações, porém, seus princípios estão baseados na versão neutra ou alcalina (Cerdeira *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995; Klaude *et al.*, 1996), técnica que hoje em dia é amplamente aceita e utilizada em várias áreas de investigação, como estudos de genotoxicidade, estudos de reparo do DNA, biomonitoramento ambiental, estudo de células apoptóticas e monitoramento humano (Fairbairn *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1995; Malyapa *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 1999; Olive, 1999; Koppen, 1997; Kassie *et al.*, 2000; Choucroun *et al.*, 2001).

O uso do teste do cometa na detecção de alimentos irradiados foi sugerido por Östling & Johanson (1988), aplicaram-no utilizando um protocolo neutro. Para simplificar, utilizaram uma camada simples de agarose e, pelo fato das doses de radiação causarem danos expressivos no DNA, utilizaram também pH neutro combinado com baixa voltagem e tempo curto de eletroforese.

Segundo Delincée (1996); Fanaro *et al.* (2007); Marchioni (2007); Duarte *et al.* (2008), o teste do cometa é um método de varredura (screening) e tem sido aplicado em um grande número de alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal. Suas vantagens são a simplicidade e a sua rápida realização sequencial, visto que a corrida eletroforética demora apenas alguns minutos. O DNA pode ser visualizado mediante coloração com diversos corantes, como SyBr Gold, Alaranjado de Acridina, Brometo de Etídio, Nitrato de Prata e outros.

Diversos estudos avaliaram o efeito do tratamento por radiação ionizante de alimentos. Delincée (1998) estudou seu efeito e observou que frutas irradiadas com 0,2kGy e doses maiores mostraram a típica fragmentação do DNA.

Utilizando o teste do cometa na detecção de feijões tratados por radiação, Khan *et al.* (2002) verificaram que o aumento da densidade da cauda dos cometas foi proporcional ao incremento nas doses de radiação. Amostras não irradiadas apresentaram uma pequena migração do DNA. Resultados similares com outros alimentos foram encontrados por Marín-Huachaca *et al.* (2002, 2004), Barros *et al.* (2002).

Conforme dados apresentados por Villavicencio *et al.* (2004, 2007); Araújo *et al.* (2004), a degradação do DNA aumentou com doses de radiação crescentes.

Novos estudos utilizando o teste do cometa na cadeia do frio têm fornecido bons resultados. Conforme Faullimel *et al.* (2005); Cerda & Koppen (1998); Park *et al.* (2002); Miyaharaa *et al.* (2002); Duarte *et al.* (2009), o teste do cometa, por identificar degradações no DNA, pode ser usado como ferramenta no controle de falhas na cadeia do frio, identificando alterações e variações de temperatura, sendo possível identificar degradações ocorridas, quer seja na produção, armazenamento ou transporte anteriores a realização do teste, ou seja, identifica a degradação que pode ter ocorrido desde a produção do alimento ou abate do animal.

O teste pode ser realizado em algumas horas, com a evolução dos corantes usados, microscópios mais avançados e softwares cada vez mais completos, as análises podem ser feitas no mesmo dia e ainda, com resultados mais específicos, dando maior segurança para o controle dos processos internos ou externos de indústrias alimentícias de produção, armazenamento e distribuição. Os gastos com esse teste dependem muito da tecnologia que se pretende usar.

### 3.5.2.1 Custos do teste do cometa

#### 3.5.2.1.1 Tampão TBE 0,45M (Solução estoque)

Eletroforese ( $\pm 40$  lâminas) - 100ml de TBE 0,45M para 1L de água

Reagente	Preço médio (R\$)	Quantidade / Litro	Valor (R\$)/ Litro
Tris	134,80 (500mL)	54g	14,50
Ac. Bórico	5,25 (500mL)	27,5g	0,28
EDTA	24,70 (500mL)	3,72g	0,18

**CUSTO DOS REAGENTES PARA O TESTE – 1,496 REAIS**

#### 3.5.2.1.2 Tampão Lise

Reagente	Preço médio (R\$)	Quantidade / Litro	Valor (R\$)/ Litro
SDS	166,97 (1kg)	25g	4,17

**CUSTO DOS REAGENTES PARA O TESTE – 0,41 REAIS**

**3.5.2.1.3 Tampão PBS**

<b>Reagente</b>	<b>Preço médio (R\$)</b>	<b>Quantidade / Litro</b>	<b>Valor (R\$)/ Litro</b>
NaCl	6,45 (1Kg)	8g	0,05
KCl	4,60 (500g)	0,2g	0,002
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	17,00 (1Kg)	2,68g	0,05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,25 (500g)	0,24g	0,005

**CUSTO DOS REAGENTES PARA O TESTE – 0,107 REAIS**

**3.5.2.1.4 Agarose**

<b>Reagente</b>	<b>Preço médio (R\$)</b>	<b>Quantidade / 10mL</b>	<b>Valor (R\$)/10mL</b>
1ª - L-agarose	50 reais (10g)	0,05g (H <sub>2</sub> O)	0,25
2ª - L-agarose	50 reais (10g)	0,08g (PBS)	0,4

**CUSTO DOS REAGENTES PARA O TESTE – 0,65 REAIS**

**3.5.2.1.5 Coloração (apenas para Sybr Gold)**

<b>Reagente</b>	<b>Preço médio (R\$)</b>	<b>Quantidade / 150mL</b>	<b>Valor (R\$)/150mL</b>
SyBr Gold	300 (500 µL)	15µL (PBS)	9

**3.5.2.1.6 Solução fixadora (apenas para Nitrato de prata)**

<b>Reagente</b>	<b>Preço médio (R\$)</b>	<b>Quantidade / 1L</b>	<b>Valor (R\$)/1L</b>
TCA	55 (500g)	150g	16,50
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	19,78 (1kg)	80g	1,59
Glicerina	9 (1L)	40mL	0,36

**CUSTO DOS REAGENTES PARA O TESTE – 18,45 REAIS**

**3.5.2.1.7 Coloração (apenas para Nitrato de prata)**

Reagente	Preço médio (R\$)	Quantidade / 1L	Valor (R\$)/1L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4 (500g)	50g	0,4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	105 (500g)	0,2g	0,042
Ag NO <sub>3</sub>	180 (100g)	0,2 g	0,36
Ac. Silicotungstic	200 (25g)	1g	8
Formaldeído	8 (1L)	500µL	0,004

**CUSTO DOS REAGENTES PARA O TESTE – 8,81 REAIS****3.5.2.1. 8 SOLUÇÃO FINALIZADORA (Apenas para Nitrato de prata)**

Reagente	Preço médio (R\$)	Quantidade / 1L	Valor (R\$)/1L
Ácido acético	15 (1L)	10mL	0,15

**3.5.2.1.9 Equipamentos do laboratório**

	Valor Médio
Lâminas - caixa com 50 lâminas	2,46 reais
Lamínulas - caixa com 50 lamínulas	4,00 reais
Funil	20,00 reais
Cuba para coloração	25,00 reais
Bequer	30,00 reais
Agitador magnético	800,00 reais
Cuba e fonte para eletroforese	1.000,00 reais
Balança	2.000,00 reais
Microscópios:	
Óptico (Nitrato de prata)	2.000,00 reais
Fluorescência (SyBr Gold)	14.530,00 reais

### 3.5.2.2 Kit para o teste do cometa

Existe um Kit para o teste do cometa no mercado internacional da marca “TREVIGEN” (USA), distribuído pela empresa “Antibody CL” (Chile) com valor de USD \$ ±316,8327 (R\$ ±617,00) + impostos, com capacidade para realizar 50 amostras, com estimativa de custo de USD \$ ±6,3367 (R\$ ±12,34) por amostra.

Componentes do kit:

- CometAssay Lysis Solution 2 x 500 mL
- CometAssay LMAgarose 15 mL
- CometSlide (2 well slide) 25 each
- mM EDTA; 12.5 mL
- SYBR Green 5 µl

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Teste do Cometa

O teste foi realizado conforme o protocolo alcalino descrito por Cerda, H (1997).

#### 4.1.2 Preparação das soluções

##### 4.1.2.1 Tampão TBE 0,45M (pH 8.4) (solução estoque)

Para 1L de tampão TBE foram adicionados:

0,446M Tris ..... 54g

0,445M Ácido Bórico ..... 27,5g

0,5M EDTA, pH 8.0 ..... 20mL

Depois foi Completado com H<sub>2</sub>O destilada até 1L e acertado para pH 8.4.

Preparo 20mL de EDTA 0,5M

Foi utilizado 3,72g de EDTA, completar com 18mL H<sub>2</sub>O e com NaOH 40% foi acertado o pH para 8.4.

Solução estoque de EDTA

Foram diluídos 93,05g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O em 300mL H<sub>2</sub>O destilada. O pH foi acertado para 8.0, completando com H<sub>2</sub>O destilada para 500mL e a solução foi preparada para autoclavar.

Preparo do NaOH concentrado

Foi diluído 40g de NaOH em 100mL de H<sub>2</sub>O destilada.

Preparo do TBE 0,045M (para câmara de eletroforese)



Foi diluído 100mL da solução TBE 0,45M (estoque), em 900mL de H<sub>2</sub>O destilada e o pH acertado para 8.4.

#### 4.1.2.2 Tampão Lise

Foram adicionados 25g de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) em 1L solução TBE 0,045M.

#### 4.1.2.3 Tampão PBS pH 7.4

Foram adicionados em 1L de água destilada:

8g .....	NaCl
0,2g .....	KCl
2,68g .....	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O = (1,44g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).
0,24g .....	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

O pH foi acertado para 7.4 com HCl e a solução foi preparada para autoclavar.

#### 4.1.2.4 Agarose

##### 4.1.2.4.1 1º AGAROSE 0,5 % L-agarose \* (L = Low melting)

Foi adicionado 0,05g de L-agarose em 10mL de água destilada cozinhando no bico de Busen até ficar transparente. A solução foi deixada em banho-maria a  $\pm$  50°C tampada para manter a concentração.

#### **4.1.2.4.2 2º AGAROSE 0,8 % L-agarose em PBS**

Foi adicionado 0,08g de L-agarose em 10mL de PBS, cozinhando no bico de Busen até ficar transparente. A solução foi deixada em banho-maria a  $\pm$  50°C tampada para manter a concentração.

#### **4.1.2.5 Coloração**

SOLUÇÃO DE SYBR GOLD (1:10.000)

Foi adicionado 15 $\mu$ L de SyBr Gold em 150mL PBS a - 15°C.

### **4.2 Preparação do Teste (Depois de prontas as soluções)**

#### **4.2.1 Preparação das lâminas**

As lâminas ficaram de molho em metanol overnight para limpeza, sendo trocado o metanol a cada quatro experimentos.

#### **4.2.2 Preparação das lâminas com a primeira agarose (L-agarose low melting, 0,5%).**

Foram colocadas 2 gotas de low melting agarose 0,5% a 50°C sobre a lâmina. A agarose foi puxada com outra lâmina e foi deixada secar a temperatura ambiente por 24 horas e rotuladas.

#### **4.2.3 Preparação da suspensão de células das amostras**

Foram picadas de forma bem fina 2g de fígado de frango e colocados em um bequer de 20ml rotulado, foi adicionado 5ml de PBS gelado e agitado em banho de gelo por 5 minutos. A suspensão de células com o PBS foi filtrada em funis com gaze e armazenada em tubos de ensaio e mantidos em banho de gelo.

As amostras foram filtradas pela segunda vez em seringas com filtros de 125  $\mu\text{m}$  e armazenadas em novos tubos de ensaios.

#### **4.2.4 Preparação da suspensão de células nas lâminas**

Foi misturado em um novo tubo de ensaio 100 $\mu\text{L}$  da suspensão de células (já duas vezes filtrada) com 600 $\mu\text{L}$  da 2<sup>a</sup> agarose.

Foi colocado 100 $\mu\text{L}$  da mistura de células e agarose sobre a lâmina (já com a 1<sup>a</sup> agarose) e a lâmina foi coberta com lamínula e imediatamente colocada em suporte de gelo por 5 minutos.

Após 5 minutos as lamínulas foram retiradas muito devagar e com muito cuidado para não perder as células.

#### **4.2.5 Lise**

Depois de completada a fase de preparação das lâminas com a retirada da lamínula, as lâminas foram colocadas na solução de Lise por 15 minutos.

#### **4.2.6 Eletroforese**

Depois de 15 minutos na lise as lâminas foram retiradas e colocadas na câmara de eletroforese (sentido - para +). A câmara de eletroforese foi completada com o tampão e as lâminas deixadas descansando por 5 minutos.

A fonte foi ligada com ajuste de 2V/cm por 2 minutos

#### **4.2.7 Preparação das lâminas para a etapa de coloração**

Após a eletroforese as lâminas foram colocadas em H<sub>2</sub>O bidestilada por 5 minutos e depois deixadas secando em estufa por aprox. 20 minutos a 40°C. Depois de secas as lâminas foram colocadas na solução de Sybr Gold

(10µL/mL) por 15 minutos a 4°C e posteriormente lavadas com H<sub>2</sub>O bidestilada por 5 minutos a 4°C. As lâminas foram observadas ainda úmidas.

#### **4.2.8 Contagem das células (cometas)**

Para visualização, as lâminas foram examinadas em um aumento de 100X com objetiva de 10X, aumento de 400X com objetiva de 40X e aumento de 1000X com objetiva de 100X, todas sob microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioskop) equipado com filtro de excitação de 450-490nm e de barreira de 515nm. Foram analisadas 100 células aleatórias por dose e classificadas por observação visual.

#### **4.3 Amostras**

As amostras foram obtidas em mercados da cidade de São Paulo. O fígado do frango foi transportado em bolsa térmica para diminuir ao máximo a influência da temperatura e para manter seu estado de carne fresca ou *in natura*. Logo após sua chegada ao IPEN as amostras foram analisadas, irradiadas ou armazenadas dependendo do tipo de análise a ser feita.

#### **4.4 Irradiação**

As amostras foram irradiadas no IPEN-CNEN (São Paulo, Brasil) usando uma fonte <sup>60</sup>Co (Gammacell 220, A.E.C.L) com taxa de dose de 2,64kGy/h nas doses de 1,5kGy, 3,0kGy e 4,5kGy e amostra controle não irradiada. Dosímetros Harwell Amber 3042 foram usados para a mensuração da dose aplicada.

## **4.5 Cadeia do Frio**

### **4.5.1 Reprodução de falhas na cadeia do frio**

Fígados de frango armazenados por 48 horas a -15°C.

Fígados de frango armazenados por 24 horas, descongelados por 3 horas a 20°C e recongelados por mais 24 horas a -15°C.

### **4.5.2 Congelamento rápido e congelamento lento**

Fígados de frango congelados a -15°C por 12 horas freezer.

Fígados de frango congelados a -196°C por 5 segundos e posteriormente mantidos em freezer a -15°C por 12 horas.

### **4.5.3 Diferença do tempo de armazenamento e diferença da temperatura de armazenamento**

Fígados de frango armazenados a -15°C e -10°C por 1 dia, 2 dias, 4 dias e 6 dias em freezer e congelador.

### **4.5.4 Descongelamento rápido e lento**

Fígados de frango congelados a -15°C por 24 horas e descongelados por 1 hora com as temperaturas de -5°C, 24°C e 30°C.

### **4.5.5 Irradiação antes ou depois do congelamento**

Fígados de frango irradiados com a dose de 1,5kGy e posteriormente congelados por 48 horas a -15°C.

Fígados de frango congelados por 48 horas e posteriormente irradiados com a dose de 1,5kGy.

#### **4.5.6 Comparação da irradiação com o congelamento**

Fígados de frango irradiados com 1,5kGy

Fígados de frango não irradiados e congelados por 48 horas a -15°C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Classificação visual e morfológica dos cometas

Com base nas amostras os cometas foram classificados em cinco tipos diferentes de acordo com sua morfologia.

Tipo 1- Células intactas ou com início de degradação, cauda curta, quando existente.

Tipo 2- Cauda ligeiramente menor que a cabeça, relativamente pouca degradação.

Tipo 3- Cauda comprida com extremo largo.

Tipo 4- Cauda comprida com separação da cabeça que já apresenta pouco DNA.

Tipo 5 – Pouco ou nenhum DNA na cabeça, encontrado mais frequentemente na cauda, indicando maior degradação de uma célula (FIG. 1).

Classificações semelhantes foram feitas por Villavicencio *et al.* (2000, 2004); Marín-Huachaca (2002); Araujo *et al.* (2004).

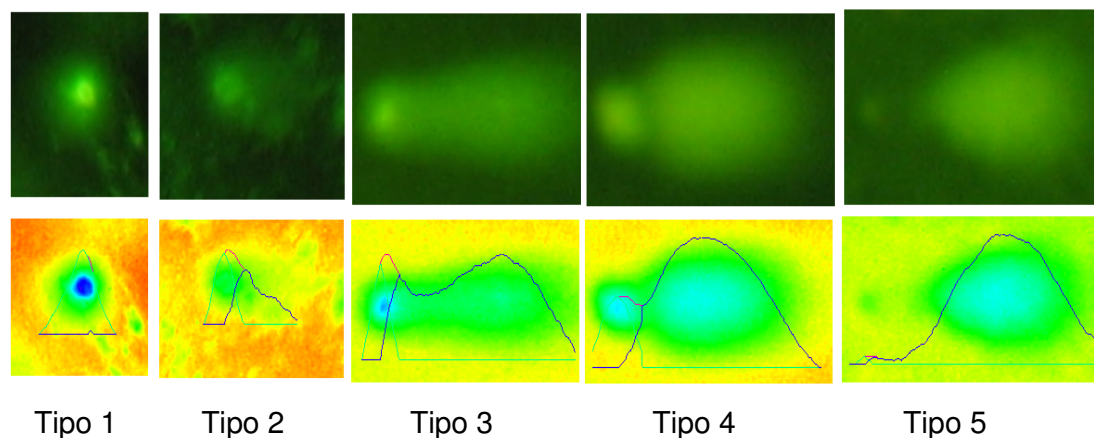


FIGURA 1 - Escala dos diferentes tipos de cometas. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

TABELA 1 - Médias dos diferentes tipos de cometas analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
Tipo 1	84.000.000	99.778.914	7.000.000	0.221084
Tipo 2	102.000.000	86.675.078	34.000.000	13.324.921
Tipo 3	231.000.000	78.558.397	135.000.000	21.441.603
Tipo 4	247.000.000	45.480.489	129.000.000	54.519.514
Tipo 5	267.000.000	21.122.617	149.000.000	78.877.383

Conforme dados da TAB. 1, a porcentagem de DNA na cabeça diminui com o aumento do tipo de cometa. Devido à grande concentração de DNA na cauda de cometas tipo 5, este pode ser considerado o mais degradado. Já cometas do tipo 1 possuem em média 99% de DNA na cabeça, indicando pouca degradação dessas amostras.

## 5.2 Cadeia do frio

### 5.2.1 Abuso de temperatura na cadeia do frio

Segundo Luciane & Carlos (2003), variações e falhas nas temperaturas das câmaras frias são problemas observados nas indústrias, e levam à depreciação da qualidade do produto. As mudanças no tamanho e formato dos cristais de gelo são causadas por variações periódicas da temperatura durante o armazenamento. Quanto maior for a amplitude dessas variações, maiores serão as mudanças e isso provocará uma destruição das células do alimento levando a um "gotejamento" durante o descongelamento.

A figura 2a representa células de em um alimento *in natura*, formando em sua maioria, cometas tipo 1. Amostras submetidas à cadeia do frio, sem abuso de temperatura, apresentaram 26% de cometas tipo 3 e 74% cometas tipo 2 (Fig. 2b, FIG. 3). Quando submetidas à cadeia com falha de 3h, formaram 13%



tipo 2, 29% tipo 3, 39% tipo 4 e 19% tipo 5 (FIG. 3), indicando que o alimento foi submetido a temperaturas impróprias ou a um longo período de armazenamento (FIG. 2c).

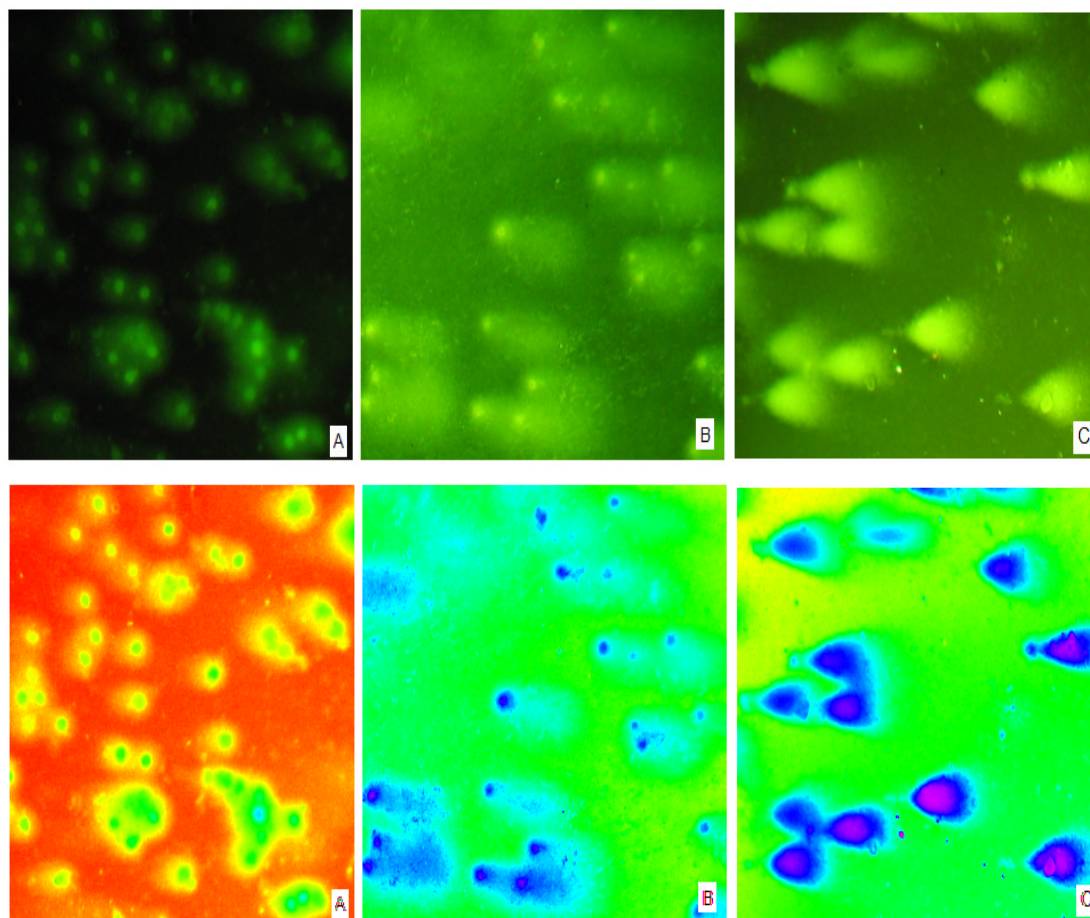


FIGURA 2 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango *in natura* (A), amostras armazenadas por 48 horas à -15°C (B) e amostras armazenadas por 48 horas à -15°C com 3 horas de falha de temperatura (C). Coloração: SyBr Gold; aumento de 100X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

Os cometas resultantes da cadeia do frio, com falhas de temperatura (FIG. 2c), são diferentes quando comparados àqueles submetidos ao correto congelamento, armazenamento e transporte (FIG. 2b). Estudos envolvendo a degradação de alimentos relataram que a relação temperatura/tempo de

exposição é importante na sua preservação, sendo que abusos de temperatura são prejudiciais. (Infoqualidade, 2008).

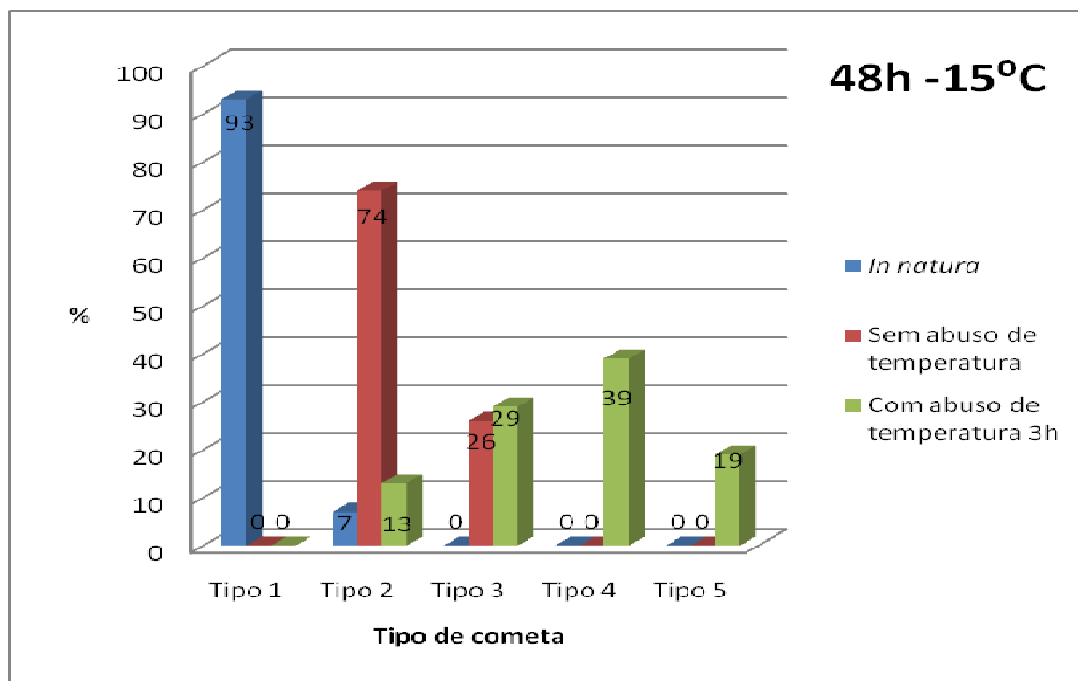


FIGURA 3 - Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango submetidas à cadeia do frio sem falhas de temperatura e amostras com falha de 3 horas na temperatura.

TABELA 2 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango submetidas à cadeia do frio sem falhas de temperatura e com falha de 3 horas na temperatura. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
<i>In natura</i>	18.000.000	94.655.156	0.000000	1.252.225
Sem falha	59.000.000	72.080.909	27.000.000	27.269.140
Com falha	81.000.000	31.360.302	41.000.000	69.116.902

As amostras submetidas à cadeia do frio sem falhas apresentaram em média 72% do DNA na porção da cabeça, quantidade muito maior do que a apresentada pelas amostras que sofreram falhas durante a cadeia do frio, em média 31% (TAB. 2). As variações da temperatura durante a estocagem são transferidas aos alimentos. Em determinados períodos, a temperatura da superfície dos alimentos pode ser superior à temperatura, da câmara de estocagem, ocasionando processos de sublimação, que podem ocasionar significativas perdas de peso, além de alterações na qualidade dos alimentos, com conseqüente perda econômica (Campañone *et al.*, 2001).

### **5.2.2 Degradação celular no congelamento rápido e lento**

Quanto à taxa de congelamento, conforme descrito por Silva (2007), se aceita que, através do congelamento rápido, são obtidos produtos finais de melhor qualidade, devido à formação, nos espaços intra e extracelulares, de cristais de gelo muito pequenos que causam poucos danos às células (Martin *et al.*, 1982).

Já no congelamento lento, ocorre uma maior quantidade de rupturas das membranas, uma vez que são formados, nos espaços intercelulares, cristais de gelo bem maiores. Concorrem também para essa ruptura a injúria celular, provocada pelo aumento da pressão osmótica, e a precipitação irreversível ou desnaturação dos constituintes coloidais da célula. Esse fato traz, em conseqüência, forte exsudação no descongelamento, com perda de elementos nutritivos (Pardi *et al.*, 1995).

Há controvérsias quanto à velocidade de congelamento e descongelamento adequada para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Stanwood & Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme da água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos e células. Em contraste, Dumet & Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulta em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos. Por outro lado, o congelamento lento resulta em danos ou morte celular,

porque ocorre uma desidratação osmótica extrema, quando a água intracelular movimenta-se para fora da célula compensando a água congelada dos componentes extracelulares.

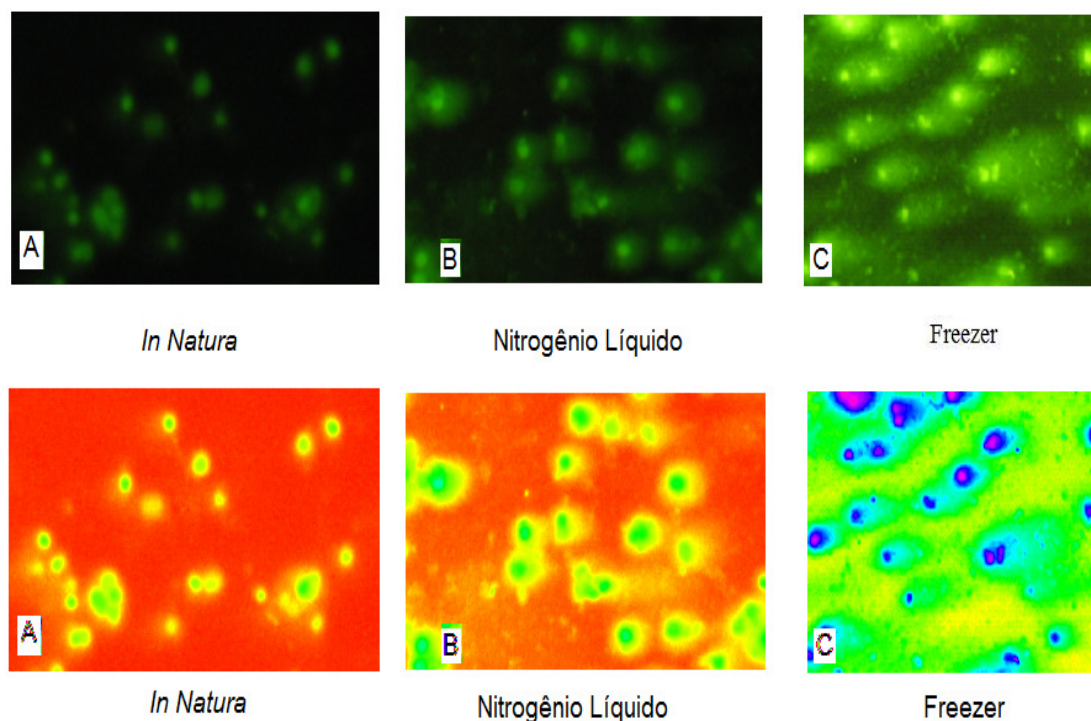


FIGURA 4 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango controle (A), congeladas em nitrogênio líquido (B) e congeladas no freezer (C). Coloração: SyBr Gold; aumento 100X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

Comparando amostras submetidas aos dois tipos de congelamento, foi possível identificar que aquelas congeladas no freezer formaram 8% de cometas tipo 1 (FIG. 4c e 5). As congeladas em nitrogênio líquido formaram 86% do mesmo tipo (FIG. 4b e 5), apresentando características próximas às *in natura*, que com menor degradação formaram 92% (FIG. 4a e 5). Isso indica que o congelamento rápido, antes do armazenamento, pode preservar melhor o alimento. Resultados semelhantes em relação à temperatura de congelamento foram apresentados pelo Meat Industry Services da Austrália (2000).

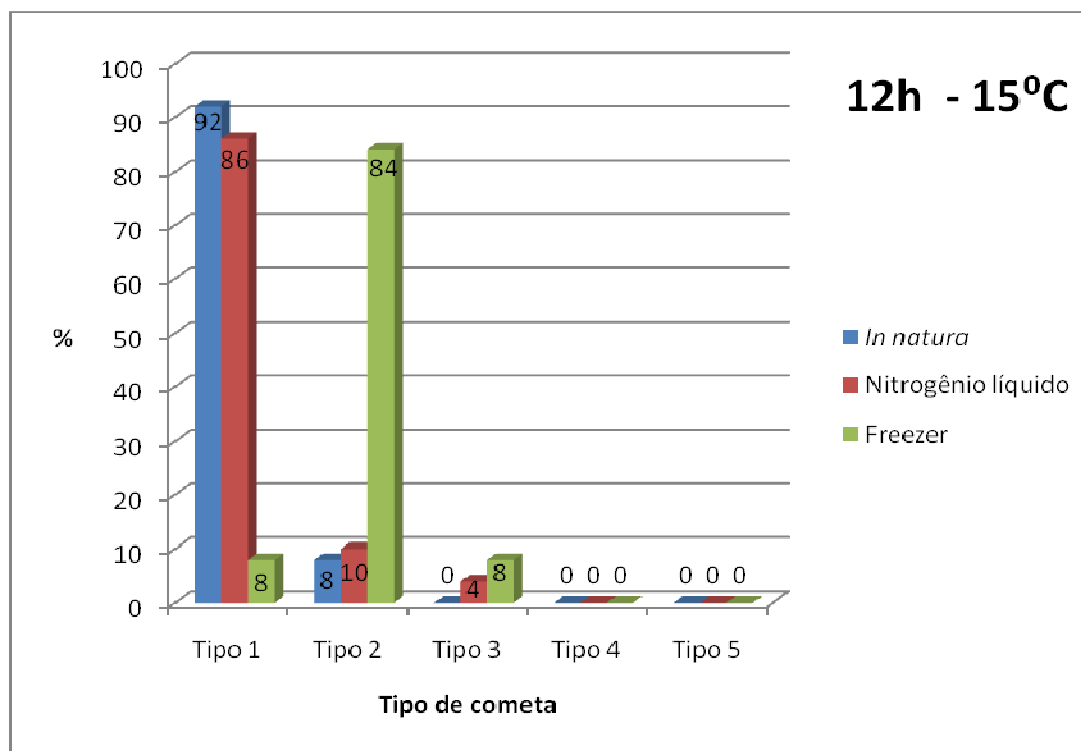


FIGURA 5 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, congeladas em nitrogênio líquido e congeladas em freezer.

TABELA 3 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, congeladas em nitrogênio líquido e congeladas em freezer. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

.	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
<i>In Natura</i>	17.000.000	99.988.097	4.000.000	0.011905
Nitrogênio L.	37.000.000	87.826.169	7.000.000	12.173.831
Freezer	59.000.000	57.778.568	23.000.000	42.221.432

Comparando a melhor velocidade de congelamento, amostras congeladas em nitrogênio líquido continham em média, 87% de DNA na cabeça e congeladas no freezer 57%, indicando que o congelamento rápido degradou menos o alimento (TAB. 3).

### 5.2.3 Armazenamento

#### 5.2.3.1 Degradação celular em função do tempo de armazenamento

Em relação às amostras (FIG. 6), foi possível verificar, em função do tempo de armazenamento, um aumento gradual da degradação celular. As *in natura* formaram, em sua maioria, 93% de cometas tipo 1 e 7% tipo 2 (FIG. 7). As armazenadas por 6 dias formaram, 68% de cometas tipo 5, 23% tipo 4 e apenas 9% tipo 3 (FIG. 6 e 7). Relatos parecidos sobre a influência do tempo de armazenamento na degradação celular dos alimentos foram feitos por Chesca *et al.* (2001); SEMUS/PMV (2006); Bianchini *et al.* (2007).

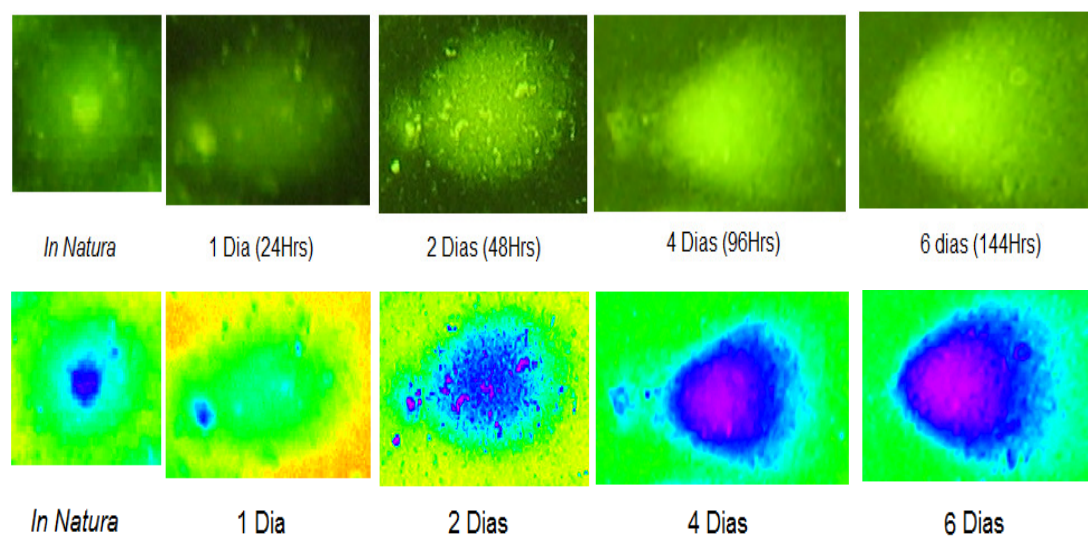


FIGURA 6 – Diferentes tipos de cometas formados em amostras de fígado de frango *in natura* e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

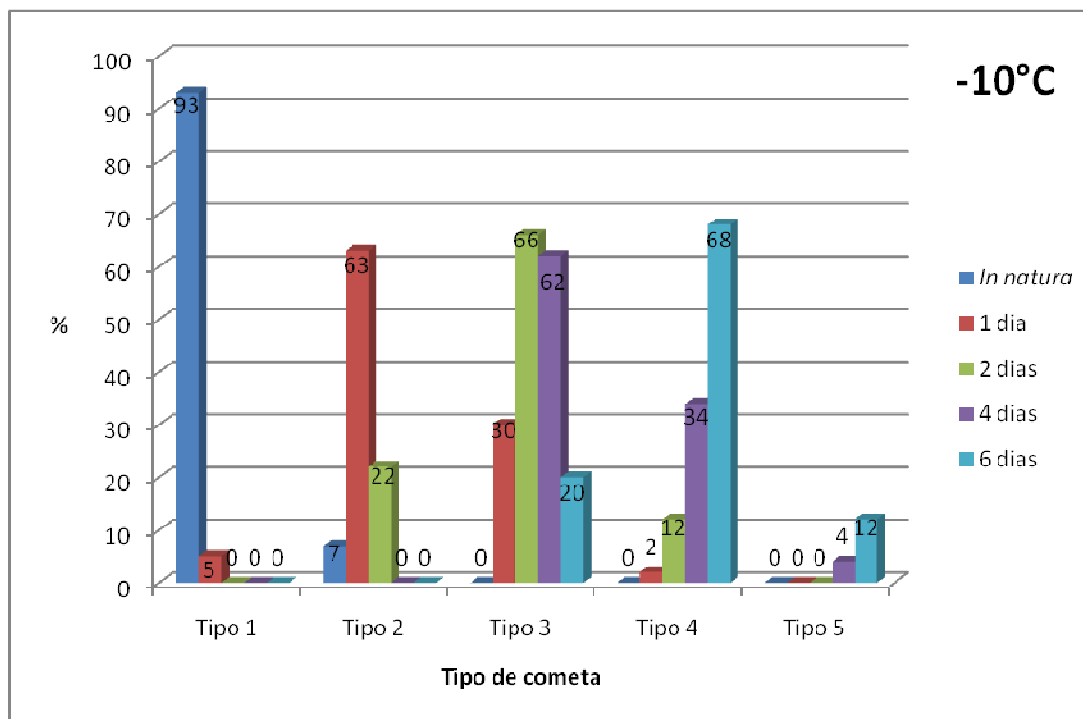


FIGURA 7 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura* e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias.

TABELA 4 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura* e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

.	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
<i>In natura</i>	29.000.000	99.999.118	4.000.000	0.000880
1 dia	166.000.000	70.694.542	70.000.000	29.305.461
2 dias	174.000.000	57.260.293	83.000.000	42.739.707
4 dias	194.000.000	49.955.057	94.000.000	50.044.943
6 dias	194.000.000	26.940.892	90.000.000	73.059.108

Em seis dias de armazenamento as mostras apresentaram diminuição de 60% de DNA na cabeça do cometa, chegando a perder 20% de DNA para a cauda em 2 dias (TAB. 4).

### **5.2.3.2 Degradação em função de diferentes temperaturas de armazenamento**

A temperatura é um dos mais importantes fatores que afetam a integridade dos alimentos por causa do seu efeito sobre as taxas de reações metabólicas (Cortez *et al.*, 2002), interferindo em processos, como respiração e produção de calor, maturação, produção de etileno, perda de massa e firmeza (Chitarra & Chitarra, 2005).

Similar ao descrito por Sanvido (2007), amostras armazenadas em diferentes temperaturas demonstraram que essa etapa da cadeia do frio tem grande influência na preservação, mostrando que pouca variação de temperatura no armazenamento pode degradar com intensidade diferente o mesmo alimento, formando assim, quantidades e tipos de cometas diferentes (FIG. 8a,b).

Amostras armazenadas em temperatura mais baixa (FIG. 8a) formaram, em todos os períodos, cometas de menor tamanho em relação às armazenadas em temperatura mais alta (FIG. 8b). Congeladas por 1 dia, as amostras com temperatura mais baixa formaram 70% de cometas do tipo 2, e por 6 dias, 27% tipo 3 (FIG. 9a). Armazenadas com a temperatura mais elevada, por 1 dia, formaram 63% tipo 2, e por 6 dias, 20% tipo 3 (FIG. 9b), indicando que temperaturas mais baixas degradaram menos as amostras.



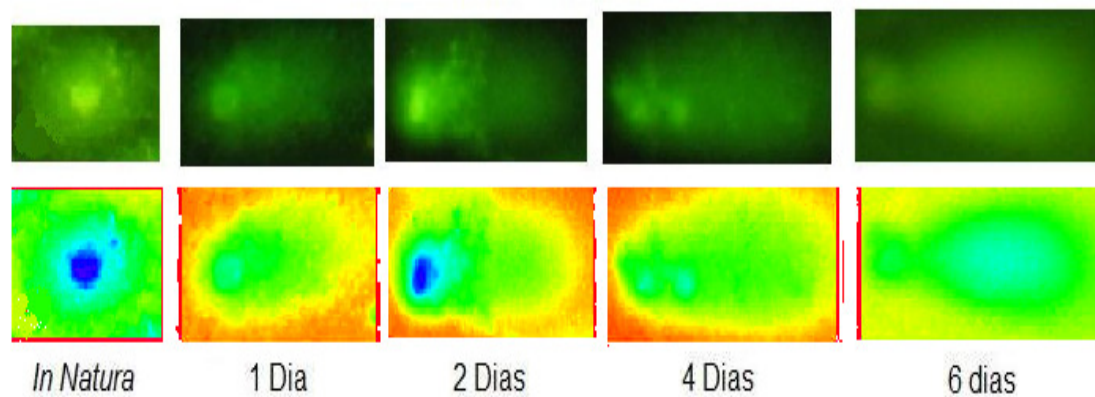


Figura 8 A - Temperatura de Armazenamento -15 °C

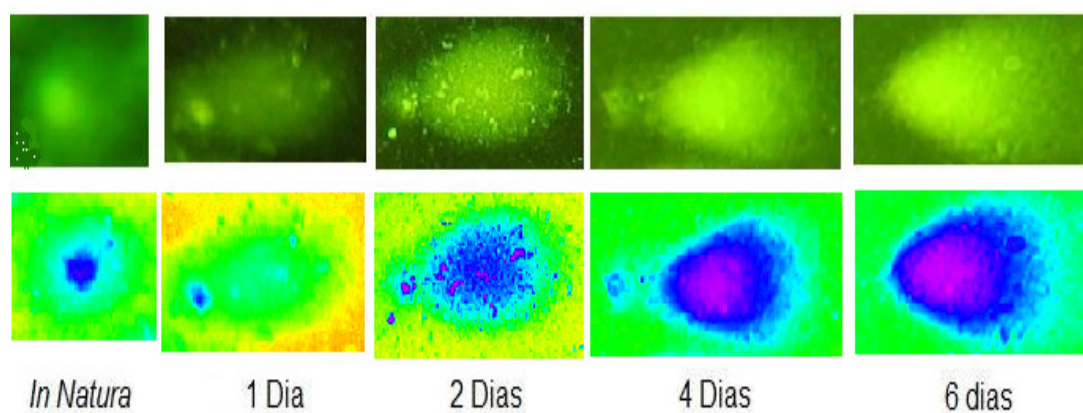


Figura 8 B - Temperatura de Armazenamento -10 °C

FIGURA 8 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango *in natura*, armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -15°C (A) e amostras armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -10°C (B). Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

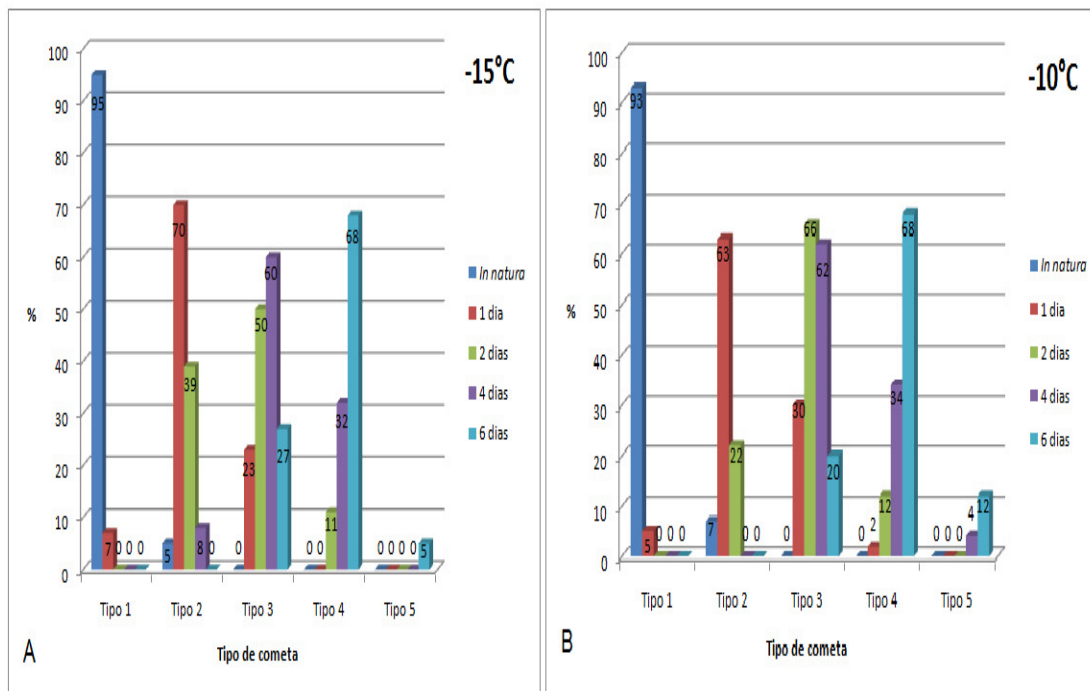


FIGURA 9 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -15°C (A) e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -10°C (B).

As amostras armazenadas com temperatura mais baixa degradaram menos que as com temperatura mais elevada. O armazenamento com temperatura inferior apresentou em média 10% a mais de DNA na cabeça em quase todos os períodos de armazenamento. Pouca diferença na temperatura de armazenamento provocou diferenças consideráveis na degradação das amostras, tamanhos dos cometas e quantidade de DNA encontrada na porção da cabeça (TAB. 5).

TABELA 5 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango *in natura*, armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -15°C e armazenadas pelo período de 1 a 6 dias com a temperatura de -10°C. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

. -15 graus	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
<i>In natura</i>	46.000.000	99.709.034	0.000000	0.290966
1 dia	151.000.000	76.616.788	63.000.000	23.383.211
2 dias	168.000.000	67.749.214	71.000.000	32.250.786
4 dias	197.000.000	52.122.593	93.000.000	47.877.407
6 dias	218.000.000	32.919.708	108.000.000	67.080.292

. -10 graus	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
<i>In natura</i>	29.000.000	98.999.118	4.000.000	1.000.880
1 dia	166.000.000	70.694.542	70.000.000	29.305.461
2 dias	174.000.000	57.260.293	83.000.000	42.739.707
4 dias	194.000.000	49.955.057	94.000.000	50.044.943
6 dias	194.000.000	26.940.892	90.000.000	73.059.108

#### 5.2.4 Degradação no descongelamento rápido e lento

Quando descongeladas, as amostras indicaram que diferentes temperaturas influem substancialmente na degradação celular do alimento (FIG.10 a,b,c). No descongelamento a 30°C (FIG. 10c), apresentaram 7% de cometas tipo 5 (FIG. 11), causando-lhes a maior degradação verificada. Em temperatura ambiente de 24°C, formaram apenas 2% de cometas tipo 5 (FIG. 10b, 11).

O melhor tipo de descongelamento foi a -5°C (FIG. 10a), pois não apresentaram cometas tipo 5 nem tipo 4, apenas 7% tipo 3 e 93% tipo 2 (FIG. 11), mantendo características mais próximas às originais. Indicações sobre a influência de diferentes temperaturas de descongelamento foram feitas por Li & Sun (2001) e Luciane & Carlos (2003).

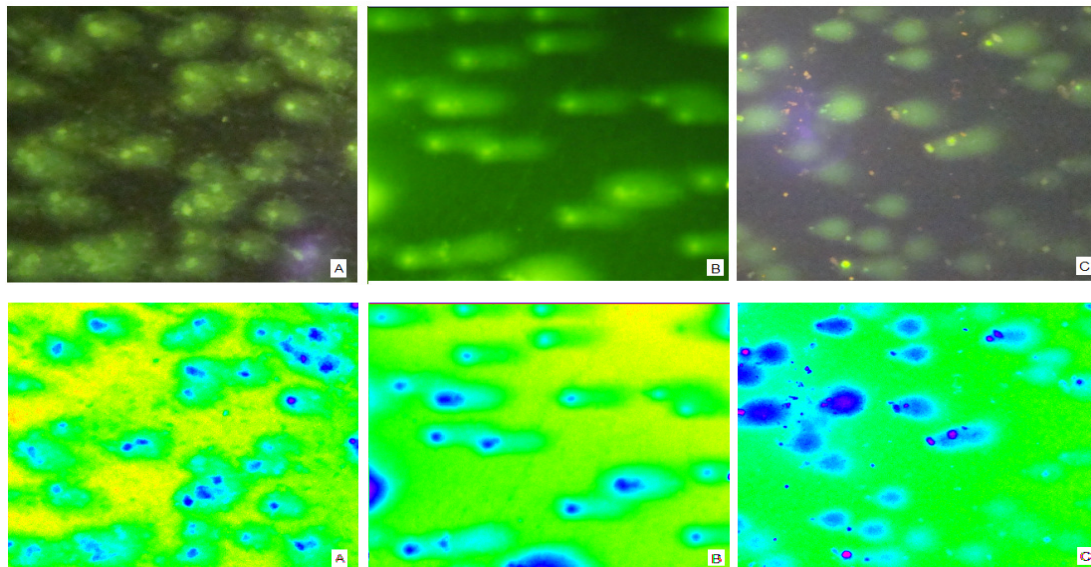


FIGURA 10 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango descongeladas em geladeira com a temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  (A), amostras descongeladas à temperatura ambiente de  $24^{\circ}\text{C}$  (B) e amostras descongeladas à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  (C). Coloração: SyBr Gold; aumento de 100X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

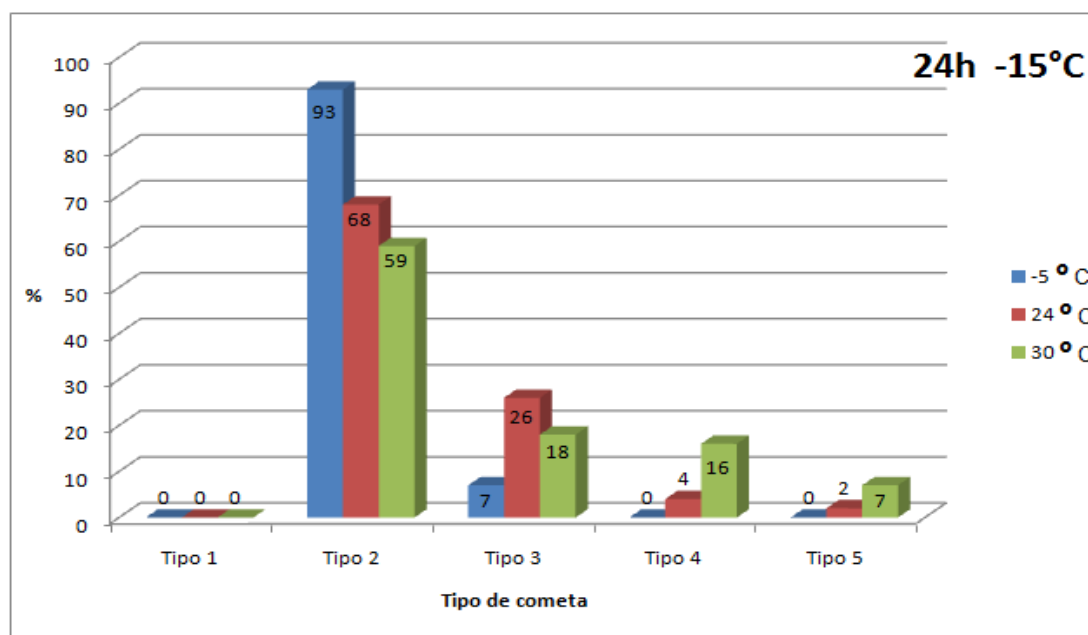


FIGURA 11 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango descongeladas em diferentes temperaturas.

TABELA 6 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango descongeladas em diferentes temperaturas. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

. °C	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
-5	35.000.000	84.594.464	7.000.000	15.405.537
24	47.000.000	68.055.283	44.000.000	31.944.719
30	52.000.000	43.995.706	24.000.000	56.004.296

A maior porcentagem de DNA encontrada na porção da cabeça foi nas amostras descongeladas com temperatura mais baixa (TAB. 6), indicando que no descongelamento, quanto maior a temperatura maior a fragmentação do DNA. Os alimentos devem ser descongelados de forma lenta, assim, fornecendo tempo e velocidade suficiente para que os constituintes celulares possam voltar ao seu estado inicial sofrendo o mínimo possível de degradação.

Já, quando os alimentos são descongelados de forma brusca, alta temperatura e conseqüentemente maior velocidade de descongelamento, o DNA da célula sofre maior degradação devido às mudanças rápidas do estado da água no meio extra e intracelular.

## 5.3 Irradiação

### 5.3.1 Influência da irradiação antes ou depois do congelamento de alimentos

Segundo Oliveira *et al.* (2005), a água, presente nos alimentos, quando irradiada, sofre radiólise, levando à sua ionização e consequente rearranjo eletrônico, o que pode ocasionar a produção de radicais livres. Estes, por serem altamente reativos, interagem quimicamente entre si ou com moléculas próximas e, como consequência, novas moléculas podem ser danificadas, passando a disputar elétrons com o meio. Portanto, os alimentos sólidos, por possuírem menor quantidade de água, são favorecidos com a irradiação.

Congeladas antes de serem processadas por radiação ionizante (FIG. 12a), as amostras de fígado de frango formaram 59% de cometas tipo 2 (FIG. 13), enquanto que as irradiadas antes do congelamento (FIG. 12b) formaram 45% do mesmo tipo de cometas (FIG. 13), indicando que a irradiação interfere diferentemente quando aplicada antes ou depois do congelamento.

Portanto, para empresas que trabalham com produtos congelados e irradiados, a melhor maneira de proceder diante o processo é congelar o alimento, como estudado, congelamento rápido do alimento e posteriormente ao congelamento, irradiar para assegurar a qualidade higiênica do alimento, para que ele fique livre de microorganismos.

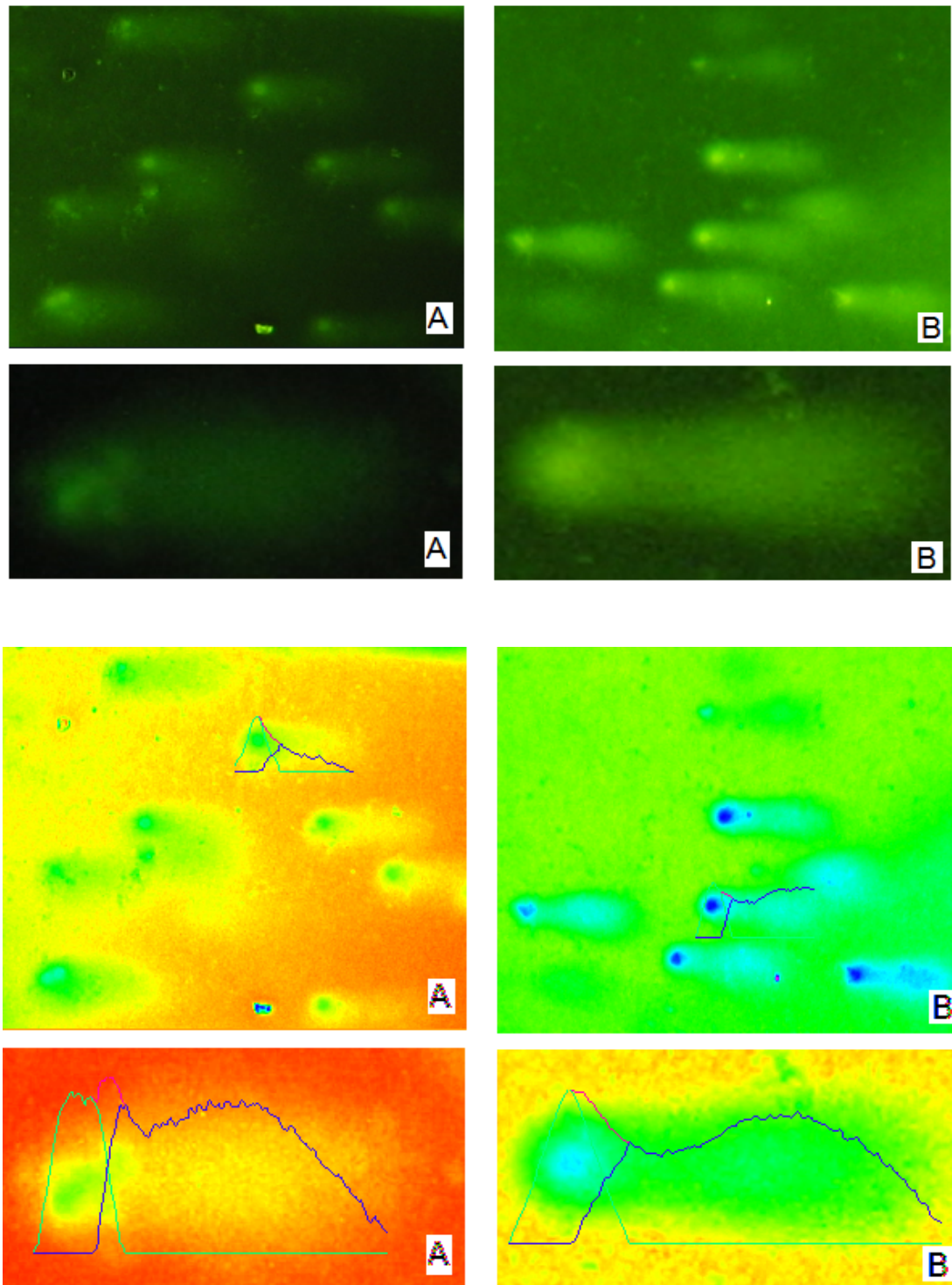


FIGURA 12 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango congeladas antes da irradiação (A) e amostras de fígado de frango congeladas depois da irradiação. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400 e 1000X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

TABELA 7 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango congeladas antes da irradiação e amostras congeladas depois da irradiação. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

. Processos: 48h., 1,5kGy., -15°C	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
congeladas antes da irradiação	43.000.000	66.278.942	16.000.000	33.721.060
congeladas depois da irradiação	65.000.000	50.040.034	42.000.000	49.959.969

Amostras que foram congeladas e posteriormente irradiadas mantiveram 16% a mais de DNA na cabeça que as irradiadas antes de serem congeladas (TAB.7), pelo fato da quantidade de água disponível no alimento congelado ser menor, a radiólise promovida pela irradiação terá menor influência quando o alimento a ser processado por radiação ionizante estiver mais sólido, congelado ou possuir menor quantidade de água.

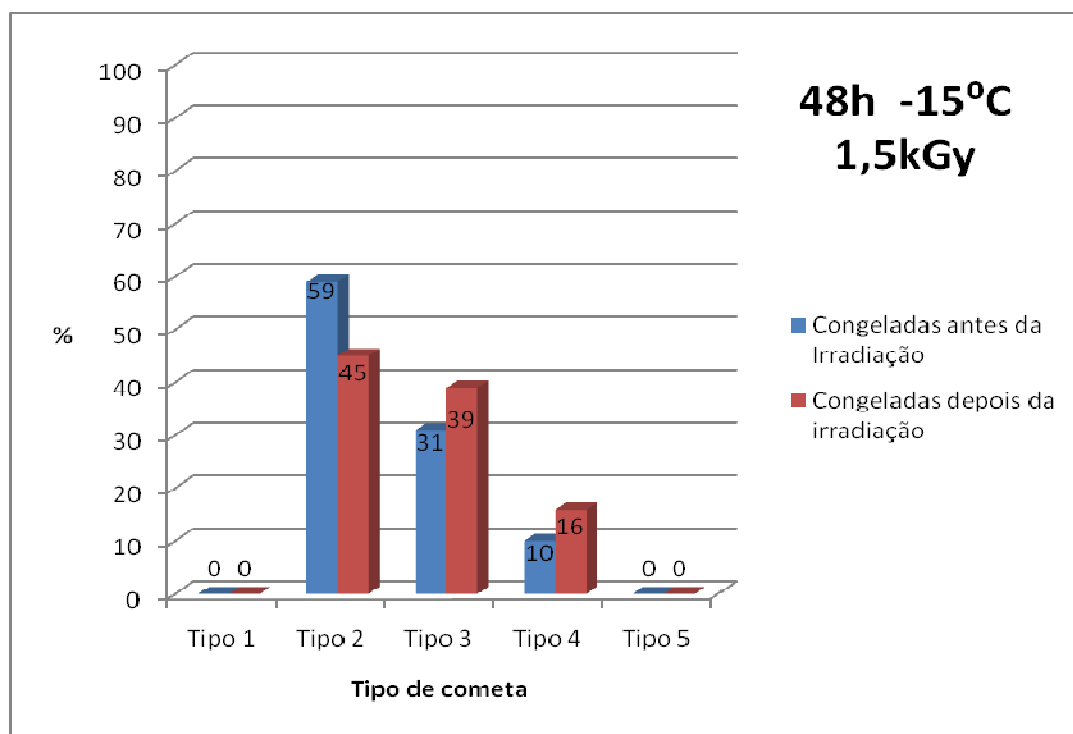


FIGURA 13 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango congeladas antes da irradiação e amostras congeladas depois da irradiação.



### 5.3.2 Degradação celular em função da dose de radiação

Analisando as amostras, foi possível verificar a degradação do fígado de frango *in natura*, em função do aumento da dose de radiação (FIG. 14). As amostras *in natura* formaram em torno de 93% de cometas tipo 1 (FIG. 15), que diminuiu sua frequência com o aumento da dose de radiação, e formando na dose mais alta 28% de cometas tipo 4, já com sinais de acentuada degradação (FIG. 15). A degradação de alimentos em função da dose de radiação foi relatada também por outros autores como Cerda *et al.* (1997); Villavicencio *et al.* (2000); Delincee *et al.* (2003); Ashfaq (2005); Marín Huachaca *et al.* (2005).

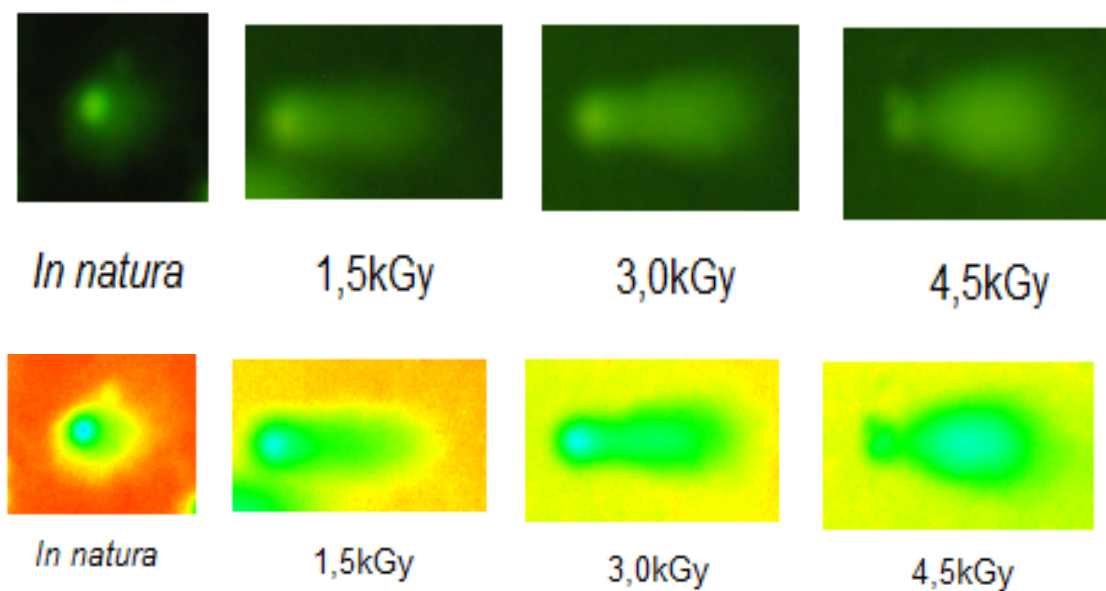


FIGURA 14 – Cometas encontrados em amostras de fígado de frango *in natura* e amostras irradiadas com 1,5kGy, 3,0kGy e 4,5kGy. Coloração: SyBr Gold; aumento de 400X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

TABELA 8 – Médias dos diferentes tipos de cometas formados em função do aumento da dose de radiação (controle, 1,5, 3,0 e 4,5kGy) aplicada em fígado de frango *in natura*. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
<i>In natura</i>	36.000.000	92.246.699	2.000.000	7.753.299
1,5kGy	82.000.000	75.747.162	46.000.000	24.252.836
3,0kGy	92.000.000	64.074.048	47.000.000	35.925.955
4,5kGy	94.000.000	48.448.496	44.000.000	51.551.504

A porcentagem de DNA encontrado na cabeça dos cometas variou de 93% nas amostras *in natura* até 48% nas irradiadas com 4,5kGy, diminuindo quase que 50% a quantidade de DNA na cabeça e aumentando de 7% (*in natura*) até 51% (4,5kGy) de DNA encontrado na cauda. Sendo possível verificar o aumento do tamanho dos cometas em função da dose de radiação.

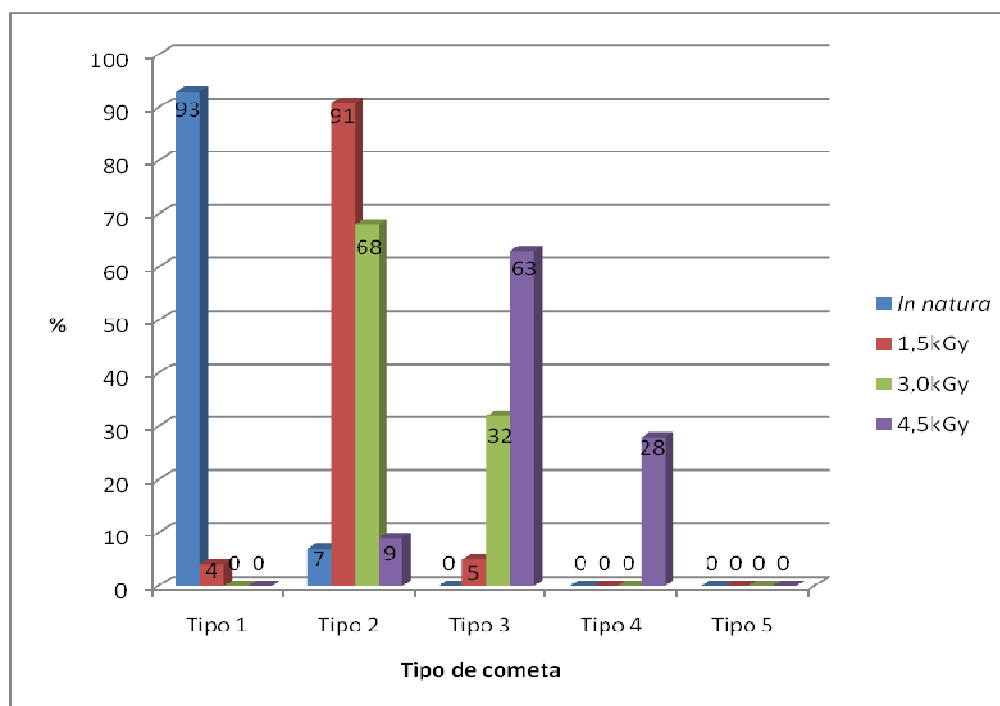


FIGURA 15 – Frequência de tipos de cometas em função do aumento da dose de radiação (controle, 1,5, 3,0 e 4,5kGy).

As amostras de fígado de frango irradiado com 1,5kGy formaram, em sua maioria, cometas parecidos àqueles formados em amostras congeladas por 48 horas, dificultando a diferenciação dos dois processos (FIG. 16).

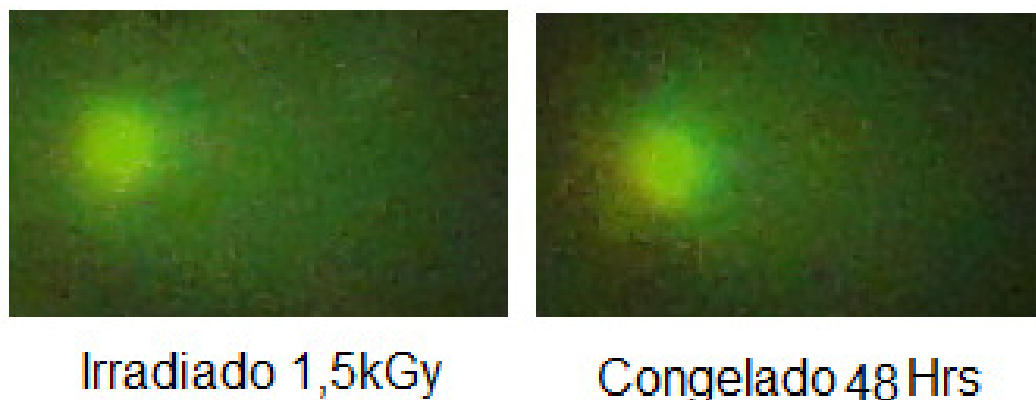


FIGURA 16 – Cometa encontrado em amostras de fígado de frango irradiadas com 1,5kGy e cometa encontrado em amostras de fígado de frango congeladas por 48 horas. Coloração SyBr Gold; aumento de 1000X; anodo à direita.

Um pequeno detalhe que, às vezes, pode ser identificado entre determinado tempo de congelamento e a irradiação em baixas doses é que essa última, em algumas amostras, foi possível encontrar poucas células do tipo 1 (4%) indicando pouca degradação (FIG. 17a), formando 91% de cometas tipo 2 e 5% tipo 3 (FIG. 18). O congelamento degrada todas as células por igual, não formando cometas tipo 1 (FIG. 17b), e sim 44% tipo 2, 46% tipo 3 e 10% tipo 4 (FIG. 18). O que possibilitou diferenciar os dois processos.

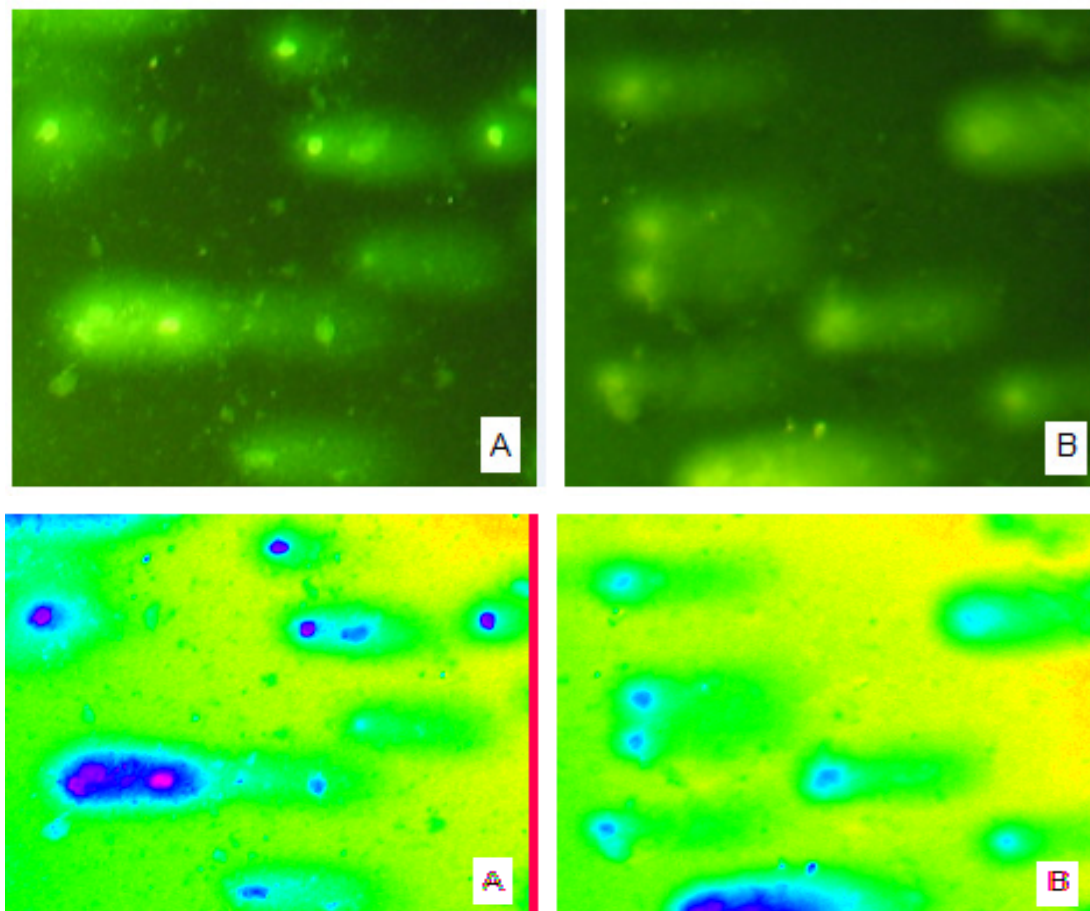


FIGURA 17 – Diferentes tipos de cometas encontrados em amostras de fígado de frango irradiado com 1,5kGy (A) e cometas encontrados em amostras de fígado de frango congeladas por 48 horas (B). Coloração SyBr Gold; aumento 400X; anodo à direita. Análise com Software AutoComet.

TABELA 9 - Médias dos diferentes tipos de cometas em amostras de fígado de frango irradiado com 1,5kGy e cometas encontrados em amostras de fígado de frango congeladas por 48 horas. Analisados com AutoComet software (TriTek Corporation).

	Tamanho do Cometa (px)	% de DNA na cabeça	Tamanho da cauda (px)	% de DNA na cauda
Irradiado 1,5kGy	69.000.000	79.832.664	40.000.000	20.167.339
Congelado 48h	80.000.000	77.661.129	45.000.000	22.338.873

Quando comparados, a irradiação e o congelamento produzem quase o mesmo resultado em relação ao tamanho dos cometas, a porcentagem de DNA na cabeça e na cauda, mas em todas as medidas a irradiação, pelo fato de deixar células intactas, a irradiação apresentou menor degradação que a irradiação (TAB. 9).

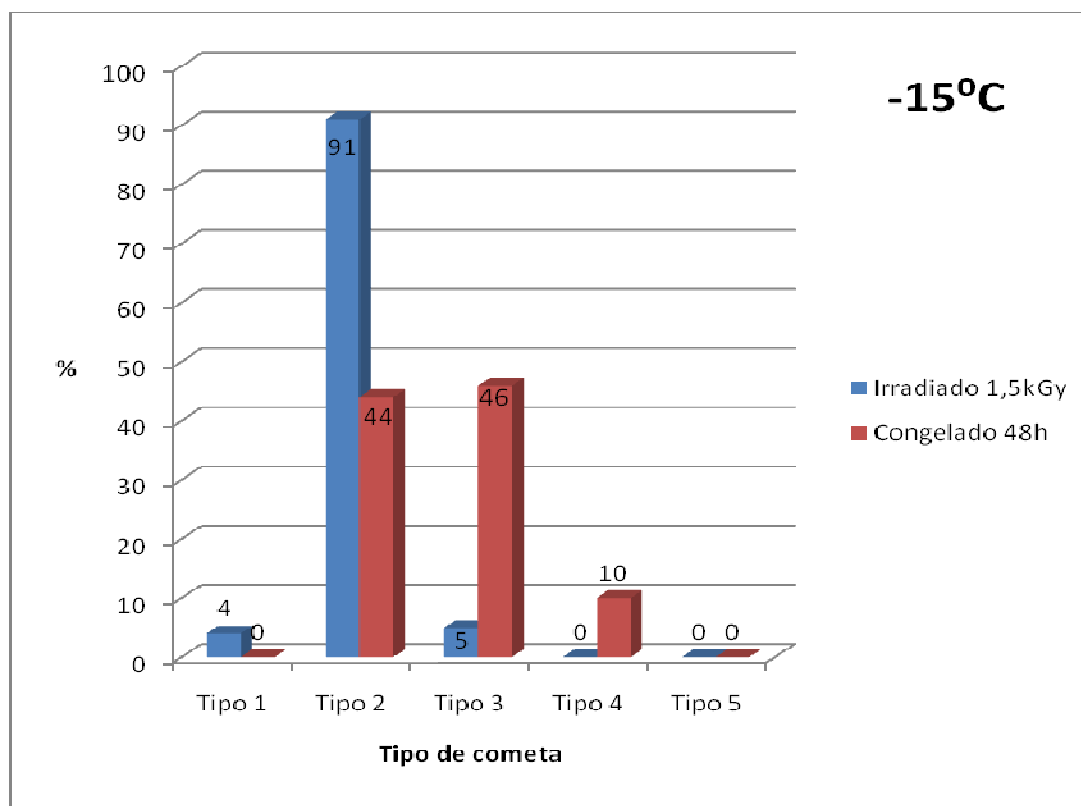


FIGURA 18 – Frequência de tipos de cometas em amostras de fígado de frango irradiadas com 1,5kGy e amostras congeladas 48 horas.

## **7 CONCLUSÕES**

- O teste do cometa identificou falhas de temperatura de conservação do fígado de frango ocorridas na cadeia do frio.
- O congelamento rápido do fígado de frango foi mais eficaz que o congelamento lento.
- O descongelamento lento do fígado de frango foi mais eficaz que o descongelamento rápido.
- O tempo de armazenamento do fígado de frango teve grande influência na sua degradação.
- A temperatura no armazenamento do fígado de frango teve grande influência na sua degradação.
- A irradiação quando empregada posteriormente ao congelamento do fígado de frango degradou menos do que quando empregada anteriormente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF - **Associação Brasileira Dos Produtores E Exportadores De Frango**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 20 abril 2008.

ABERC - Associação Brasileira de Empresas de Refeições Coletivas. **Manual ABERC de práticas da elaboração e serviços de refeições para coletividade**. São Paulo, 7.ed, 2003.

ABIAF - **Associação Brasileira da Indústria de Armazenagem Frigorificada**. Disponível em: <<http://www.abiaf.org.br/index2.htm>>. Acesso em: 10 de agosto de 2006.

ANDRADE, E. C. B.; BARROS, A. M.; MELLO, V. S.; TAKASE, I. Determinação dos teores de cobre em diferentes extratos de hortaliças do tipo A e B. **Food Sci Technol.**, v. 24, p. 277-281, 2004.

ANDREWS, L. S.; AHMEDNA, M.; GRODNER, R. M.; LIUZZO, J. A; MURANO, P. S.; MURANO, E. A.; RAO, R. M.; SHANE, S.; WILSON, P. W. Food preservation Using ionizing radiation. **Environ Contam Toxicol.**, v. 154, p. 1-53, 1998.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: fevereiro 2007.

ARAÚJO, M. M.; MARÍN-HUACHACA, N. S.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Identification of irradiated refrigerated pork with the DNA comet assay. **Radiat Phys Chem.**, v. 71, p. 185-187, 2004.

ASHFAQ, A. KHANA, H.; KHAN, M.; DELINCÉE, H. DNA Comet Assay - a rapid screening method for detection of irradiated cereals and tree nuts. **Food Control.**, v. 16, p. 141-146, 2005.

BALLOU, R. H. **Logística empresarial: transportes, administração de materiais e distribuição física**. 2.ed. São Paulo, SP.: Atlas, 1995.

BARROS, A. C.; LAMY-FREUND, M. T.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; DELINCÉE, H.; ARTHUR, V. Identification of irradiated wheat by germination test, DNA comet assay and electron spin resonance. **Radiat Phys Chem.**, v. 63, p. 423-426, 2002.

BECKER, B. R.; FRICKE, B. A. Freezing times of regularly shaped food items. **Int. Comm. Heat Mass Transfer.**, v. 26, n. 5, p. 617-626, 1999.

BENOIR T. W. **Conceito formulado de cadeia do frio**. (2006). Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/9/279.pdf>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.

BIANCHINI, A; KITASAWA, S. E. **Influência da Contaminação Fúngica e dos Fatores Abióticos sobre a Acidez Lipídica durante o Armazenamento de**

**Arroz.** Disponível em: <<http://64.233.169.104/search?q=cache:rCgXOukcBsJ:www.irga.rs.gov.br/arquivos/20070822211256.pdf+altera%C3%A7%C3%B5es+armazenamento+arroz&hl=pt-R&ct=clnk&cd=2.,2007>>. Acesso em: 20 de novembro de 2008.

BLUMENTHAL, M. M. How food packaging affects food flavor. *Food Technol.*, Chicago, v. 1, n. 1, p. 71-74, 1997.

BOLDER, N. M. Descontamination of meat and poltrycarcasses. *Food Sci Technol.*, Shiffield, v. 8, n. 7, p. 221-227, 1997.

BRASIL. Lei nº 1.283, de 18 de Dezembro de 1950. Congresso Nacional. **Dispõe sobre a Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal.** 1950.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Resolução - RDC n.21, de janeiro de 2001. **Irradiação de alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 de janeiro de 2001. Disponível em [http://anvisa.gov.br/legis/resol/21\\_01rdc.htm](http://anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm). Acesso em 26 de janeiro de 2007.

BRASIL. Decreto-Lei n. 986, de 21 de outubro de 1969. **Normas básicas sobre alimentos dos Ministérios da Marinha de Guerra, do Exército e da Aeronáutica Militar.** Diário Oficial da União. 1969 21 out; Seção 1.

BRASIL. Decreto nº72.718, de 29/ de agosto de 73. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/72718\\_73.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/72718_73.htm)>. Acesso em: 27/04/2008.

BRASIL. Resolução nº 10, de 31 de julho de 1984. **Dispõe sobre instruções para conservação nas fases de transporte, comercialização e consumo dos alimentos perecíveis, industrializados ou beneficiados, acondicionados em embalagens.** Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. 1984.

BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. MAPA. **Aprovou o regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carnes de aves, com o intuito de coibir a fraude de adição de água em carcaças.** 1998.

BRASIL. Portaria CVS-6/99, de 10 de março de 1999. Diretora Técnica do Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Diário Oficial da União. **Aprova o Regulamento Técnico, que estabelece os Parâmetros e Critérios para o Controle Higiênico-Sanitário em Estabelecimentos de Alimentos.** 1999.

CAMPAÑONE, L. A.; SALVADORI, V. O.; MASCHERONI, R. H. Weight loss during freezing and storage of unpackaged foods. *J. Food Engin.*, n. 47, p. 69-79, 2001.



CDC - **Centers for Disease Control and Prevention**, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, U.S.A.. 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/Features/SmallpoxEradication/>>. Acesso em: 21 de janeiro de 2008.

CERDA, H.; HOFSTEN, B.; JOHANSON, K. J. Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. In: LEONARDI, M.; BELLARDO, J. J.; RAFFI, J. Editors, Recent advances of new methods of detection of irradiated food. Proceedings of the workshop, 24–26 September 1991, Ancona, Commission of the European Communities, Luxembourg, p. 401–405, 1993.

CERDA, H.; DELINCÉE, H.; HAINE, H.; RUPP, H. The DNA “comet assay” as a rapid screening technique to control irradiated food. **Mutat Res.**, 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.**, v. 31, p. 89-92, 1998a.

CERDA, H. Detection of irradiated frozen food with the DNA Comet Assay: Interlaboratory Test. **J. Sci Food Agric.**, v. 76, p. 435-442, 1998b.

CERDA, H.; KOPPEN, G. DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. Zeitschrift Fur Leben-smittel-Untersuchung Und-Forschung A. **Food Res Technol.**, p. 22–25. 1998.

CHESCA, A. C.; ANDRADE, S. C. B.; DIANGELIS, C. E.; SILVEIRA, M. Levantamento das Temperaturas de armazenagem de carnes em açougues e supermercados de Uberaba, MG. **Rev Hig Alim.**, São Paulo, v. 15, n. 84, p. 51-55, 2001.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. rev. e ampl. **Lavras**: UFLA, 2005.

CHOUCROUN, P.; GILLET, D.; DORANGE, G.; SAWICKI, B.; DEWITTE, J. D. Comet assay and early apoptosis. **Mutat Res.**, v. 478, p. 89-96, 2001.

CNA - **Confederação da agricultura e pecuária do brasil**. Publicações indicadores rurais. Brasília. n. 72, nov./dez, 2006. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/cna/index.wsp>>. Acesso em: 25 janeiro 2007.

COLEPARMER. **Temperature, labels and crayons** – Disponível em: <[http://www.coleparmer.com/Catalog/0506\\_pdf/c-1938.pdf](http://www.coleparmer.com/Catalog/0506_pdf/c-1938.pdf)>. Acesso em: 19 de novembro de 2008.

CORTEZ, L. A. B.; HONÓRIO, S. L.; MORETTI, C. L. Resfriamento de frutas e hortaliças. **Embrapa-Hort.**, Brasília, DF. p. 428, 2002.

CRAWFORD, L. M; REHE, S. G. Assuring the safety of irradiated food. **Food Control.**, Surrreg. p. 207-210, 1990.

DELINCÉE, H. **Application of the DNA “comet assay” to detect irradiation treatment of foods.** In: Detection Methods for Irradiated Foods -Current Status. England: Cambridge, UK, 1996.

DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J. Protein quality of irradiated Brazilian beans. **Radiat Phys Chem.**, v. 52, n. 1-6, p. 43-48, 1998.

DELINCÉE, H. Detection of food treated with ionizing radiation. **Food Sci Biotechnol.**, v. 9, n. 2, p. 73–82, 1998.

DELINCÉE, H. Analytical methods to identify irradiated food. **Radiat Phys Chem.**, v. 63, p. 455–458, 2002a.

DELINCÉE, H. Rapid detection of irradiated frozen hamburgers. **Radiat Phys Chem.**, v. 63, n. 3-6, p. 443-446, 2002b.

DELINCÉE, H.; KHAN, A. A.; CERDA, H. Some limitations of the comet assay to detect the treatment of seeds with ionising radiation. **Food Res Technol.**, v. 216, p. 343–346, 2003.

DEL-MASTRO, N. L. Development of food irradiation in Brazil. **Prog Nucl Energy.**, USA, v. 35, n. 3, p. 229-248, 1999.

DIEHL, J. F. **Safety of Irradiated Foods.** 2nd ed. Marcel Dekker, New York. p. 198, 1995.

DIEHL, J. F. Food Irradiation – past, present and future. **Rad Phys Chem.**, v. 63, p. 211-215, 2002.

DUARTE, R. C. ; ARAÚJO, M. M. ; FANARO, G. B ; PANELLI, V. Y. G. T. ; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. . Comet Assay to verify the quality of irradiated frozen chicken giblets. In: **Recent Developments and Applications of Nuclear Technologies**, 2008. Conference Abstracts of Recent Developments and Applications of Nuclear Technologies. Varsóvia : Institute of Nuclear Chemistry and Technology, 2008. v. 01. p. 36-36.

DUARTE, R. C. ; ARAÚJO, M. M. ; SALUM, D. C. ; MARCHIONI, E. ; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. . Effects of the ionizing radiation, freezing and defrosting time in liver chicken cells quality. **Radiat Phys Chem**, v. 78, p. 631-634, 2009.

DUMET, D.; BENSON, E. E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: ENGELMANN F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application.** Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). p. 43-56, 2000.

FAIRBAIRN D.W., OLIVE, P.L., O'NEIL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.*, v. 339, p. 37-59, 1995.

FANARO, G. B. ; ARAÚJO, M. M. ; THOMAZ, F. S. ; DUARTE, R. C. ; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. . COMPARISON OF TREATMENT IN SOYBEAN GRAINS BETWEEN 60CO AND E-BEAMS APPLICATIONS. In: *International Nuclear Atlantic Conference*, 2007, Santos, São Paulo. International Nuclear Atlantic Conference, 2007.

FARKAS, J. Irradiation for better Foods. *Trends Food Sci Technol.*, v. 17, p. 148-152, 2006.

FAULLIMEL, C.; ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; GUTERL, P.; MARCHIONI, E. DNA Comet Assay for detection of Time-Temperature abuse during the Storage of Poultry. *J. Food Prot.*, v. 68, n. 7, p. 1414 – 1420, 2005.

FDA - *U S Food and Drug Administration*. Disponível em: < <http://www.fda.gov>>. Acesso em: 20 de setembro de 2008.

FSIS - Food Safety and Inspection Service. Food irradiation of meat food products. *Fed Reg.*, n. 64, p. 72149-72166, 1999.

FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem.*, v. 57, p. 51-55, 1996.

GIANNAKOUROU, M. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS.; G. J. E.; TAOUKIS, P. S. Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. *Int J. Food Microbiol.*, v. 102, p.323-336, 2005.

GIROUX, M.; LACROIX, M. Nutritional adequacy of irradiated meat: a review. *Food Res Int.*, v. 31, n. 4, p. 257-264, 1998.

GÓES, J. A. W.; SILVA, A. V. D.; FRACALOSI, L. M.; KUWANO E. A. Condições de alimentos armazenados por refrigeração na cidade de Salvador, Bahia. *Rev Hig Alim.*, São Paulo, v.18, n. 125, 2004.

GREENBERG, R. A. Irradiated Foods. New York: *American Coun Sci Health.*, 4ed, p. 32, 1996.

HOERR, F.J.; RIDDELL, C. Avian histopathology. *Pensylvania*: Library of Congress. p.143-166, 1996.

IAEA. Food irradiation. *Proceedings of a Symposium*, Karlsruhe, International Atomic Energy Agency, Vienna, 6–10 June 1966.

ICGFI - INTERNATIONAL CONSULTIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION. *Code of good irradiation practice for the control of pathogenic microorganisms in poultry feed*. Vienna, Austria, ICGFI, 1995.

IDEC - **INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR**. 2004. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/files/pk%20teste%20dos%20frangos%20congelados.doc>>. Acesso em: 20 de setembro de 2008.

INFOQUALIDADE – Segurança e qualidade alimentar. **Monitorização Térmica dos alimentos**. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-05/Page%2060.pdf>>. n.5, p. 55-62. Acesso em: 12 de novembro de 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza. 3.ed, p. 804, 1994.

KAH, R.; HILDERBRANDT, A. G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food Chem Toxicol.**, v. 24, n. 10/11, p. 1007-1014, 1996.

KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring. **Mutat Res.**, v. 463, p. 13-31, 2000.

KHAN, A. A.; KHAN, H. M.; DELINCÉE, H. Detection of radiation treatment of beans using DNA comet assay. **Radiat Phys Chem.**, v. 63, p. 407-410, 2002.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KOPPEN, G. Improved protocol for the plant comet test. **Comet Newsl.**, v. 6, p. 2-3, 1997.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat. A review. **Food Microbiol.**, v. 8, p. 267-291, 1991.

LAMUKA, P. O.; SUNKI, G. R.; CHAWAN, C. B.; RAO, D. R.; SHACKELFORD, L. A. Bacteriological quality of freshly processed broiler chickens as affected by carcass pretreatment and gamma irradiation. **J. Food Sci.**, Chicago, v. 57, n. 2, p. 330 – 332, 1992.

LEE, N. Y.; JIN, O. C.; SHIN, D. H.; KIM, W. G.; BYUN, M. W. Effect of  $\gamma$ -irradiation on pathogens inoculated into ready-to-use vegetables. **Food Microbiol.**, v. 23, p. 649-656, 2006.

LI, B.; SUN, D. W. Novel methods for rapid freezing and thawing of foods – a review. **J. Food Engin.**, 2001.

LUCIANE, M. C.; CARLOS, P. H. CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO – SUA INFLUÊNCIA SOBRE OS ALIMENTOS. **Vet.**, Rio Grande, v. 13, p. 53-66, 2003.

LYON, B.G.; LYON, C.E. Color of uncooked and cooked broiler leg quarters associated with chilling temperature and holding time. *Poultry Sci.*, v. 81, n. 12, p. 1916-1920, 2002.

MALYAPA, R. S.; BI, C.; AHERN, E. W.; ROTI ROTI, J. L. Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiat Res.*, v. 194, p. 396-400, 1998.

MARCHIONI, E. Detection of irradiated foods, *New Food*, v. 4, p. 25-28, 2007.

MARÍN-HUACHACA, N. S. *Teste do Cometa e teste de germinação na detecção do tratamento de alimentos com a radiação ionizante*. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações. São Paulo, 2002.

MARÍN-HUACHACA, N. S.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Identification of gamma-irradiated papaya, melon and watermelon. *Radiat Phys Chem.*, v. 71, p. 191-194, 2004.

MARÍN-HUACHACA, N. S.; DELINCÉE, H.; MANCINI, F. J.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Use of the DNA Comet Assay to detect beef meat treated by ionizing radiation. *Meat Sci.*, v. 71, p. 446-450, 2005.

MARTIN, R. E.; FLICK, G. J.; HEBARD, C. E.; WARD, D. R. Chemistry and biochemistry of marine food products. *Westport*. AVI, p. 474, 1982.

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. *Mutat Res.*, v. 288, p. 47-63, 1993.

MEAT INDUSTRY SERVICES DA AUSTRÁLIA. *Food Science Australia*. Meat Industry Services. 2000. Disponível em: <<http://www.meatupdate.csiro.au>>. Acesso em: 10 de setembro de 2008.

MIYAHARAA, M.; SAITOB, A.; ITOC, H.; TOYODAA, M. Identification of low level gamma-irradiation of meats by high sensitivity comet assay. *Radiat Phys Chem.*, v. 63, p. 451-454, 2002.

MIYAGUSKU, L.; CHEN, F.; LEITÃO, M. F. F.; BAFFA, O. Avaliação microbiológica e sensorial da vida-útil de cortes de peito de frango irradiados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v..23, p. 7-16, 2003.

NEVES, F. L. A. C. Resfriamento, congelamento e estocagem de alimentos. São Paulo. *Inst Frio.*, 1991.

OLIVE, P. L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 75, n. 4, p. 395-405, 1999.

OLIVEIRA, L. C.; MEDEIROS, I. M. M. A.; ZAMBONI, C. B.; MASCHIO, M. A. **XVI Simpósio Nacional de Ensino de Física - SNEF**, Rio de Janeiro - RJ - 24 a 28 de janeiro, Evento Científico - Resumo - Nacional – 2005.

OLIVEIRA, P. A.; SIMON, E. J. Indicadores de Consumo de Energia Elétrica e Produção Agropecuária de Agrupamentos com Municípios do Estado de São Paulo. In: Congresso da sociedade brasileira de economia, Administração e Sociologia Rural, 5., 2008, Rio Branco – Acre. **Anais eletrônicos**. Acre: Sober, 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/269.pdf>>. Acesso em: 13 fev, 2009.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res. Commun.** v. 123, p. 291-298, 1984.

PANETTA, J. C. Calor e Alimentos. Os cuidados devem ser redobrados. **Rev Hig Alim.**, São Paulo, v. 12, n. 53, 1998.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: Ed. da UFG, 1995. v. 1: **Ciêhig Carne.**, tecnologia da sua obtenção e transformação.

PARK, J. H.; HYUN, C. K.; JEONG, S. K.; YI, M. A.; JI, S. T.; SHIN, H. K. Use of the single cell gel electrophoresis assay (Cometassay) as a technique for monitoring low-temperature treated and irradiated muscle tissues. **International J. Food Sci. Technol.**, v. 35, p. 555–561, 2002.

PAUL, P.; VENUGOPAL, V.; NAIR, P. M. Shelf-life enhancement of lamb meat under refrigeration by gamma irradiation. **J. Food Sci.**, v. 55, p. 865 – 866, 1990.

POÇAS, M. F.; DELGADO, T. F. Embalagens Activas e Inteligentes. Promessas à Vista. Departamento de Embalagem da Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa. **Seg Qual Alim.**, N. 4, P. 44-45, Maio 2008.

POÇAS, M. F. F.; DELGADO, T. F.; OLIVEIRA, F. A. R. **Smart Packaging Technologies for Fruits and Vegetables**. Chap. In: Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods. KERRY, J.; BUTLER, P. (Ed.). John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-02802-5. Abril 2008.

PONTES, A. P. Programa de controle de Salmonella em abatedouros de aves. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. Santos, SP. **Anais**. São Paulo: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. p.102. 2004.

PORTAL DO AGRO NEGÓCIO. **Consumo do frango emparelha com o da carne bovina**. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=7816>>. Acesso em: 23 de agosto de 2009.

RADOMYSKI, T.; MURANO, D. G. O.; MURANO, P. S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation review. **J. Food Protect.**, Ames, v. 57, n. 1, p. 73-86, 1994.

RODRIGUES, M. M.; BERTIN, M. B.; ASSIS, L.; DUARTE, E.; AVELAR, A.; PAIXÃO, M. S. M. Índices de Rotavírus na etiologia de um surto de infecção de origem alimentar. **Sciel.**, São Paulo, 2004.

ROÇA, R. O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: UNESP, 1999.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromatogr B.**, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOX, P.; COLLINS, A. R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. **Mutat Res.**, v. 337, p. 57-60, 1995.

SANTOS, A. F.; VIZEU, D. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; SANTOS, H. C. Influence of post-mortem aging in tenderness of chicken breast fillets. **Sci. Rur.**, v. 34, n. 3, p. 905-910, 2004.

SANVIDO, G. B. **Effects of raw milk storage time and pasteurized milk storage temperature on milk shelflife**. UNICAMP - Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP, 2007.

SCHOFIELD, G. A review. Emerging food-borne pathogens and their significance in chilled foods. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 72, p. 267-273, 1992.

SEMUS/PMV - Secretaria municipal de Saúde /Prefeitura municipal de Vitória-ES. **As Boas Práticas na Manipulação de Alimentos**: Artesãos da Culinária, 2006. Disponível em: <[www.vitoria.es.gov.br/secretaria/saude/cartilha\\_boas\\_praticas\\_artesao\\_alimentos.pdf](http://www.vitoria.es.gov.br/secretaria/saude/cartilha_boas_praticas_artesao_alimentos.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2008.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. Atualidades em Ciências e tecnologia de carnes. **Varel.**, 1ed. p. 236, 2006.

SILVA JR, E. A. Manual de controle higiênico sanitário em alimentos. 3 ed. São Paulo, **Varel.**, 2002.

SILVA, L. C. **Processamento de alimentos**. Universidade Federal do Espírito Santo – Alegre. Boletim técnico, 2006. Disponível em: <[http://www.agais.com/sa0106\\_processamento\\_de\\_alimentos.pdf](http://www.agais.com/sa0106_processamento_de_alimentos.pdf)>. Acesso em: 16 de setembro de 2007.

SMITH, J. S.; PILLAI, S. Irradiation and Food Safety. **Food Technol.**, v. 58, n. 11, p. 48-55, 2004.

STANWOOD, P. C.; BASS, L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Sci Technol.**, v. 9, p. 423-237, 1981.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products. **J. Food Sci.**, v. 54, p.783-788, 1989.

TAOUKIS, P. S. Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: TIJKSKENS, L. M. M.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; NICOLAÏ, B. M. (Ed.). **Food Process Model.**, Washington, DC:, p. 402-432, 2001.

TAOUKIS, P.; LABUZA, T. P. Time-Temperature indicators (TTIs). In: AHVENAINEN, R. (Ed.). **Novel Food Pack Techn.**, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd., p. 103-126, 2003.

THAKUR, B. R.; SMITH, R. K. Food irradiation: chemistry and applications. **Food Rev Int.**, v. 10, n. 4, p. 437-473, 1994.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H. **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de 60 Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões Phaseolus vulgaris L. e Vigna unguiculata (L.) Walp.** 1998. Tese (Doutorado) – FCF/USP, São Paulo.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H. Application of a rapid screening method to detect irradiated meat in Brazil, **Radiat. Phys. Chem.**, v. 57, p. 295–298, 2000.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; ARAUJO, M. M.; BALDASSO, J. G.; AQUINO, S.; KONIETZNY, U.; GREINER, R. Irradiation influence on the detection of genetic-modified soybeans. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 71, p. 491-494, 2004.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; FANARO, G. B.; ARAÚJO, M. M.; AQUINO, S.; SILVA, P. V.; MANCINI-FILHO, J. Detection of Phakopsora pachyrhizi by polymerase chain reaction (PCR) and use of germination test and DNA comet assay after e-beam processing in soybean. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 76, p. 1878-1881, 2007.

WHO. Wholesomeness of Irradiated Food. **Techn Report Ser 659**, Geneva, 1981.

WHO. **Safety of Nutritional Adequacy of Irradiated Food.** Genebra. 1994.

WHO. High-Dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated with Doses above 10kGy. **WHO Techn Report Ser 890.** 1999.

YANG, A. warmed-over flavor and lipid stability of beef: effects of prior nutrition. **Food Chem Toxicol.**, v. 67, n. 9, p. 3309-3313, 2002.

YOON, K.S. Texture and microstructure properties of frozen chicken breasts pretreated with salt and phosphate solutions. **Poultry Sci.**, v. 81, n. 12, p. 1910-1915, 2002