



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Potencial genotóxico in vivo de 2-Alcilociclobutanonas provenientes de manteiga de cacau irradiada, em células hepáticas de ratos Wistar.**

**REGIANE MARTINS**

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

**Orientadora:  
Profa. Dra. Anna Lucia Casañas  
Haasis Villavicencio**

**São Paulo  
2020**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Potencial genotóxico in vivo de 2-Alcliclobutanonas provenientes de  
manteiga de cacau irradiada, em células hepáticas de ratos Wistar**

**Versão Corrigida**

**Versão Original disponível no IPEN**

**REGIANE MARTINS**

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

**Orientadora:  
Profa. Dra. Anna Lucia Casañas  
Haasis Villavicencio**

**São Paulo  
2020**

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

MARTINS , R. . **Potencial genotóxico in vivo de 2-Alcilciclobutanonas provenientes de manteiga de cacau irradiada, em células hepáticas de ratos Wistar.** . 2020. 149 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Martins , Regiane  
Potencial genotóxico in vivo de 2-Alcilciclobutanonas  
provenientes de manteiga de cacau irradiada, em células  
hepáticas de ratos Wistar. / Regiane Martins ; orientador  
Anna Lucia Casañas Haasis villavicencio. -- São Paulo, 2020.  
149 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia  
Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e  
Nucleares, São Paulo, 2020.

1. irradiação de alimentos. 2. alcilciclobutanonas. 3.  
teste de micronúcleos. 4. hepático. 5. in vivo. I. Casañas  
Haasis villavicencio, Anna Lucia , orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Regiane Martins

Título: Potencial genotóxico *in vivo* de 2-Alcilciclobutanonas provenientes de manteiga de cacau irradiada, em células hepáticas de ratos Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr.: Daniel Vieira Perez

Instituição: IPEN

Julgamento:

Prof. Dr.: Eduardo Purgatto

Instituição: FCF-USP

Julgamento:

Prof. Dr.: Luiz Augusto Correa Passos

Instituição: UNICAMP

Julgamento:

Profa. Dra.: Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio

Instituição: IPEN

Julgamento:

Aos meus pais Sueli e Claudio, por todo o apoio, incentivo e dedicação a mim, acreditando sempre na minha capacidade.

À minha Vovó Cida que sempre foi fonte de amor. E à Vovó Alcidinha *in memoriam* que nada das letras sabia, mas nos ensinou tudo da vida.

Obrigada por fazerem parte da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela chance de recomeçar me reinventar a cada amanhecer e fazer uma trajetória de vida diferente e desafiadora.

À Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio pela orientação, por acreditar e apoiar o meu desenvolvimento profissional. Pela pessoa humana, carinhosa e que por muitas vezes fazia o papel de nossa mãe. Sou muito grata pela oportunidade que recebi.

Agradeço ao meu esposo Lucas que sempre me incentivou para que buscasse o melhor, sempre me proporcionando uma situação confortável.

A Dr. Daniel Perez e seu laboratório pela ativa participação, sugestões e contribuições ao longo do trabalho.

Agradeço à M.Sc Luma que foi essencial na realização das amostras, sem ela tudo teria sido mais difícil e bem menos divertido.

Aos funcionários do Biotério, Ana Claudia, Calixto, André, Cecília, Neide por sempre me ajudarem com meus animais.

Aos profissionais do Laboratório Aerial na França pelo acolhimento. À Dra. Dalal Werner, Dr. Eric Marchioni e Dr Florentz meu agradecimento, eles foram incríveis, além da Veronica e Roderick, os técnicos do laboratório que me ensinaram muito.

Ao Dr. Eduardo Purgatto por abrir as portas do seu laboratório, dividir seu tempo e seu conhecimento.

Ao Dr Mancini por colaborar juntamente com a Rosângela.

À Beth e ao Paulo pelas irradiações e esclarecimentos sobre o processo.

À Dra Cibele e o Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia USP.

Aos secretários Marcos e Cláudia sempre prestativos.

Aos Srs. Araújo e Jaime sempre atentos na portaria, nos recebendo com um animado bom dia ou um recado importante.

À Dra. Monica Mator que sempre fornecia ensinamentos importantes.

Às companheiras da Sala 17 Dra Amanda, Dra Angélica, M.Sc. Luíza, M.Sc Raynara, M.Sc Jaqueline, que sempre dividíamos as vitórias e também muitas derrotas acadêmicas, assim como um café e um lanchinho.

Meu agradecimento especial à Dra Angélica, que se tornou minha amiga, a que sinto falta todos os dias, que me ensinou tanto, que abriu as portas da sua casa, sempre me recebendo com muito carinho e uma comida gostosa da D.Cleusa, que também agradeço pela hospitalidade de sempre. Sem vocês essa jornada teria sido bem mais difícil.

À Dra Amanda que aos poucos fui conhecendo e aprendendo a admirar, hoje é uma fonte de inspiração por ser essa pessoa incrível em todos os sentidos, e que sempre me tira da enrascada.

À M.Sc Tereza Salvetti, que ofereceu-me a chave de sua casa, sempre me recebendo com muita alegria, bons conselhos, uma oração reconfortante nos dias de desespero e é claro um bom vinho no fim da noite.

Ao meu Grupinho, ainda nomeado como TNA5741 Efeitos biológicos, nunca achei que uma disciplina fosse trazer-me amigos tão especiais como M.Sc Camila, M.Sc Ricardo e M.Sc Tereza, que sempre nos encontramos, no nosso reduto A Casa do

Norte para compartilhar as alegrias e tragédias da vida. E não tem dias melhores que esses.

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pelo auxílio financeiro.

Obrigada a todos que de alguma forma me auxiliaram nessa jornada.



“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

MARTINS, Regiane. **Potencial genotóxico *in vivo* de 2-Alcilociclobutanonas provenientes de manteiga de cacau irradiada, em células hepáticas de ratos *Wistar***. 2020 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

## RESUMO

A irradiação de alimentos mostra-se uma técnica eficaz para reduzir alguns patógenos dos alimentos e isso ganhou atenção significativa ao seu potencial de segurança do alimento. As 2-Alcilociclobutanonas são produtos radiolíticos únicos gerados pela quebra induzida, por radiação, de triglicerídeos nos alimentos que contêm gordura. 2-Dodecilociclobutanona (2-dDCB) e 2-Tetradecilociclobutanona (2-tDCB) são os compostos mais abundantes detectados em alimentos irradiados, e sabe-se que parte desses compostos ingeridos são excretados pelas fezes e uma pequena parte é depositada no tecido adiposo. Trabalhos realizados anteriormente sugeriram efeitos genotóxicos e citotóxicos em células de cólon. Apesar de estudos mais recentes mostrarem a não genotoxicidade de 2-ACBs, os resultados são conflitantes e, portanto, continuamos os estudos para confirmar a segurança dos compostos para a saúde humana. As células hepáticas foram escolhidas para análise de genotoxicidade por até o momento não terem sido avaliadas *in vivo* e pela importância do fígado na metabolização de compostos e acúmulo de gordura. O teste de micronúcleo *in vivo* foi realizado com células específicas extraídas do tecido hepático, por meio de Citometria de fluxo. A análise histológica do tecido hepático foi realizada como análise complementar. Utilizamos manteiga de cacau irradiada com doses de 10, 20 e 30 kGy (consideradas altas doses) para suplementação diária dos animais, a detecção e quantificação de 2-ACBs nas amostras foram obtidas por GC/MS. Os resultados confirmam a segurança do processo de irradiação de alimentos, que mesmo em altas doses de radiação e maior produção de 2-ACBs não indicaram o potencial genotóxico das amostras em células hepáticas.

**Palavras-chave:** alcilociclobutanonas; irradiação de alimentos; teste de micronúcleos

MARTINS, Regiane. ***In vivo* genotoxic potential of 2-Alkylcyclobutanones from irradiated cocoa butter in liver cells of Wistar.** 2020 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

## ABSTRACT

Food irradiation proves to be an effective technique to reduce some food pathogens and this has gained significant attention to its potential for food safety. 2-Alkylcyclobutanones are unique radiolytic products generated by the radiation-induced breakdown of triglycerides in foods that contain fat. 2-Dodecylcyclobutanone (2-dDCB) and 2-Tetradecylcyclobutanone (2-tDCB) are the most abundant compounds detected in irradiated foods, and it is known that part of these ingested compounds is excreted in the faeces and a small part is deposited in the adipose tissue. Previous work has suggested genotoxic and cytotoxic effects on colon cells. Although more recent studies show the non-genotoxicity of 2-ACBs, the results are conflicting and, therefore, we continue studies to confirm the safety of the compounds for human health. Liver cells were chosen for genotoxicity analysis because they have not yet been evaluated *in vivo* and the importance of the liver in the metabolism of compounds and accumulation of fat. The *in vivo* micronucleus test was performed with specific cells extracted from the liver tissue, using flow cytometry. Histological analysis of liver tissue was performed as a complementary analysis. We used cocoa butter irradiated with doses of 10, 20 and 30 kGy (considered high doses), for daily supplementation of the animals, the detection and quantification of 2-ACBs in the samples were obtained by GC / MS. The results confirm the safety of the food irradiation process, which, even at high radiation doses and greater production of 2-ACBs, did not indicate the genotoxic potential of the samples in liver cells.

**Key words:** 2-Alkylcyclobutanones; food irradiation; micronucleus test.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>1.1 Irradiação de alimentos</b>	18
<b>1.2 2-Alcilciclobutanonas</b>	19
<b>1.3 Objetivo</b>	21
1.3.1 Objetivo geral	21
1.3.2 Objetivos específicos	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	22
<b>2.1 Formação das 2-Alcilciclobutanonas</b>	22
2.1.1 2-ACBs e pontencialidades patológicas	23
2.1.2 Genotoxicidade de 2-ACBs	25
<b>2.2 O fígado</b>	26
2.2.1 Patologia hepáticas	26
<b>2.3 Ensaio de Micronúcleos</b>	28
<b>2.4 Histopatologia</b>	29
<b>2.5 Manteiga de cacau</b>	30
<b>2.6 Detecção das 2-ACBs</b>	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
<b>3.1 Material</b>	33
3.1.1 Substância teste - compostos 2-ACBs	33
3.1.2 Substâncias utilizadas nos protocolos de análise de ácidos graxos e detecção de alimentos irradiados.	33
3.1.3 Preparos dos padrões e soluções	34
3.1.4 Substâncias utilizadas no ensaio de Micronúcleos por Citometria de fluxo	36
3.1.5 Animais	40
3.1.6 Substâncias utilizadas nas técnicas Histológicas	40
<b>3.2 Métodos</b>	43
3.2.1 Amostras	43
3.2.1.1 Preparação do extrato para análise de ácidos graxos e de 2-ACBs	43
3.2.1.2 Extração por imersão	43
3.2.1.3 Concentração de lipídeos na amostra	46
3.2.1.4 Determinação de ácidos graxos	48
<b>3.3 Detecção das 2-ACBs</b>	49
3.3.1 Purificação por Cromatografia de adsorção por coluna de Florisil®	49
3.3.2 Detecção de 2-ACBs por GC-MS	53
<b>3.4 Teste de micronúcleos por Citometria de Fluxo</b>	54
3.4.1 Tratamento dos animais	54
3.4.2 Isolamento de células Hepáticas	56
3.4.3 Plaqueamento para Leitura	58
3.4.4 Análises estatísticas	61
<b>3.5 Histologia</b>	61
3.5.1 Tecido hepático	61

3.5.2	Fixação	62
3.5.3	Desidratação	62
3.5.4	Diafanização	63
3.5.5	Inclusão em parafina	63
3.5.6	Montagem ds lâmina	64
3.5.7	Coloração HE (Hematoxilina e Eosina)	65
3.5.8	Montagem da lâmina com lamínula	66
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	67
<b>4.1</b>	<b>Determinação de ácidos graxos</b>	67
<b>4.2</b>	<b>Detecção de 2-ACBs</b>	68
4.2.1	Identificação das 2-ACBs	72
4.2.2	Cálculo de qualificação das 2-ACBs	73
<b>4.3</b>	<b>Evolução de massa corporal dos animais</b>	77
<b>4.4</b>	<b>Aspectos macroscópicos dos órgãos</b>	79
<b>4.5</b>	<b>Ensaio de MNs</b>	83
4.5.1	Ensaio de Micronúcleos 20 kGy e 30 kGy	87
<b>4.6</b>	<b>Análise histológica</b>	92
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	96
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	100
	<b>REFERÊNCIAS</b>	101
	<b>ANEXO A</b>	111

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1 - Estrutura das cadeias laterais básicas dos quatro mais comuns alcilciclobutanonas encontradas em alimentos contendo lipídios irradiados	23
FIGURA 2 - Evolução da Doença hepática gordurosa não alcoólica	28
FIGURA 3 - Micronúcleo.	29
FIGURA 4 - Amostra de manteiga de cacau, em imersão em banho Maria à 50 °C.	44
FIGURA 5 - Filtragem da amostra em lã de vidro e sulfato de sódio em um balão	45
FIGURA 6 - Evaporação em rota evaporador a 40 °C em vácuo mínimo.	46
FIGURA 7 - Cromatógrafo gasoso/espectrometria de massas Shimadzu®-Nexis GC 20-30	48
FIGURA 8 - Colunas de vidro de 21 cm, identificadas com dois conjuntos de dois tempos, sendo acondicionadas com hexano	50
FIGURA 9 - Colunas de 21 cm com o Florisil®	51
FIGURA 10 - Adicionando o extrato para eluição	52
FIGURA 11 - Injeção intraperitoneal	55
FIGURA 12 - Administração via oral da manteiga de cacau.	56
FIGURA 13 - Fragmentação do tecido hepático com bisturi em placas de petri.	57
FIGURA 14 - Suspensões após centrifugação e suspensão em cloreto de amônio	58
FIGURA 15 - Fotoativação em Luz Led Azul e gelo por 30 minutos	59
FIGURA 16 - Ressuspensão dos poços após adicionar etapa de Lise I	60
FIGURA 17- Placas com amostras em triplicatas para aquisição em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences)	61
FIGURA 18 - Processador de amostra Leica®	63
FIGURA 19 - Tecido hepático incluído em blocos de parafina.	64
FIGURA 20 - Lâmina montada após microtomia do bloco de parafina	65
FIGURA 21- Cromatograma da análise por GC-MS de ácidos graxos extraídos de manteiga de cacau.	67
FIGURA 22 - Cromatograma TIC de 2- dDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy.	69
FIGURA 23 - Cromatograma SIM de 2- dDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy	70

FIGURA 24 - Cromatograma TIC de 2- tDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy.	71
FIGURA 25 - Cromatograma SIM de 2- tDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy.	72
FIGURA 26 - Análise macroscópica dos tecidos hepáticos dos animais do grupo controle	80
FIGURA 27- Animais do grupo Controle Negativo (NaCl).	80
FIGURA 28 - Animais do grupo controle positivo (Ciclofosfamida).	81
FIGURA 29 - Animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 10 kGy	81
FIGURA 30 - Animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 20 kGy.	82
FIGURA 31 - Animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 30 kGy	82
FIGURA 32 - Animais grupo experimental 2-dBCBs	83
FIGURA 33 - Animais do grupo experimental 2-tDCBs	83
FIGURA 34 - Estratégia de gattig para análise da frequência de micronúcleos a partir de experimentos	85
FIGURA 35 - Resultado do grupo experimental 10 kGy	86
FIGURA 36 - Indução de micronúcleos	89
FIGURA 37 - Imagens microscópicas (Controles).	90
FIGURA 38 - Imagens microscópicas (Grupos 20 e 30 kGy)	91
FIGURA 39 - Imagens microscópicas (Grupo 2-ACBs)	91
FIGURA 40 - Histologia Controle	93
FIGURA 41 - Histologia Grupo 10 kGy	93
FIGURA 42 - Histologia Grupo 20 kGy	94
FIGURA 43 - Histologia Grupo 30 kGy	94
FIGURA 44 - Histologia Grupo 2-dDCBs	95
FIGURA 45 - Histologia Grupo 2-tDCBs	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos ácidos graxos	31
Tabela 2 - Variância da massa corporal entre grupos de animais	82



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Formação das 2-ACBs em $\mu\text{g/g}$ , nas doses de 10, 20 e 30 kGy	76
Gráfico 2 - Média de massa corporal dos animais	79
Gráfico 3 - Porcentagem de MN (% dos eventos totais) de células hepáticas	86
Gráfico 4 - Formação de Micronúcleos	88

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alimentos, seus ácidos graxos precursores e respectivas 2-ACBs formadas.	22
Quadro 2 - Peso das amostras.	44
Quadro 3 – Quantidade de gordura no extrato	47
Quadro 4 - Volume do extrato em 0,2 g de gordura.	48
Quadro 5 - Gradiente de temperatura.	54
Quadro 6 - Determinação de ácidos graxos da manteiga de cacau por GC-MS.	68
Quadro 7- Caracterização das 2-ACBs.	73
Quadro 8 - Concentração de 2-ACBs nas amostras.	75
Quadro 9 – Média e desvio padrão das concentrações de 2-ACBS presentes nas amostras.	76

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g/g}$	Micrograma por grama
$\mu\text{L}$	Microlitro
2- ACBs	2- Alcilciclobutanonas
2- DCB	2- Decilciclobutanona
2- DdCB	2- Dodecilciclobutanona
2-Tdcb	2-Tetradecilciclobutanona
$^{60}\text{CO}$	Cobalto-60
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BRL3A	Buffalo rat liver
C10:0	Carbono 10
C12:0	Carbono 12
C14:0	Carbono 14
C16:0	Carbono 16
C18:0	Carbono 18
C18:1	Carbono 18:1
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	D-Glicose
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$	Ácido cítrico
$\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio dihidratado
CAS	Chemical abstracts service
CC	Controle celular
CEBIO	Centro de biotecnologia
CEN	Comitê Europeu de normalização
CETER	Centro de tecnologia das radiações
CHC	Carcinoma hepato celular
CHCH	Ciclohexilhexanona
CNEN	Comissão nuclear de energia nuclear
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
CP	Ciclofosfamida monohidratada
CTRL	Controle
FCF	Faculdade de ciências farmacêuticas.
$\text{g/mol}$	Gramas por mol
GC/MS	Cromatografia a gás/ espectrometria de massa
h	Horas
HBSS	Solução salina equilibrada de Hanks
HE	Hematoxilina e eosina
IPEN	Instituto de pesquisas energéticas e nucleares
KCL	Cloreto de potássio

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Irradiação de alimentos

A irradiação de alimentos é uma ferramenta eficaz e ganhou grande atenção devido ao seu potencial de garantia de segurança dos alimentos, redução da carga microbiana, controle de pragas e insetos em produtos agrícolas, extensão do período de prateleira e inibição de brotamento (SATIN, 1993).

O tratamento com radiação ionizante é aplicado a vários tipos de alimentos (especiarias, vegetais secos, grãos, frutas, carne e frutos do mar) para cumprir diferentes propósitos, e também deve seguir especificações de acordo com cada tipo de alimento (SONCIN et al., 2012).

As irradiações comerciais de alimentos normalmente são realizadas com raios gama de  $^{60}\text{Co}$ , entretanto, os elétrons acelerados com uma energia máxima de 10 MeV e raios X com uma energia máxima de 5 MeV são cada vez mais utilizados para o tratamento de alimentos.

Uma diferença importante entre os raios gama e elétrons acelerados é a capacidade de penetração nos materiais (IAEA, 2015). A capacidade de penetração dos raios gama é muito mais elevada do que a de elétrons acelerados. Outra diferença importante está relacionada à taxa de dose de cada fonte, sendo a taxa de dose dos aceleradores de elétrons mais alta que a dos os irradiadores que utilizam raios gama (HAYASHI, 1991).

O processo de irradiação é relativamente fácil de controlar, geralmente depende somente da velocidade do transporte e a alimentação/ atividade da fonte de radiação. Os alimentos são tratados em suas embalagens finais e organismos alvo não são protegidos pelo fato do produto estar embalado, sendo possível realizar o tratamento dos produtos em paletes (KOOIJ; LEVELING; SCHUBERT, 1981).

O fator crítico nesse processo é como aplicar doses de radiação precisas para atender aos requisitos do processo sem causar perdas sensoriais e nutricionais nos alimentos (FARKAS, 2016).

Para a irradiação de qualquer alimento, a dose mínima absorvida deve ser suficiente para atingir o objetivo tecnológico e a dose máxima absorvida deve ser inferior à que comprometeria a segurança do consumidor, a salubridade ou afetar adversamente a integridade estrutural, propriedades funcionais ou atributos sensoriais do alimento (CODEX, 2003).

Embora a radiação exista em nosso ambiente e utilizada em vários campos de nossa vida diária, é difícil dizer que as aplicações são bem compreendidas (FURUTA et al., 2000), embora a segurança e eficiência da irradiação de alimentos ter sido comprovada por várias autoridades responsáveis como FDA, USDA, FAO, e sociedades científicas com base em extensa pesquisa (MOREHOUSE, 2002; FDA, 2015).

A RDC nº 21 a legislação brasileira aprova o uso da radiação ionizante, em processamento de alimentos já embalados ou a granel com doses controladas de radiação com finalidades sanitárias, fitossanitárias e/ou tecnológicas. A irradiação, assim como qualquer outro processo de tratamento de alimentos, não deve ser utilizada em substituição as boas práticas de fabricação e ou agrícolas. (BRASIL, 2001).

No entanto, também existem algumas limitações: a formação de compostos radiolíticos, como as 2-Alcilciclobutanonas, derivadas da irradiação de alimentos que contêm gordura (VARIYAR et al., 2008).

## **1.2 2- Alcilciclobutanonas**

Desde 1990, estudos sobre a segurança toxicológica das 2- Alcilciclobutanonas (2-ACBs) têm sido realizados extensivamente (DELINCEÉ; POOL; ZOBEL, 1998). São produtos radiolíticos únicos gerados pela quebra induzida por meio do processo de irradiação de triglicerídeos dos alimentos, e são encontrados exclusivamente em alimentos contendo lipídios processado por radiação (LETELLIER; NAWAR, 1972).

A 2-dodecilociclobutanona derivada da radiólise do ácido palmítico (2-dDCB) e a 2-tetradecilociclobutanona do ácido esteárico (2-tDCB), são os compostos predominantes detectados (CHAN; YE; LEUNG, 2014). Eles têm o mesmo número de carbonos (n) que seus ácidos graxos precursores, com uma cadeia alquil de carbonos (No-4) na posição 2 do anel (STEVENSON, 1996). São, portanto, considerados marcadores únicos de irradiação de alimentos (NADIAYE et al., 1999).

O potencial tóxico de 2-ACBs foi previamente investigado por um programa interregional da UE (LETELLIER; NAWAR, 1972), no qual o potencial promotor de tumor de 2-tDCB e 2-(tetradec-5-enil) -ciclobutanona (2-tDeCB) foi relatado (MARTINS; SILVA, 2014). Apesar de estudos mostrarem a não genotoxicidade de 2-ACBs, alguns resultados são conflitantes e, portanto, continuamos os estudos sobre as 2-Alcilociclobutanonas com objetivo de confirmar que o consumo de pequenas doses de 2-ACBs não causem risco para a saúde humana.

Com a finalidade de verificar possíveis alterações genotóxicas, os estudos com as diferentes doses de radiação, 10, 20 e 30 kGy, consideradas doses altas para algumas finalidades sanitárias, podem contribuir para o conhecimento dos riscos à saúde dos consumidores. É importante ressaltar que não temos estudos realizados na esfera nacional.

Neste trabalho foram utilizadas técnicas para análise de genotoxicidade das 2-ACBs que não foram feitas nos estudos já existentes, como ensaio de micronúcleos *in vivo* por citometria de fluxo, utilizando células hepáticas extraídas diretamente do fígado do animal, visando maior rapidez no processamento das amostras, além de técnicas já consolidadas como histologia para análise dos tecidos hepáticos.

O processo de ingestão das 2-ACBs pelos animais também se diferencia dos estudos já realizados por utilizar a manteiga de cacau, uma amostra escolhida por apresentar mais facilmente as 2-ACBS após o processo de irradiação por conter alto teor de ácidos graxos precursores e estar presente na alimentação do ser humano por meio de chocolates e preparações culinárias.

Foram também realizadas a detecção e quantificação das 2-ACBs nas amostras de manteiga de cacau irradiadas por meio do método tradicional EN1785:2003, seguindo todos os padrões analíticos.

### **1.3 Objetivo**

#### 1.3.1 Objetivo geral

Detectar e quantificar a formação das 2-alcilciclobutanonas (2-ACBs), que são provenientes dos principais ácidos graxos e triglicérides em manteiga de cacau processada por radiação, avaliar possíveis danos genotóxicos em células hepáticas em condições experimentais *in vivo*.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaio de Micronúcleos *in vivo*, utilizando a técnica de citometria de fluxo, visando otimizar o tempo de análise, reduzir o número de animais utilizados e avaliar danos residuais.
- Avaliar os possíveis danos genotóxicos em células hepáticas de ratos *Wistar*, alimentados com manteiga de cacau irradiada nas doses de 10, 20 e 30 kGy.
- Detectar e quantificar as 2-ACBs presentes nas amostras de manteiga de cacau irradiada e correlacionar com possíveis danos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Formação das 2-Alcilciclobutanonas

As 2-ACBs são compostos cíclicos, formados pela perda de um elétron do oxigênio sobre a carbonila de um ácido graxo, seguindo de um processo de rearranjo para produzir 2-Alcilciclobutanonas específicas para o ácido graxo principal. Estes compostos contém o mesmo número de átomos de carbono como os ácidos graxos precursores e o grupo alquilo ligado ao anel na posição 2 (GADGIL et al., 2002).

As 2-ACBs derivadas dos ácidos graxos saturados são: a 2-hexil-ciclobutanona, derivada do ácido caprílico (C10:0); 2-octil-ciclobutanona, derivada do ácido láurico (C12:0); 2-decil-ciclobutanona, derivada do ácido mirístico (C14:0); 2-dodecil-ciclobutanona, derivada do ácido palmítico (C16:0); 2-tetradecil-ciclobutanona, derivada do ácido esteárico (C18:0) e as derivadas dos ácidos graxos insaturados são 2-(tetradec-5'-enil)-ciclobutanona, derivada do ácido oleico (C18:1) e 2-(tetradeca-5',8'-dienil)-ciclobutanona (GADGIL, et al., 2002; SONG et al., 2018). No quadro 1 estão representados os ácidos graxos precursores das 2-ACBs e os alimentos nos quais são mais frequentes quando são irradiados.

Quadro 1 - Alimentos, seus ácidos graxos precursores e respectivas 2-ACBs formadas.

Ácido Mirístico	C14:0	2-Decilciclobutanona (2-DCB)	Gordura de leite, óleo de coco.
Ácido Palmítico	C16:0	2-Dodecilciclobutanona (2-Ddcb)	Óleo de palma, manteiga de cacau, gordura animal.
Ácido Esteárico	C18:0	2-Tetradecilciclobutanona(2-Tdcb)	Manteiga de cacau, gordura animal.
Ácido Oléico	C18:1	2-Tetradec-5'-enil-ciclobutanona	Azeite de Oliva, óleo de canola.

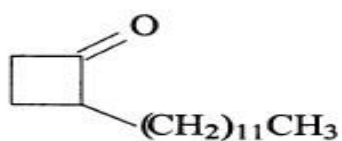
Fonte: Adaptado de ISEO, 2016; GADGIL et al., 2002.



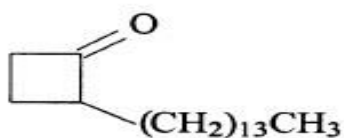
De acordo com VARIYAR et al. (2008) as 2-ACBs são consideradas como produtos exclusivos radiolíticos de alimentos gordurosos. A figura 1 exemplifica as estruturas das cadeias básicas das 2-Alcilciclobutanonas.

Figura 1 - Estrutura das quatro mais comuns alcilciclobutanonas encontradas em alimentos que contêm lipídios e foram irradiados.

#### Irradiation Dose Indicators



2-dodecylcyclobutanone



2-tetradecylcyclobutanone



2-tetradec-5'-enylcyclobutanone



2-tetradeca-5',8'-dienylcyclobutanone

Fonte: Gadgil et al., 2002

#### 2.1.1 2-ACBs e potencialidades patológicas

Enquanto alimentos irradiados têm muitas propriedades benéficas conhecidas, o efeito genotóxico especificamente das 2-ACBs de consumo à longo prazo dos alimentos irradiados permanece em estudos. A principal preocupação com relação ao

consumo de alimentos irradiados é se as 2-alcilciclobutanonas podem promover patologias a longo prazo.

Em 2002, Horvatovich et.al em seus ensaios in vivo com 6 machos wistar por grupo, com concentração de 120 mg (1mg/peso corpóreo/dia) teve como resultados, que menos de 1% das 2-ACBs foram excretadas nas fezes e pequenas quantidades foram detectadas no tecido adiposo.

RAUL et al. (2002) realizou um ensaio in vivo com 6 machos wistar por grupo,utilizando concentrações de 144-288 mg/peso corpóreo (1,6 mg/peso corpóreo/dia) e constatou que a multiplicidade do tumor de cólon aumentou.

GADGIL et al. (2006) performaram um ensaio com 6 fêmeas de Sprague-Dawley por grupo com concentração de 25 mg/peso corpóreo (5 mg/peso corpóreo/dia) e relatou que de 3-11% do total de 2-ACBs foi encontrado nas fezes e menos de 0,33% no tecido adiposo.

Em 2010, HIJAZ et al. (2010) utilizou a concentração de 25 mg/peso corpóreo (5 mg/peso corpóreo/dia) em grupos de 6 fêmeas de Sprague-Dawley e como resultado obteve que a 2-dDCB é metabolizada para 2-Dodecilciclobutanol e foi excretada nas fezes.

No mais recente trabalho, SONG et al. (2018) realizaram uma série de ensaios de mutação reversa bacteriana, aberração cromossômica in vitro e micronúcleo in vivo, nos quais foram encontradas respostas negativas pelo tratamento de 2-dDCB comparando controle de veículo, dimetilsulfóxido ou óleo de milho. Não foram observados efeitos adversos em ratos administrados por via oral 2-dDCB todos os dias via gavagem por 28 dias, mesmo na dose mais alta (2,0 mg / peso corpóreo / dia)

A administração de uma solução 0,005% de 2-Dodecilciclobutanona em ratos, composto presente no alimento irradiado que contém gordura, resultou no aparecimento de uma pequena fração das 2-Dodecilciclobutanonas nos tecidos adiposos. No entanto, nota-se que a exposição prolongada e, portanto, a presença de quantidades vestigiais de alcilciclobutanonas no tecido adiposo durante longos períodos de tempo, pode ter efeitos deletérios como quebras no DNA. (HORVATOVICH et al., 2002).

A investigação aprofundada do efeito de 2-alcilciclobutanonas consumidas pela população humana em modelos (*in vitro* e *in vivo*) de vários tipos de cânceres, principalmente os que podem surgir no trato digestório devido ao acúmulo de gordura visceral é importante. (CHINTHALAPALLY, 2003).

A quantidade de 2-ACBs consumidas por seres humanos em 200g de frango irradiado a 3 kGy pode ser estimado em ~ 80 µg. Os resultados preliminares indicaram efeitos genotóxicos ligeiros de 2-Dodecilciclobutanonas em estudos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, estudos *in vivo* mais prolongados sobre o potencial genotóxico de 2-ACBs necessitam ser realizados. (RAUL; GOSSE; DELINCEE, 2002).

### 2.1.2 Genotoxicidade de 2-ACBs

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram a base da vida, em sua estrutura físico-química, o DNA, processo classificado como mutagênese. Os agentes que mudam a sequência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de genotóxicos.

De acordo com YAMAKAGE e SUIA (2014), o ensaio de micronúcleos é um dos ensaios mais utilizados para a avaliação da genotoxicidade.

De acordo com HORVATOVICH et al. (2002) o potencial genotóxico de 2-ACBs não foi avaliado sistematicamente e estudos preliminares *in vitro* e *in vivo* indicaram ligeiros efeitos genotóxicos da 2-dodecilciclobutanonas.

## 2.2 O fígado

O fígado situa-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma e pode pesar 1,5 kg no adulto. É envolvido pelo peritônio, exceto onde se adere ao diafragma e a outros órgãos e por uma cápsula de tecido conjuntivo denso modelado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Trata-se de um órgão que desempenha papel importante no metabolismo, síntese, ativação, armazenamento e transporte de micro e macro nutrientes (GARTNER, 1999; STEVENS; LOWE, 1995).

Entre as funções desempenhadas pelo fígado estão a produção de bile; metabolismo de bilirrubinas; participação no processo de coagulação sanguínea; metabolismo de carboidratos; lipídeos e proteínas; metabolismo e armazenamento de vitaminas A, D, E, K e B12; metabolismo e excreção de substâncias endógenas (hormônios) e exógenas (álcool, medicamentos) e resposta imunológica (PERES; COELHO; DE PAULA, 2015).

### 2.2.1 Patologias hepáticas

Embora sejam conhecidos vários fatores de risco para câncer de fígado, como por exemplo etnia, gênero, hepatite viral crônica, cirrose, doença hepática gordurosa não alcoólica, cirrose biliar, alcoolismo, tabaco, obesidade, diabetes tipo II, aflatoxinas e uso de esteroides anabolizantes, exatamente como esses fatores podem levar as células hepáticas normais a se tornarem cancerosas é apenas parcialmente compreendido.

As estimativas da American Cancer Society para diagnósticos de câncer primário de fígado e câncer de ducto biliar intra-hepático nos Estados Unidos para 2020 são cerca de 42.810 novos casos (30.170 em homens e 12.640 em mulheres). Cerca de 30.160 pessoas (20.020 homens e 10.140 mulheres) morrerão desses cânceres.

As taxas de incidência de câncer de fígado mais que triplicaram desde 1980, enquanto as taxas de mortalidade mais que dobraram durante esse período (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O CHC (Carcinoma Hepato celular) constitui 70 - 85% das neoplasias hepáticas primárias, é o tumor primário do fígado mais frequentemente observado e se constitui em um dos tumores malignos mais comuns no mundo (GOMES et al., 2013).

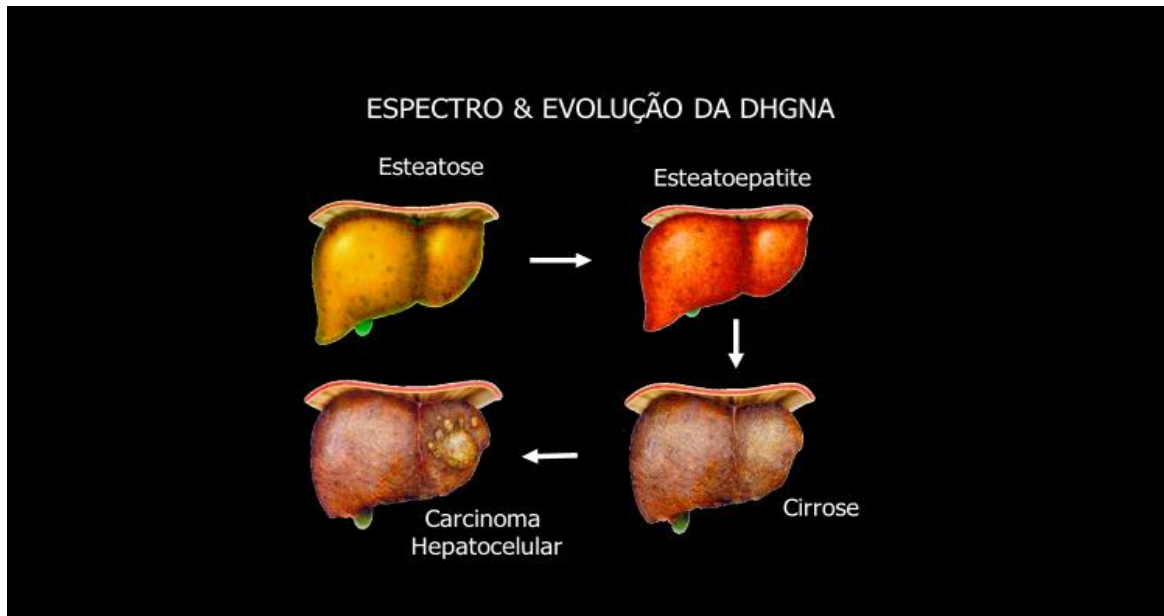
Os principais fatores de risco para o CHC incluem a infecção pelo HVB (vírus da Hepatite B) e HVC (vírus da Hepatite C), as doenças hepáticas derivadas do consumo de álcool, a exposição a aflatoxinas e principalmente a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD - do inglês *Non-alcoholic fatty liver disease*) (BAFFY; BRUNT; CALDWELL, 2012).

Diversos estudos conduzidos em países ocidentais mostram que 30% a 40% dos doentes com CHC não apresentavam infecção crônica por HVB ou HVC, sugerindo a presença de outras causas para a doença. Alguns pacientes apresentaram alterações clínicas ou bioquímicas compatíveis com esteatose hepática, como obesidade ou síndrome metabólica (EDMISON; MCCULLOUGH, 2007).

A esteatose hepática não alcoólica, ilustrada na figura 2, que está presente em praticamente 90% de pessoas obesas e em quase 70% de pessoas com diabetes *mellitus* tipo 2, parece se apresentar como possível fator de risco para CHC (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003).

Os mecanismos patogênicos envolvidos incluem peroxidação lipídica e estresse oxidativo, com produção de radicais livres como passo para a iniciação e a promoção tumoral.

Figura 2 - Evolução da Doença hepática gordurosa não alcoólica

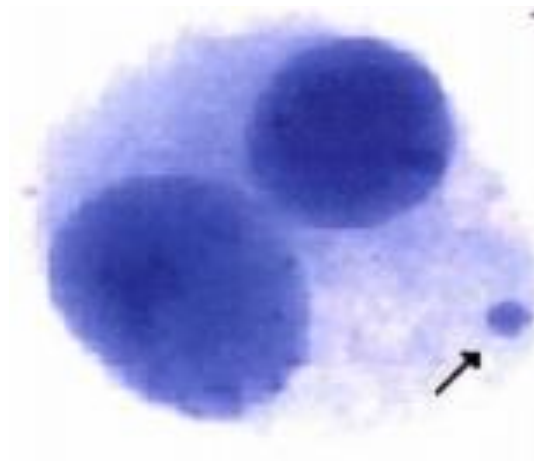


Fonte: Sociedade Brasileira de hepatologia, 2020

### 2.3 Ensaio de Micronúcleos

O ensaio de Micronúcleos foi originalmente desenvolvido em mamíferos, mas tem sido amplamente utilizado em estudos de genotoxicidade para estimar danos citogenéticos causados por agentes químicos ou físicos. Micronúcleos – MN (Figura 3) são formados por cromossomos inteiros ou por fragmentos de cromátides ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo de célula filha durante a divisão celular – Mitose (CAVALCANTE, 2009).

Figura 3 - Micronúcleo.



Fonte: BONASSI et al., 2001

O teste de Micronúcleos foi descrito pela primeira vez em 1975 por Schmidt, W, e consegue detectar substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastrogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

No presente estudo o teste de Micronúcleos foi realizado através de Citometria de Fluxo, utilizando método de BRYCE et al., (2007) com algumas alterações.

## 2.4 Histopatologia

A histopatologia será realizada no tecido hepático removido dos animais tratados com 2-Dodecilciclobutanona e 2-Tetradecilciclobutanona, bem como animais do grupo controle, para visualização de possíveis danos morfológicos.

Os procedimentos técnicos aplicados na histotecnologia incluem técnicas citoquímicas, histoquímicas, imuno-histoquímicas, voltadas para a pesquisa científica e para o diagnóstico patológico, além de análises em nível de microscopia eletrônica (CAPUTO; GITIRANA; MANSTO, 2010).

As avaliações histopatológicas desempenham um papel importante no diagnóstico de doença hepática. A avaliação de alterações morfológicas fornece informações adicionais úteis, como por exemplo, avaliar a gravidade da doença na hepatite viral crônica e na doença hepática gordurosa não alcoólica (OWEN; HUBSCHER, 2019).

## 2.5 Manteiga de cacau

A manteiga de cacau é o ingrediente mais importante e de maior valor econômico na formulação de *confectionary fats*, especialmente em chocolates. (SHUKLA, 2006).

A manteiga permanece em estado sólido à temperatura ambiente e derrete na boca à temperatura corporal. Essa característica físico-química peculiar faz da manteiga de cacau um material indispensável na indústria de confeitaria (ZARRINGHALAMI et al., 2010).

A singularidade das propriedades físicas da manteiga de cacau extrapola sua aplicação em alimentos. A fusão do produto na temperatura corporal é ideal para o uso em produtos farmacêuticos, como base lipídica para supositórios medicinais, assim como suas propriedades emolientes são satisfatórias para o uso em cosméticos e loções.

Vários métodos são empregados para a extração de manteiga de cacau a partir de massa, licor ou de outras fontes, como prensa hidráulica, prensa mecânica, prensas de parafuso, extração com fluidos supercríticos (SFE) e método de extração por solventes (ASEP et al., 2008; NAIR, 2010).

Os principais ácidos graxos da manteiga de cacau são: ácido palmítico (C16) 25-33,7%, ácido esteárico (C18:0) 33,7-40,2%, ácido oleico (C18:1) 26,3-35% e ácido linoléico (C18:2) 1,7 –3%, que contribuem com 98% do ácido graxo total (ASEP et al., 2008; BRACCO, 1994). GUNSTONE et al., (2007) ainda inclui 1% de ácido araquídico (C20:0) como mostra a tabela 1.



Tabela 1 – Composição dos ácidos graxos.

<b>Composição de ácidos graxos (%)</b>	
C16:0 Ácido Palmítico	23,7
C18:0 Ácido Esteárico	32,9
C18:1 Ácido Oléico	37,4
C18:2 Ácido Linoléico	4,0
C20:0 Ácido Araquídico	1,0

Fonte: Adaptado de Gunstone; Harwood, 2007

A manteiga de cacau foi determinada como amostra principal por conter os 2 principais ácidos graxos precursores das 2-ACBs, (C18:0 - Ácido Esteárico e C16:0 - Ácido Palmítico).

## 2.6 Detecção das 2-ACBs

A detecção de 2-ACBs é um método para identificação do tratamento por radiação ionizante em alimentos que possuem na sua composição gordura. As 2-ACBs são detectadas por Espectrometria de Massa (MS), após a separação por Cromatografia Gasosa (GC).

O método foi testado com sucesso em ensaios interlaboratoriais em carne de frango, carne suína, ovo líquido, salmão e queijo Camembert crus (EN1785:2003).

Embora, em princípio, o controle administrativo das instalações licenciadas para irradiação de alimentos, e rotulagem obrigatória dos alimentos tratados, conforme proposto pelo Codex Alimentarius (ANONYMOUS, 1984) por um inventário internacional de instalações (LOAHARANU, 1992) deve fornecer um controle confiável

aos alimentos irradiados, desejável ter um meio adicional de detecção do tratamento com radiação analisando o alimento em si (DELINCEE, 1993).

As ciclobutanonas são marcadores úteis para a identificação de uma variedade de alimentos que possuem gordura e diferentes ácidos graxos em sua composição (STEVENSON et al., 1993).

As 2-Alcilociclobutanonas são os únicos compostos químicos cuja formação (a partir de ácidos graxos) é específico a partir do tratamento por irradiação de alimentos (CRONE; HAMILTON; STEVENSON, 1992). Sua detecção foi selecionada pelo Comité de Normalização (CEN) como detecção teste para irradiação. O protocolo inclui extração e separação do produto e análise em GC-MS.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Substância teste - compostos 2-ACBs

Foram utilizadas as substâncias 2-dDCB e 2-tDCB, com pureza química de 99,2% (CAS 35493-46-0) e 99,1% (CAS 35493-47-1), respectivamente. Sintetizadas por Fluka Analytical e comercializadas por Sigma-Aldrich.

Apresentam formato sólido (pó) 2-dDCB possui peso molecular de 238,41 g/mol e 2-tDCB, peso molecular de 266,46 g/mol.

##### 3.1.2 Substâncias utilizadas nos protocolos de análise de ácidos graxos e detecção de alimentos irradiados.

- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),  $M=142,04$  g/mol- Merck- CAS 7757-82-6
- Areia de Fontainebleau ( $\text{SiO}_2$ ), 246  $\mu\text{M}$ - VWR- CAS 7631-86-9
- N-hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ),  $M= 86,18$  g/mol – Fischer Chemical- CAS 110-54-3
- Florisil ( $\text{MgO}_3\text{Si}$ ), Mesh 60-100,  $M= 100,39$  g/mol- Sigma Aldrich- CAS 1343-88-0.
- Éter dietílico ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$ )  $M=74,12$  g/mol – VWR- CAS 60-29-7
- 2,2,4 Trimetilpentano (Iso-octano) ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $M=114,23$  g/mol – Sigma Aldrich- CAS 540-84-1
- Hidróxido de potássio (KOH),  $M= 56,11$  g/mol – Merck- CAS 1310-58-3
- Metanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ),  $M= 32,04$  g/mol – Fischer Chemical- CAS 67-56-1

- 2- Ciclohexilciclohexanona ( $C_{12}H_{20}O$ ),  $M= 180,29$  g/mol – Sigma Aldrich- CAS 90-42-6
- 2-Dodecilciclobutanona ( $C_{16}H_{30}O$ ),  $M=238,41$  g/mol – Fluka- CAS 35493-46-0
- 2-Tetradecilciclobutanona ( $C_{18}H_{34}O$ ),  $M=266,46$  g/mol – Fluka- CAS 35493-47-1

### 3.1.3 Preparo dos padrões e soluções

- **Solução mãe de 2-Ciclohexilciclohexanona a 1000  $\mu$ g-mL**

Na preparação da solução mãe dissolvemos 50 mg de 2-Ciclohexilciclohexanona em um frasco de 50 mL e completado o volume com isooctano. Essa solução foi conservada a -20 graus Celsius.

- **Solução de 2-Ciclohexilciclohexanona a 1  $\mu$ g-mL**

Preparou-se a solução colocando 10  $\mu$ L da solução mãe de 2-Ciclohexilciclohexanona em um frasco de 10 mL e completado o volume com isooctano. A solução foi armazenada a -20 graus Celsius.

- **2-Dodecilciclobutanona a 200  $\mu$ g-mL**

O padrão foi preparado adicionando-se 5 mg de 2-dodecilciclobutanona em um frasco de 25 mL, completado o volume com isooctano. A solução foi conservada a -20 graus Celsius.

- **2- Tetradecilciclobutanona a 200 $\mu$ g-mL**

Para preparação do padrão foi utilizado 5mg de 2-tetradecilciclobutanona em frasco de 25 mL e completado o volume com isooctano e a conservação foi a -20 graus Celsius.

➤ **Mistura das soluções dos padrões**

Para a preparação da mistura das soluções dos padrões descritos anteriormente, foi pipetado em um frasco de 10 mL, 100 µL da solução de 2-Dodecilociclobutanona, 100 µL da solução de 2-tetradecilociclobutanona e 10 µL da solução mãe de 2-Ciclohexilciclohexanona e completado com isooctano. A mistura foi conservada a a -20 graus Celsius.

Transferiu-se 200 µL da solução de mistura dos padrões em vial de injeção de 2 mL para GC/MS.

➤ **Preparação de sulfato de sódio anidro**

Em um cadinho de porcelana foi adicionado 150 g sulfato de sódio e mantido na mufla pelo período de 5 horas a 650 °C para secagem, aguardamos a temperatura cair para cerca de 200-300 °C para a retirada da mufla e transferido para um frasco e mantido no dessecador.

➤ **Preparação e desativação de Florisil®**

A preparação do Florisil® foi realizada no dia anterior ao ensaio. No procedimento de preparação, 350 g Florisil® foi colocado em cadinho de porcelana e seco em mufla pelo período de 5 horas na temperatura da 550 °C. Após o período de secagem, aguardou-se a temperatura da mufla atingir a temperatura entre 200-300 °C e transferiu-se o Florisil® para o dessecador.

O balão Erlenmeyer de 250 mL foi tarado em balança analítica e pesado o Florisil® seco e o valor foi registrado. Para o processo de desativação, foi adicionado 20% do peso de Florisil® de água ultra-pura utilizando pipeta automática.

Em seguida, agitou-se firmemente o balão Erlenmeyer com a tampa, com a finalidade de distribuir toda a água e impedir a formação de grumos.

Após esse procedimento de agitação, o balão foi armazenado em dessecador durante a noite anterior ao ensaio. O Florisil® desativado tem validade de sete dias após a sua preparação. Para desativar após esse período é necessário aquecer a 130 °C por 3 horas e desativado novamente com 20% de água.

São necessários cerca de 30 g de Florisil ativado para preparar uma quantidade suficiente de adsorvente desativado para uma coluna.

➤ **Solução de eluição de éter dietílico a 1% em hexano.**

Na preparação da solução de eluição de éter dietílico foi adicionado 1,5 mL de éter dietílico em um balão de 150 mL, completado o volume com hexano.

➤ **Solução de hidróxido de potássio metanólico a 0,5 mol/litro**

Foi dissolvido 2,81 g de hidróxido de potássio em 100 mL de metanol contendo não mais de 0,5% (fração de massa) de água.

Caso a solução for armazenada por um longo período de tempo, pode formar-se uma pequena quantidade de precipitado branco de carbonato de sódio; esse fenômeno não afeta a preparação de ésteres metílicos.

➤ **Solução padrão interno: undecanoato de metila a 500 ppm**

Colocamos 50 mg de undecanoato de metila num balão de 100 mL e o volume foi completado com hexano (c) e a solução armazenada a 4 ° C.

#### 3.1.4 Substâncias utilizadas no ensaio de Micronúcleos por Citometria de fluxo

➤ **PBS**

Em balão volumétrico contendo 1000 mL de água deionizada, foram adicionados 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,8 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,15 g de fosfato de sódio anidro (NaHPO<sub>4</sub>) e agitado até a dissolução completa. O pH foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio a 0,1 M e autoclavado à 120 °C por 30 minutos.

➤ **Solução de lise de eritrócitos**

(Modificado de McCoy Jr, J. P, 1998 curr. Protocol. cytom. 5:5.1.1.5.1.13)

Em um frasco com 90 mL de água deionizada foram adicionados 8,2 g de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl), 0,94 g de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e aos poucos, sob agitação, 0,37 g de EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) até a dissolução completa. O pH foi corrigido para 7,4, e o volume completado para 100 mL com água deionizada. A solução foi filtrada e armazenada a 4 °C.

➤ **Solução I**

Lisando membranas e mantendo o núcleo.

14.700 mL de PBS

300 µL SFB

Filtrado com filtro de seringa 0,22 µm

➤ **LISE I – Incompleta**

58,4 mg de NaCl

100 mg de citrato de sódio

30 µL de Igepal

➤ **LISE I – Completa**

10.551,2 µL de Lise I Incompleta

50 µL de RNase (Ribonuclease 3'- pyrimidinooligonucleotidohydrolase, Sigma Aldrich CAS 9001-59-4)

0,768 µL de Sytox Green (SYTOX® Green, nucleic acid stain, Life Technologies, Ref S7020)

➤ **LISE II – Incompleta**

8.560 mg de sacarose

1500 mg de ácido cítrico

100 mL de água MilliQ

➤ **LISE II – Completa**

10.119,2 µL de Lise II incompleta

480 µL de Beads (Accucheack counting beads for count & pipetting accuracy Life)

0,768 µL de Sytox Green

➤ **Solução de Hank's (Solução de sal de Hanks balanceado, modificado-HBSS)**

Produto em forma líquida, comercializado pronto para uso por Sigma Aldrich, número de referência H6648.

É uma mistura de sais e outros componentes essenciais para a manutenção celular, que age como uma solução nutritiva, desenvolvida principalmente para manter viáveis diversos cultivos celulares durante períodos de tempo curtos.

Composição: Cloreto de Potássio (KCl), Fosfato de Potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>), Cloreto de Sódio (NaCl), Sulfato de Magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), Cloreto de Cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O),



Fosfato de Sódio dibásico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HP0}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), D-Glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), vermelho de fenol.

➤ **Colagenase tipo IA**

Forma em pó, de coloração castanha,  $\geq 125$  CDU/MG comercializada por Sigma Aldrich, CAS 9001-12-1.

A concentração de  $300 \mu\text{g} / \text{mL}$  foi solubilizada na solução salina equilibrada de Hanks (HBSS), e utilizada 2 mL para cada amostra de tecido hepático.

As colagenases de *Clostridium histolyticum* são enzimas proteolíticas com capacidade de clivar peptídeos da tripla hélice de colágeno humano e animal, atuando em colágeno tipo I, II, III e IV através de diferentes mecanismos moleculares. São indicadas para diversas aplicações de isolamento de células e tecidos. Utilizada para a dissociação das amostras de tecido hepático animal (WILLIANS; MACKEMY; JARIEL, 1995).

➤ **Ciclofosfamida Monohidratada - Controle positivo**

A ciclofosfamida monohidratada ( $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), peso molecular: 279,10 g/mol e CAS 6055-19-2, comercializada pela Sigma Aldrich, foi utilizada para injeção intraperitoneal nos animais como controle positivo, de acordo com as normas OECD. A ciclofosfamida foi solubilizada em NaCl 0,9% na concentração de 50 mg/mL/kg.

➤ **Metilmetanosulfonado - Controle positivo**

O metilmetano sulfonado ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ ), peso molecular: 110,13 g/mol e CAS 66-27-3, comercializado pela Sigma Aldrich, foi utilizado como controle positivo, sendo injetado intraperitonealmente nos animais, de acordo com as normas OECD e solubilizado em solução de NaCl 0,9%, em concentração de 25 mg/mL/kg

➤ **NaCl 0,9% - Controle negativo**

Solução injetável, límpida, estéril, apirogênica, em embalagens não fracionáveis de 5 mL, da marca ADV® e comercializada por drogarias. Cada mL da solução contém: 9 mg de cloreto de sódio (NaCl) em 1mL de água para injeção q.s.p.

➤ **Manteiga de cacau**

Foram utilizadas amostras de manteiga de cacau Brazilcoa®, de mesmo lote, contendo 29% de ácido palmítico (precursor da 2-Dodecilciclobutanona) e 32% de ácido esteárico (precursor da 2-Tetradecilciclobutanona) e que foram mantidas em refrigeração a 7°C (WANG; MALEKY, 2018). Foram submetidas ao processo de irradiação, utilizando raios gama nas doses de 10, 20 e 30 kGy, (taxa de dose 0,473kGy / h) usando uma fonte de <sup>60</sup>Co (IPEN Gammacell 220) à temperatura ambiente. Foram fluidizadas em banho-maria a 38°C e administrados 1 mL /pesocorpóreo por via oral diariamente a todos os animais durante 5 semanas, inclusive amostra controle, que não sofreu o processo de irradiação.

### 3.1.5 Animais

Um grupo de 16 ratos machos, linhagem *Wistar*, alojados em duplas, foram mantidos sem restrições alimentares durante 30 dias no Biotério do IPEN, sob todos os princípios de bem-estar animal (ciclos noturnos de 12/12 h, temperatura ambiente: 22 - 23 °C e 44 - 65% de umidade relativa do ar), conforme especificado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IPEN (número do processo CEUA-IPEN N° 148/14).

### 3.1.6 Substâncias utilizadas nas técnicas Histológicas

➤ **Formalina neutra tamponada 10%**

Utilizada para a fixação do tecido a ser analisado.

Solução:

- 100 mL de formol (solução a 37% de formaldeído) (HCHO), peso molecular: 30,03 g/mol e CAS: 50-00-0.
- 900 mL de água destilada.
- 4,0 g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), peso molecular: 119,98 g/mol e CAS 7558-80-7.
- 6,5 g de fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), peso molecular: 141.96 g/mol e CAS 7558-79-4.

### ➤ **Álcool etílico**

( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), peso molecular 46,07 g/mol e CAS 64-17-5.

Utilizado para desidratação e posteriormente hidratação do tecido (remoção de toda água presente no tecido).

#### **30%**

30 mL de álcool etílico  
70 mL de água destilada

#### **50%**

50 mL de álcool etílico  
50 mL de água destilada

#### **70%**

70 mL de álcool etílico  
30 mL de água destilada

#### **80%**

80 mL de álcool etílico  
20 mL de água destilada

#### **95%**

95 mL de álcool etílico  
5 mL de água destilada

➤ **Xilol**

( $C_6H_4(CH_3)_2$ ), peso molecular: 106,17 g/mol e CAS 108-38-3

Utilizado para remover totalmente o álcool do interior do tecido, preparando-o para as etapas subseqüentes.

1º Xilol I (50% de álcool 100% e 50% de Xilol)

2º Xilol II (Puro)

➤ **Parafina**

A parafina fundida é utilizada para a impregnação do tecido, para que posteriormente seja seccionado.

➤ **Hematoxilina**

Coloração para lâmina (Sigma Aldrich,  $C_{16}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$ , CAS 517-28-2)

Hematoxilina \_\_\_\_\_ 2,5 g

Álcool 100% \_\_\_\_\_ 25 mL

Alúmen de amônio ou potássio \_\_\_\_\_ 50 g

Água destilada \_\_\_\_\_ 500 mL

Óxido vermelho de mercúrio \_\_\_\_\_ 1,25 g

Ácido acético \_\_\_\_\_ 20 mL

➤ **Eosina**

Coloração para lâmina (Sigma Aldrich, Ref: 230251)

Eosina solúvel em água \_\_\_\_\_ 1 g

Água destilada \_\_\_\_\_ 100 mL

➤ **Entellan®**

Utilizado para montagem da lâmina (Merck, Ref :1079610100)

## 3.2 Métodos

A infra-estrutura utilizada conta com o Departamento de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Laboratório Aerial (centro de excelência em processamento por radiação), localizado em Illkirch – Graffenstaden - França e o irradiador Gammacell do Centro de Tecnologia das Radiações (CETER-IPEN) e Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia –USP.

### 3.2.1 Amostras

As amostras de manteiga de cacau de uso culinário com prevalência de ácidos graxos precursores das 2-Alcliciclobutanonas (2-Dodecilciclobutanona, derivada do ácido palmítico e 2-Tetradecilciclobutanona, derivada do ácido esteárico) sendo C16:0; C18:0 respectivamente, foram fracionadas em porções de 100 g e submetidas ao processo de irradiação (Gammacell IPEN), nas doses de 10, 20 e 30 kGy e amostra controle (não irradiada).

#### 3.2.1.1 Preparação do extrato para análise de ácidos graxos e de 2-ACBs

#### 3.2.1.2 Extração por imersão

Foram pesadas aproximadamente 4 g de cada amostra, para que no final da extração tenhamos a quantidade ideal de 2 g de gordura. (Quadro 2).

Quadro 2 - Peso das amostras.

<b>AMOSTRA</b>	<b>PESO (g)</b>
<b>0 kGy</b>	4,2748
<b>10 kGy</b>	4,3973
<b>20 kGy</b>	4,3281
<b>30 kGy</b>	4,4214

Fonte: Autora da tese.

Foi adicionado 100 mL de hexano em cada amostra em um bequer, cobertas com papel alumínio, mantidas em banho maria à temperatura de 50 °C durante 1 hora, agitando manualmente de tempos em tempos (Figura 4).

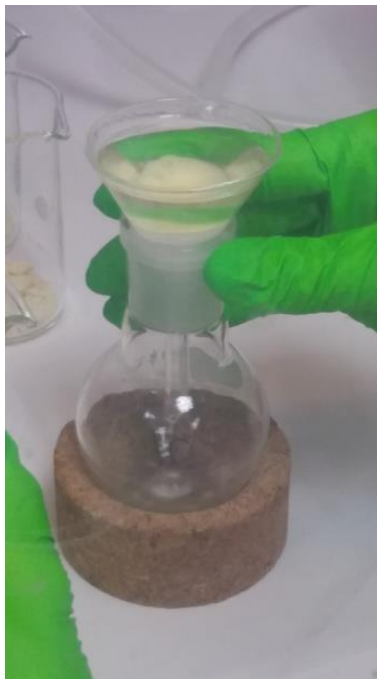
Figura 4 - Amostra de manteiga de cacau, em imersão em banho maria à 50° C.



Fonte: Autora da tese.

Após o banho maria, foi o conteúdo foi filtrado em lã de vidro e sulfato de sodio em um balão (Figura 5).

Figura 5 - Filtragem da amostra em lã de vidro e sulfato de sódio em balão.



Fonte: Autora da tese.

A amostra foi evaporada em rotaevaporador à 40 °C (Figura 6) em vácuo mínimo e rotação lenta até obter-se uma concentração de 15 mL.

Figura 6 - Evaporação em rota evaporador a 40 °C em vácuo mínimo.



Fonte: Autora da tese.

### 3.2.1.3 Concentração de lipídeos na amostra

Em vial de 5 mL, seco em estufa à 50 °C e colocado durante 10 minutos em dissecador, para eliminar qualquer umidade, foi previamente pesado ( $M_a$ ). No vial foi pipetado 250  $\mu$ L ( $V_1$ ) do extrato, evaporado por nitrogênio, colocado em estufa por 45 minutos à 50 °C e mais 10 minutos em dissecador. Foram pesados ( $M_b$ ) e calculados.

A quantidade de gordura no extrato retirado é expressa pela equação (1), pela qual obtivemos os resultados presentes no quadro 3:

$$M_1 = M_b - M_a \quad (1)$$



Onde:

$M_a$ : Peso do vial vazio

$M_b$ : Peso do vial com amostra

$M_1$ : Massa da amostra.

Quadro 3 – Quantidade de gordura no extrato.

<b>Amostra</b>	<b><math>M_a</math> (peso do vial vazio)(g)</b>	<b><math>M_b</math> (peso do vial com amostra) (g)</b>	<b><math>M_1</math>(g)</b>
<b>0 kGy</b>	3,9891	4,1069	0,1178
<b>10 kGy</b>	4,1147	4,1867	0,0720
<b>20 kGy</b>	4,6883	4,7742	0,0859
<b>30 kGy</b>	4,0119	4,1128	0,1009

Fonte: Autora da tese.

O volume do extrato ( $V_2$ ) contido em 0,2 g de gordura foi calculado por meio da equação (2) (Quadro 4).

$$V_2 = \frac{V_1}{M_1} \quad (2)$$

Onde:

$V_2$ : Volume do extrato

$V_1$ : Volume pipetado

$M_1$ : Massa

Quadro 4 - Volume do extrato em 0,2 g de gordura.

Amostras	V ( $\mu$ L) adicionado na coluna
0 kGy	0,424
10 kGy	0,694
20 kGy	0,589
30 kGy	0,496

Fonte: Autora da tese.

### 3.2.1.4 Determinação de ácidos graxos

A determinação de ácidos graxos foi realizada para a confirmação de que a amostra de manteiga de cacau apresenta os ácidos graxos precursores das 2-ACBs, a 2-Dodecilciclobutanona, derivada do ácido palmítico representado por C16 e 2-Tetradecilciclobutanona, derivada do ácido esteárico representado por C18 (AOCS, 2017).

Foram analisados por meio de análise cromatográfica, em Cromatógrafo gasoso/ espectrometria de massas Shimadzu LabSolutions<sup>®</sup> (Figura 7), no laboratório Aerial, localizado em Illkirch Graffenstaden, França.

Figura 7- Cromatógrafo gasoso/espectrometria de massas Shimadzu<sup>®</sup> - Nexis GC 20-

30



Fonte: Autora da tese.

Foi injetado 1  $\mu$ L da solução do extrato preparado anteriormente no cromatógrafo, com as seguintes condições cromatográficas:

Equipamento: GC - FID

Método: ácido graxo\_metil\_optima 225\_5

Quantidade injetada: 1  $\mu$ L

Coluna: coluna Optima® 225 0,25  $\mu$ m 60mx0,25mmID Machery Nagel 726 118,60

Temperatura do injetor: 250 ° C

Modo de injeção: Std Split / Splitless

Caudal: 1,4 mL / min

Temperatura do detector: 260 ° C

Solvente de enxaguamento: hexano (c)

Número de lavagens: 3 lavagens com solvente e 1 lavagem com amostra antes da injeção, 2 lavagens com solvente após injeção

Integração de picos: C11:0 (RT 19.094), C16:0 (RT 27.261) e C18:0 (RT 32.494).

### **3.3 Detecção das 2-ACBs**

3.3.1 Purificação por Cromatografia de adsorção por coluna de Florisil®, seguindo a Norma Européia EN1785,2003.

Preparamos as colunas de vidro de 21 cm, colocando hexano para acondicionamento. As colunas foram identificadas com dois conjuntos de dois tempos. O hexano foi colocado até a segunda marca, do segundo tempo (Figura 8).

Figura 8 - Colunas de vidro de 21 cm, identificadas com dois conjuntos de dois tempos, sendo acondicionadas com hexano.



Fonte: Autora da tese.

O Florisil<sup>®</sup> foi colocado e utilizou-se um bastão de madeira a fim de evitar a formação de grumos e bolhas de ar, até a primeira marca, aproximadamente 20 cm. Em seguida foi adicionado sulfato de sódio até a segunda marca, com aproximadamente 1 cm de espessura (Figura 9).

Figura 9 - Colunas de 21 cm com o Florisil®.



Fonte: Autora da tese.

Depositada a quantidade de extrato  $V_2$  na coluna e fechada a torneira para não secar a coluna (Figura 10).

Figura 10 - Adicionando o extrato para eluição



Fonte: Autora da tese.

As bordas foram enxaguadas com 5 a 10 mL de hexano, para garantir que todo o extrato passasse pela coluna penetrando igualmente. Adicionado o restante de hexano, 150 mL no total em um reservatório superior à extremidade. Foi eluído em fluxo entre 2 e 5 mL por minuto em um recipiente – o líquido da primeira passagem foi descartado.

Após o término da eluição, não deixando a coluna secar foi colocado um balão de 250 mL abaixo da coluna para recuperar o extrato. Eluído com 150 mL de dietil éter a 1% em hexano e aguardamos a eluição completa do solvente. Foi evaporado o balão em rotaevaporador a 40 °C em baixa rotatividade, até obter-se um volume de 5 a 10 mL.

Transferido o extrato para um tubo e concentrado com nitrogênio até obtermos a quantidade próxima de uma gota.

A amostra foi ressuspensa em uma solução de 200  $\mu\text{L}$  de 2-ciclohexilciclohexanona a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e transferido para um vial de injeção.

### 3.3.2 Detecção de 2-ACBs por GC-MS

Para detecção de 2-ACBs por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS) foi injetado 1  $\mu\text{L}$  da solução purificada, ressuspensa em 200  $\mu\text{L}$  de padrão interno 2-ciclohexilciclohexanona a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , assim como 1  $\mu\text{L}$  a solução de mistura padrão (100  $\mu\text{L}$  da solução de 2-Dodecilciclobutanona; 100  $\mu\text{L}$  da solução de 2-tetradecilciclobutanona; 10  $\mu\text{L}$  da solução mãe de 2-Ciclohexilciclohexanona (CHCH) completado o volume com isooctano). As análises foram realizadas em triplicatas.

As condições cromatográficas seguiram as seguintes especificações:

Aparelho - GC-MS

Método - 2ACBVF5MS

Quantidade de injeção - 1  $\mu\text{L}$

CombiPAL- INJETOR - injeção em fase líquida

Injetor - 260 °C

Coluna - Factor Four <sup>TM</sup> Capillary Column VF 5 ms, 30 m, 0,25 mm, 0, 25  $\mu\text{m}$  (part Number CP8944)

Lavagem 1 e 2 - hexano

Quadro 5 - Gradiente de temperatura.

Temperature (*C)	Rate (*C-min)	Hold (min)	Total (min)
70		5	5
295	8	5	38,13

Fonte: Autora da tese.

Condições de massa:

FILMUL DELAY – 6 min

Aquisição - entre 6 e 38 min

Massas - entre 70 e 400

Modo de ionização- EI Auto

### 3.4 Teste de micronúcleos por Citometria de Fluxo

#### 3.4.1 Tratamento dos animais

Mantidos no Biotério IPEN, o grupo de 16 animais foi alojado em duplas, durante 30 dias, de acordo com o tratamento a ser aplicado. A utilização de dois animais para cada dose foi suficiente para bons resultados no teste de micronúcleos por citometria de fluxo, importante para a redução do uso de animais em pesquisa.

A administração de 1g de manteiga de cacau aos animais respeita a tolerância de mL via gavagem.

Todos os animais tiveram acesso à ração normocalórica Nuvilab® e água sem restrições, seguindo os princípios de bem estar animal.

Grupo controle (CC): foi administrada a dois animais, via oral, por meio de uma seringa de 1 mL, 1 g de manteiga de cacau que não sofreu o processo de irradiação (controle), deixada em banho maria a 37 °C por 10 minutos, para obter forma líquida.



Grupo NaCl (NaCl): também foi administrada aos dois animais a manteiga de cacau da mesma forma que o grupo (CC), ao término dos 30 dias. Às 24 h que antecederam ao experimento, foi administrado 1 ml de NaCl 0,9 % via intraperitoneal (Figura 11).

Figura 11 - Injeção intraperitoneal - utilizada para administração de 1 mL de NaCl, 1 mL de Ciclofosfamida monohidratada, que são controles negativo e positivo para genotoxicidade respectivamente.



Fonte: Autora da tese.

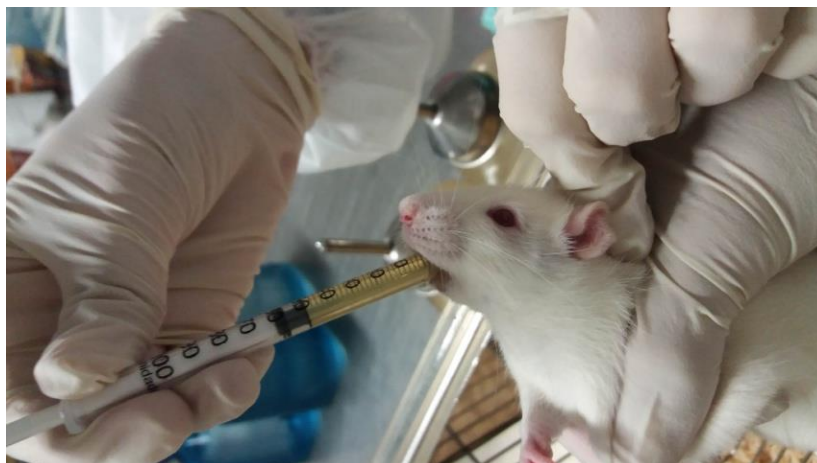
Grupo Ciclofosfamida (Ciclo): os dois animais foram suplementados diariamente via oral também com manteiga de cacau controle. Com 12 h de antecedência ao experimento foi administrada intraperitonealmente 50 mg/ mL de ciclofosfamida, solubilizada em 1 mL de NaCl 0,9%. O controle positivo foi injetado com 12 h anterior ao experimento por estar no seu pico de ação.

Grupo 2-Dodecilciclobutanonas (2-dCBs): os dois animais foram suplementados diariamente via oral também com manteiga de cacau controle, durante os 30 dias. Foi administrado nos últimos 5 dias, via oral, por meio de uma seringa de 1 mL, 1 mg/mL de 2-dCBs sintetizada para cada animal. A 2-dCB foi solubilizada em óleo de soja por ter apresentado melhores condições de diluição do composto, por ser mais fluido que a manteiga de cacau.

Grupo 2-Tetradecilciclobutanonas (2-tDCB): os dois animais do grupo foram tratados da mesma forma que os do grupo (2-dCBs) e também receberam nos 5 últimos dias de experimento a concentração de 1 mg/mL diariamente via oral de 2-tDCBs sintetizada, também solubilizada em óleo de soja.

Grupos 10 kGy, 20 kGy e 30 kGy: Foram tratados diariamente, durante os 30 dias com 1 g de manteiga de cacau irradiada nas respectivas doses (Figura 12).

Figura 12 - Administração via oral da manteiga de cacau.



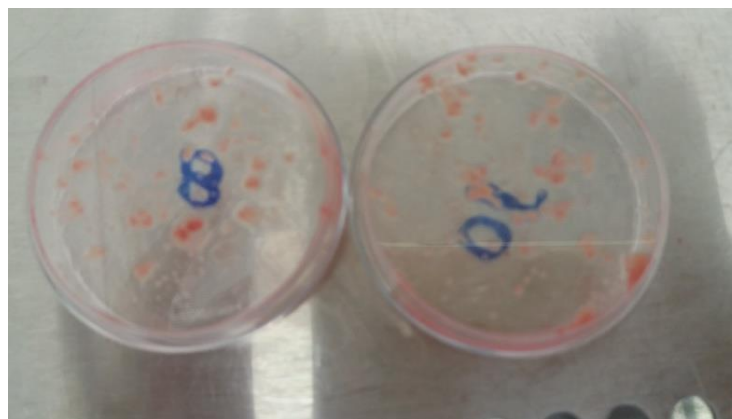
Fonte: Autora da tese.

#### 3.4.2 Isolamento de células Hepáticas

Os animais foram eutanasiados em uma câmara de CO<sup>2</sup> e retiradas porções dos lóbulos hepáticos para processamento.

O tecido hepático foi fragmentado de 3 a 4 mm e triturados por um bisturi em placa de petri (Figura 13). Foi adicionado 2 mL da solução de Hank's com colagenase (200 µg / mL) em cada amostra e passados através da agulha de uma seringa 25x0,80 para melhor dissociação do tecido (NARUMI et al., 2012).

Figura 13 - Fragmentação do tecido hepático com bisturi em placas de petri.

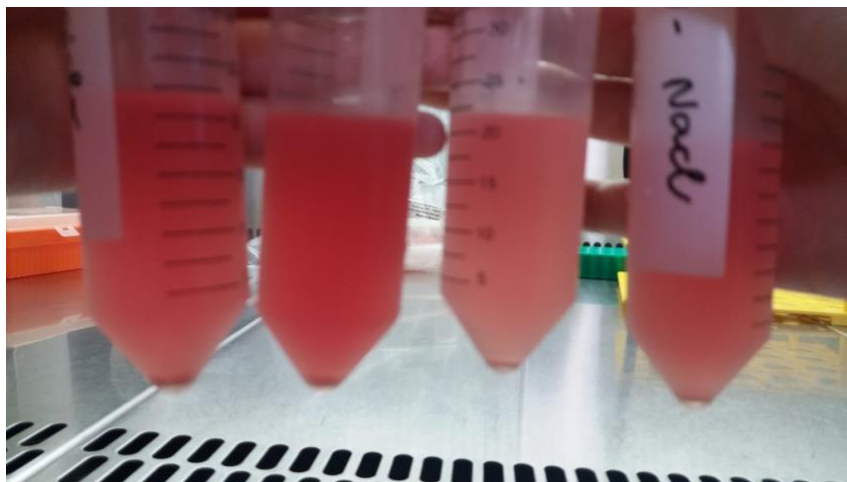


Fonte: Autora da tese.

As suspensões foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, com agitação vigorosa a cada 15 minutos e centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente).

Os peletes de células foram suspensos em cloreto de amônio (15,2 mM em água) para lisar eritrócitos e mantidos em gelo durante 5 minutos (Figura 14). As células foram centrifugadas como descrito e suspensas em solução salina tamponada com fosfato gelada (PBS).

Figura 14 - Suspensões após centrifugação e suspensão em cloreto de amônio.



Fonte: Autora da tese.

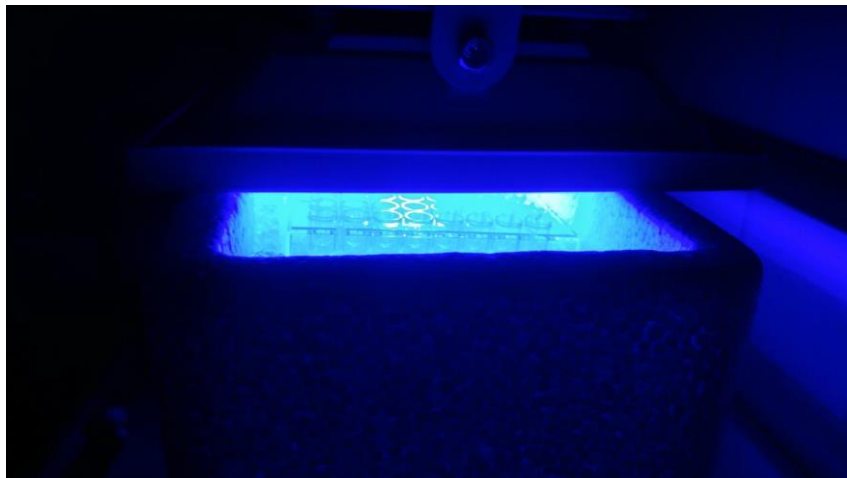
### 3.4.3 Plaqueamento para Leitura

As células hepáticas isoladas foram plaqueadas (100  $\mu\text{L}$ /poço, aproximadamente  $1 \times 10^6$ ), em placa de 96 poços em quadruplicatas. O protocolo utilizado para rotular DNA nuclear / micronuclear foi descrito por (BRYCE et al., 2007).

As células foram incubadas com EMA (Ethidium monoazide bromide, Life Technologies, Ref E3474) a uma concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluídos em PBS suplementado com 2% de soro fetal bovino, tendo sido adicionados 50  $\mu\text{L}$  por poço.

A placa permaneceu em gelo e expostas à luz led azul (30 W) durante 30 minutos para fotoativação dos compostos (Figura 15).

Figura15 - Fotoativação em Luz Led Azul e gelo por 30 minutos.



Fonte: Autora da tese.

Este procedimento rotulou núcleos e micronúcleos de células inviáveis, não entrando com estatística. Após essa fase, foi adicionado aos poços PBS e centrifugado para remover o corante.

Foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de solução I e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, retirado o sobrenadante e foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de Lise I, com o auxílio de uma pipeta multicanal o conteúdo foi ressuspensão por 10 vezes e a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 1 hora (Figura 16). Esta etapa rompe as membranas e mantém a carioteca, na lavagem remove as organelas, deixando apenas o núcleo.

Figura 16 - Ressuspensão dos poços após adicionar etapa de Lise I.



Fonte: Autora da tese.

Após o período de incubação, foram adicionados aos poços 100  $\mu$ L de Lise II e novamente ressuspensão por 10 vezes. A placa foi acondicionada a temperatura ambiente e ausência de luz por 30 minutos. A placa foi verificada em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TS 100), acoplado a um Lumencar<sup>®</sup> Mira Light Engine (4-NII-FA)

Nas etapas de pré-aquisição, as células foram analisadas usando um citômetro Accuri C6 (BD Biosciences), através da aquisição de fluorescência nos canais FL1 (SYTOX<sup>®</sup>-Green) e FL3 (EMA) (Figura 17).

Figura 17 - Placa com amostras em triplicatas para aquisição em Citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences).



Fonte: Autora da tese.

#### 3.4.4 Análises estatísticas

Após a leitura do equipamento BD CSampler, os resultados foram analisados e comparados usando *One Way- ANOVA* seguido de Bonferroni.

### 3.5 Histologia

As amostras foram processadas no laboratório de histologia do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)

#### 3.5.1 Tecido hepático

A porção com aproximadamente 3 a 4 mm do fígado foi retirada e lavada em PBS para retirada do sangue excedente para o processamento.

### 3.5.2 Fixação

O tecido foi colocado em formalina tamponada a 4% – pH 7,2, que atua como fixador e interrompe o metabolismo celular, o material permaneceu no fixador por 24 horas. Após o período de fixação, foi lavado 3x em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (30 minutos) e em seguida em H<sub>2</sub>O destilada por 1 hora antes de iniciar a desidratação.

### 3.5.3 Desidratação

A inclusão em parafina compreende antes da desidratação, quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. Foi utilizado um processador de amostras Leica® (Figura 18).

#### Sequência:

Álcool etílico 30 % _____	1 hora
Álcool etílico 50 % _____	1 hora
Álcool etílico 70 % _____	1 hora
Álcool etílico 80 % _____	1 hora
Álcool etílico 90 % _____	1 hora
Álcool etílico 100 % I _____	1 hora
Álcool etílico 100 % II _____	1 hora



Figura 18 - Processador de amostra Leica®.



Fonte: Autora da tese.

#### 3.5.4 Diafanização

A diafanização é a etapa seguinte, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, utilizando o xilol. O tecido torna-se transparente e retira-se a gordura dos tecidos.

##### Seqüência:

- 1º Xilol I (50% de Álcool 100% e 50% de Xilol) \_\_\_\_\_ 40 minutos  
2º Xilol II (Puro) \_\_\_\_\_ 40 minutos

#### 3.5.5 Inclusão em parafina

Este procedimento consiste na impregnação do tecido com uma substância de consistência firme que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas. Pelo fácil manuseio e bons resultados, a parafina é a mais utilizada neste

procedimento. O xilol foi substituído por parafina fundida a 60 °C em pequenos blocos (Figura 19).

Sequência:

Parafina I \_\_\_\_\_ 3 horas

Parafina II \_\_\_\_\_ 3 horas

Parafina III \_\_\_\_\_ 3 horas

Figura 19 - Tecido hepático incluído em blocos de parafina.



Fonte: Autora da tese.

Após a catalogação dos blocos foi feita a microtomia de 5 a 10 micrômetros e montagem das lâminas com as fitas.

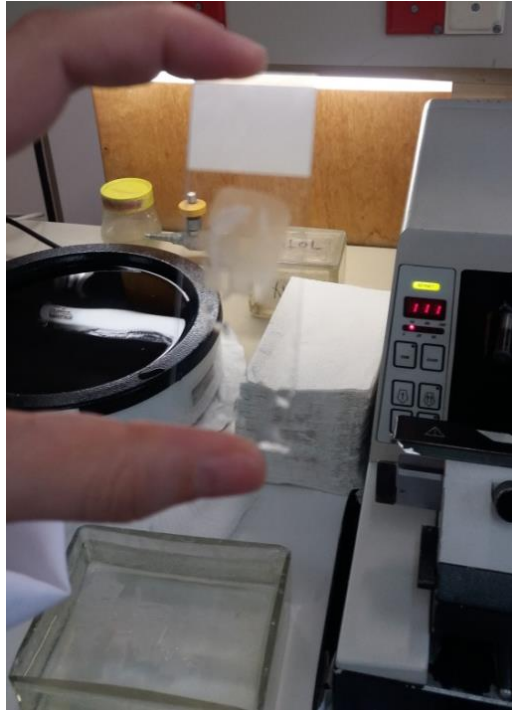
### 3.5.6 Montagem da lâmina

As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A água a temperatura entre 3° e 8° abaixo do ponto de fusão da parafina utilizada (45 °C aproximadamente).

Nesta etapa, foram retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes foram separados individualmente utilizando-se lâminas de vidro

previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e previamente secas (Figura 20).

Figura 20 - Lâmina montada após microtomia do bloco de parafina.



Fonte: Autora da tese.

### 3.5.7 Coloração HE (Hematoxilina e Eosina)

Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a Hematoxilina e a Eosina (HE). A Hematoxilina é uma base que cora, preferencialmente, componentes ácidos das células em um tom azulado escuro. Como os componentes ácidos mais abundantes são o DNA e o RNA, tanto o núcleo, quanto certas partes do citoplasma, se tornam azulados. Esses componentes são chamados de basófilos. A Eosina, ao contrário, é um ácido que cora as estruturas básicas da célula de rosa. Estas estruturas são abundantes no citoplasma e são chamadas de acidófilas (Gartner; Hiatt, 1999).

De acordo com TIMM (2005) a coloração consiste nos seguintes processos:

Sequência:

Xilol Puro I (desparafinização) _____	10 minutos
Xilol Puro II (desparafinização) _____	10 minutos
Álcool 100 % I (hidratação) _____	5 minutos
Álcool 100% II (hidratação) _____	5 minutos
Álcool 90% (hidratação) _____	5 minutos
Álcool 80% (hidratação) _____	5 minutos
Álcool 70% (hidratação) _____	5 minutos
Álcool 50% (hidratação) _____	5 minutos
Água (hidratação) _____	10 minutos
Hematoxilina de Meyer (coloração) _____	3 minutos
Água Corrente (lavagem) _____	10 minutos
Eosina amarelada (coloração) _____	de 8 a 20 minutos
Água Corrente (lavagem) _____	1 minuto
Álcool 70% (desidratação) _____	2 minutos
Álcool absoluto I (desidratação) _____	3 minutos
Álcool Absoluto II (desidratação) _____	3 minutos
Xilol I (50% de Álcool 100% e 50% de Xilol) _____	5 minutos
Xilol II Puro (Fixação do corante e conservação do material) _____	10 minutos

### 3.5.8 Montagem da lâmina com lamínula

Sequência:

- 1º - Pingar 2 gotas de resina líquida (Entelan, Permout, Bálsamo do Canadá);
- 2º - Foi colocada a lamínula sobre a lâmina;
- 3º - Pressionado levemente para tirar as bolhas;
- 4º - Permaneceram na estufa para secagem
- 5º - Etiquetadas as lâminas.

## 4 RESULTADOS

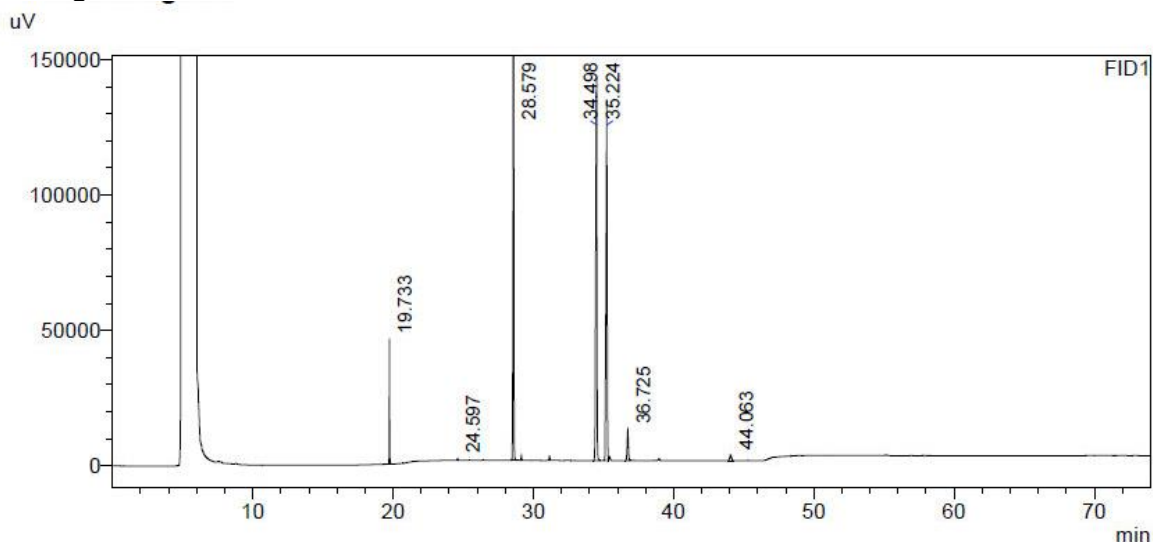
### 4.1 Determinação de ácidos graxos

A análise para caracterização foi realizada com a finalidade de confirmação dos ácidos graxos presentes nas amostras de manteiga de cacau. Foi utilizada a cromatografia gasosa/ espectrometria de massas (GC/MS) para análise.

O resultado da presente análise está de acordo com a literatura e informação nutricional fornecida pelo fabricante do produto, contendo picos de maior área nos compostos C18:0, C16:0 respectivamente, como mostra a figura 21

Foram encontradas de forma mais abundante as 2-dDCBs, provenientes do ácido palmítico representado por (C16:0), e 2-tDCBs do ácido esteárico (C18:0), como vemos na tabela de picos (Quadro 6).

Figura 21 – Cromatograma da análise por GC-MS de ácidos graxos extraídos de manteiga de cacau.



Fonte: Autora da tese.

Quadro 6 - Determinação de ácidos graxos da manteiga de cacau por GC-MS.

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	19.733	110036	46330	0.000	ppm		C11:0
2	24.597	2126	815	0.000	ppm	M	C14:0
3	28.579	803400	217087	0.000	ppm		C16:0
4	34.498	823843	141262	0.000	ppm		C18:0
5	35.224	753306	132837	0.000	ppm	V	C18:1cis
6	36.725	67901	11653	0.000	ppm		C18:2n6cis
7	44.063	18529	2264	0.000	ppm		C20:0
Total		2579142	552248				

Fonte: Autora da tese

#### 4.2 Detecção de 2-ACBs

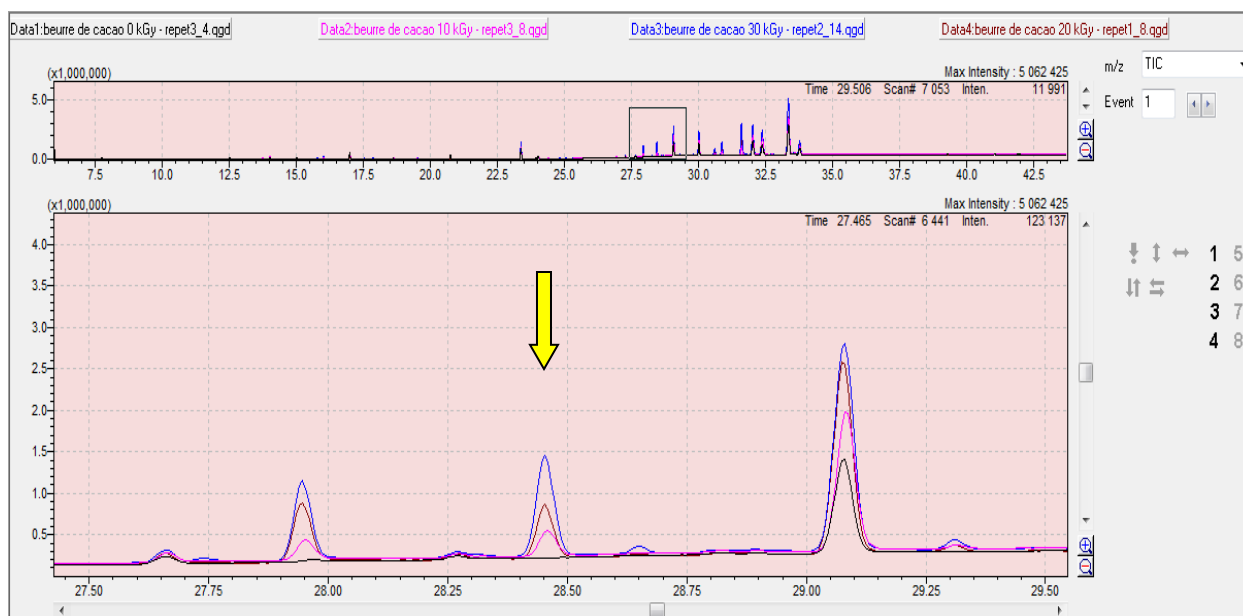
A detecção das 2-ACBs foi realizada em triplicatas, seguindo a Norma Europeia EN 1785: 2003.

As análises foram realizadas pelo método 2ACBVF5MS, Coluna- Factor Four TM Capillary Column VF 5ms, 30m, 0.25 mm, 0,25  $\mu$ m (part Number CP8944), com injeção de 1  $\mu$ L da amostra e padrões. Foram realizados os testes de calibração, que encontram-se no ANEXO A.

Os cromatogramas foram obtidos em TIC (Total íon chromatogram) e SIM (Single íon monitoring).

Observa-se em cromatograma obtido por TIC SCAN os picos de 2-dCB, crescentes em função do aumento das doses de irradiação utilizada nas amostras. (Figura 22). No cromatograma obtido por SIM, foram somados os íons 98, 112, 70 e 84 m/z.

Figura 22. Cromatograma TIC de 2- dDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy.

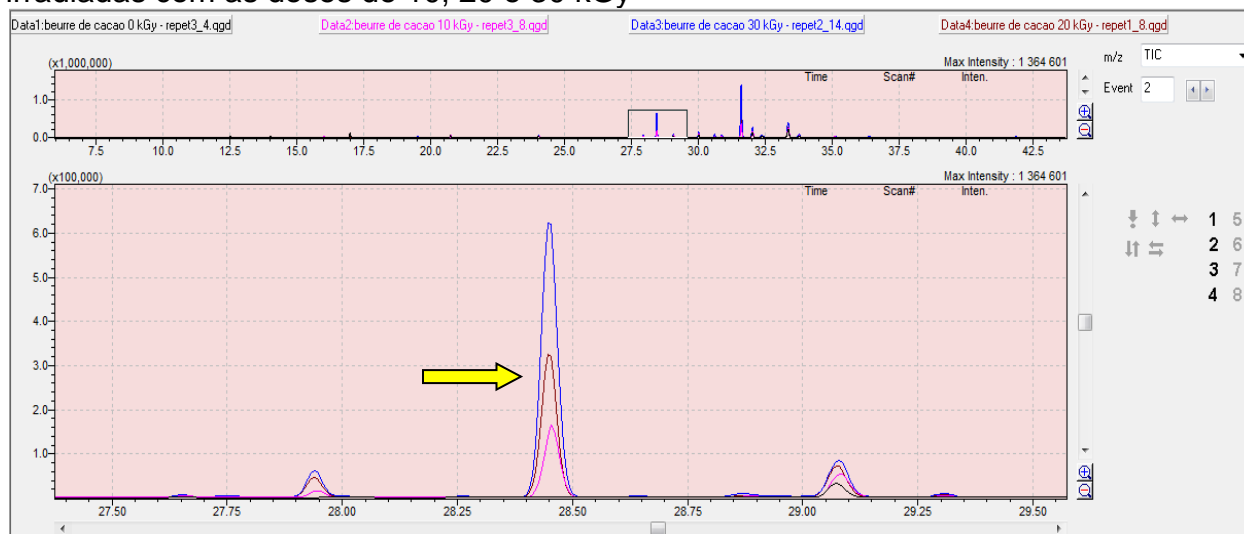


Cromatograma TIC de 2- dDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy. O pico de 2- dDCBs, com tempo de retenção 28,45 min está indicado pela seta amarela.

Fonte : Autora da tese.

Nas análises do cromatograma SIM, para 2-dDCBs, com soma dos íons 98, 112, 70,84 m/z, com RT 28,45 min, observa-se também o aumento do pico em relação à dose de radiação utilizada (Figura 23).

Figura 23 - Cromatograma SIM de 2- dDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy



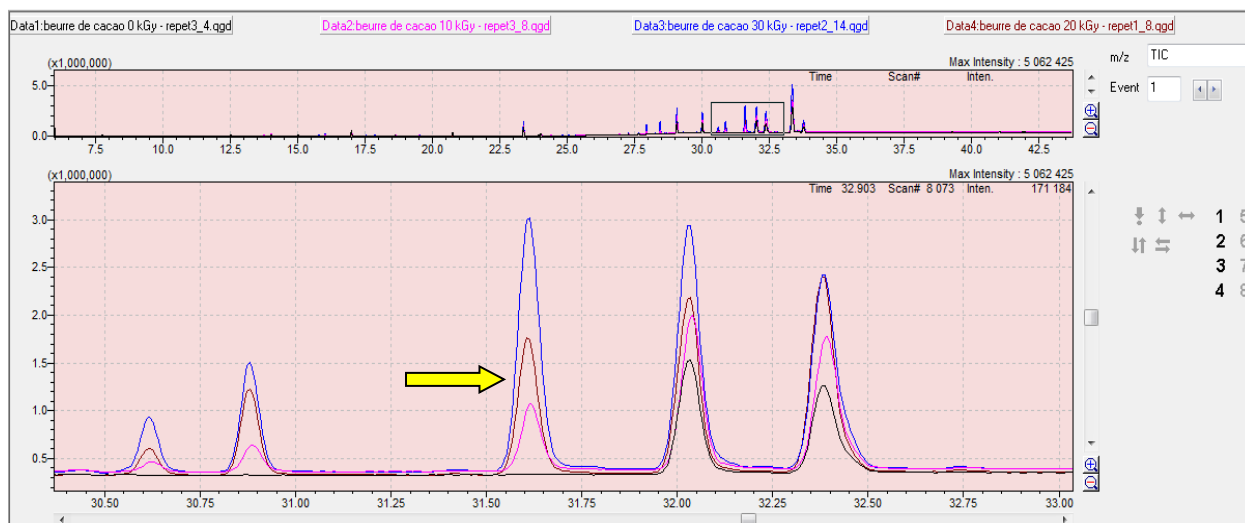
Cromatograma SIM de 2- dDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy. O pico de 2- dDCBs, com tempo de retenção 28,45 min está indicado pela seta amarela.

Fonte : Autora da tese.

As análises de 2-tDCBs foram feitas da mesma forma, com cromatogramas TIC e SIM, apresentando RT 31,65 min. Os picos dos compostos 2- tDCB presentes nas amostras irradiadas, também aumentam conforme a dose de radiação aplicada (Figura 24).



Figura 24 - Cromatograma TIC de 2- tDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy

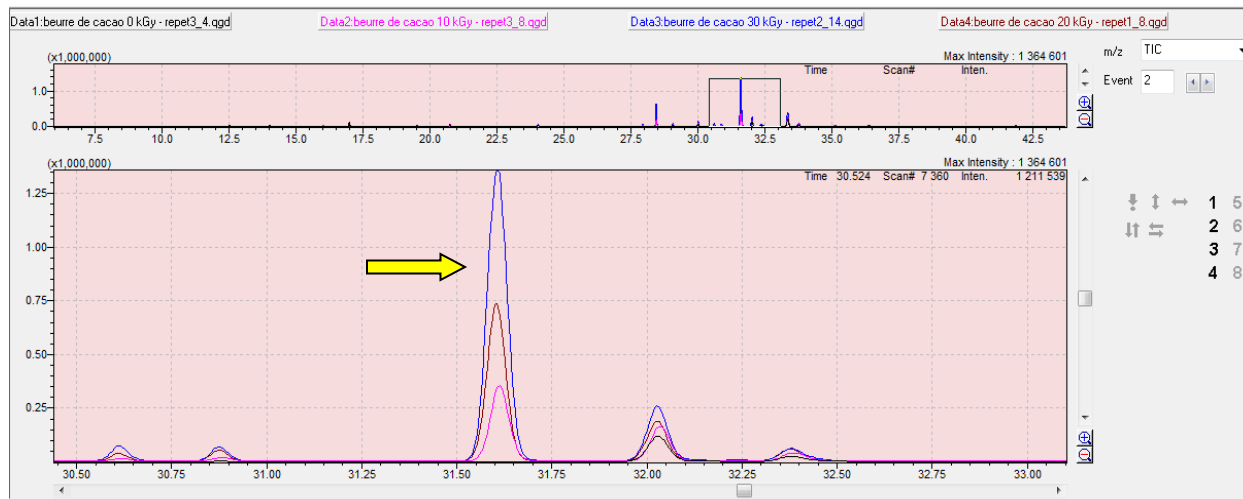


Cromatograma TIC de 2- tDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy. O pico de 2- tDCBs, com tempo de retenção 31,65 min está indicado pela seta amarela.

Fonte : Autora da tese.

Nas análises do cromatograma SIM, para 2-tDCBs, com soma dos íons 98, 112, 70,84 m/z, com RT 31,65 min, observa-se também o aumento do pico em relação à dose de radiação utilizada (Figura 25).

Figura 25 - Cromatograma SIM de 2- tDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy.



Cromatograma SIM de 2- tDCBs em amostras de manteiga de cacau irradiadas com as doses de 10, 20 e 30 kGy. O pico de 2- tDCBs, com tempo de retenção 31,65 min está indicado pela seta amarela.

Fonte : Autora da tese.

#### 4.2.1 Identificação das 2-ACBs

A identificação das 2-ACBs nas amostras foi obtida com a comparação das razões encontradas nas amostras, refletidas às encontradas nos padrões analisados ao mesmo tempo.

A 2-dDCB produz picos de íon  $m/z$  98 e  $m/z$  112 em uma razão de aproximadamente 4,0-4,5 para 1, enquanto para 2-tDCB a razão correspondente é 3,8-4,2 para 1 (EN 1785,2003). No quadro 7, observamos que todos os resultados encontram-se dentro da faixa da razão estabelecida, validando assim a identificação das 2-ACBs nas amostras analisadas.

Quadro 7- Caracterização das 2-ACBs.

Amostras	RT( min)			Área do íon m/z 98 (u.a)			Área do íon m/z 112(u.a)			Razão 98/112		
	CHCH	2-Dcb	2-TDCB	CHCH	2-DCB	2-TDCB	CHCH	2-DCB	2-TDCB	CHCH	2-DCB	2-TDCB
0 kGy	24,041			53588			0			0		
0 kGy	24,047			11915			0			0		
0 kGy	24,04			62207			0			0		
10 kGy	24,043	28,454	31,614	86092	288796	1005383	0	67834	249340	0	4,06	4,23
10 kGy	24,046	28,454	31,613	45868	109799	333376	0	24995	81748	0	4,39	4,08
10 kGy	24,046	28,454	31,612	68176	233039	778253	0	54444	193506	0	4,28	4,02
20 kGy	24,039	28,449	31,604	73518	473956	1652893	0	112459	412346	0	4,21	4,01
20 kGy	24,042	28,447	31,602	81842	347958	996970	0	82233	249799	0	4,23	3,99
20 kGy	24,039	28,449	31,603	115153	824457	2753900	0	195264	687211	0	4,22	4,01
30 kGy	24,04	28,449	31,604	44664	355886	1190705	0	84201	296067	0	4,23	4,02
30 kGy	24,041	28,45	31,608	106783	947486	3195580	0	225322	799161	0	4,21	4
30 kGy	24,043	28,451	31,605	75226	468075	1488818	0	110847	372771	0	4,22	3,99

Valores determinados por GC/MS. RT (Tempo de retenção), CHCH (Ciclohexilciclohexanona- Padrão interno), 2-dDCB (2-Dodedilciclobutanona) e 2-tDCB (2-Tetradecilciclobutanona).

Fonte: Autora da tese.

#### 4.2.2 Cálculo de quantificação das 2-ACBs

O cálculo da quantidade das 2-ACBs presentes nas amostras foi realizado pela resposta relativa F de cada 2 -ACB em relação ao padrão interno (CHCH) por meio da equação (3):

$$F = \frac{A_{ci}}{A_{pi} \times \rho_{ci}} \quad (3)$$

Onde:

$A_{ci}$ : é a área do pico do íon m/z 98 da 2- ACB;

$A_{pi}$ : é a área do pico do íon m/z 98 do padrão interno (CHCH);

$\rho_{ci}$ : é a concentração de massa da 2- ACB, em  $\mu/L$ .

Foi realizada a média de todas as respostas  $F$  para que cheguemos a  $F_m$  para cada uma das 2-ACBs. Foi calculada a concentração de massa  $\rho_{ci/a}$  em microgramas por 200  $\mu/L$  para ambas 2-ACBs, pela equação (4):

$$\rho_{ci/a} = \frac{A_{ci/a}}{A_{pi/a} \times F_m \times 5} \quad (4)$$

Onde:

$A_{ci/a}$ : é a área do pico do íon  $m/z$  98 correspondente a 2-ACB na amostra;

$A_{pi/a}$ : é a área do pico do íon  $m/z$  98 correspondente ao padrão interno na amostra;

$F_m$ : é a média de todas as razões  $F$ , calculadas por meio da equação(1).

O fator de correção para lipídio foi calculado pela equação (3) :

$$w_{ci} = \frac{\rho_{ci/a}}{m_0} \times 1000 \quad (3)$$

Onde :

$\rho_{ci/a}$ : é a concentração de massa da 2-ACB na amostra em  $\mu g/ 200 \mu/L$ , cálculo da equação (2).

$m_0$ : é o peso do lipídio proveniente da coluna de Florisil®, em mg.

$w_{ci}$ : é a fração de massa da 2-ACB correspondente, expressada em  $\mu g/g$ .

Os resultados da quantificação das 2-ACBs calculados apresentam-se no quadro 8.

Quadro 8 - Concentração de 2-ACBs nas amostras.

Amostras	Concentração no vial( $\mu\text{g}$ / 200 $\mu\text{L}$ )		Fração de lipídeos( $\mu\text{g/g}$ )		Concentração na amostra ( $\mu\text{g/g}$ )	
	2-DCB	2-TDCB	2-DCB	2-TDCB	2-DCB	2-TDCB
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0
10 kGy	0,831	4,479	4158,4	22411,8	4158,4	22411,8
10 kGy	0,593	2,788	2967,5	13948,6	2967,5	13948,6
10 kGy	0,847	4,379	4237,3	21907,7	4237,3	21907,7
20 kGy	1,597	8,624	7972,1	43041,8	7972,1	43041,8
20 kGy	1,053	4,673	5257,5	23320,9	5257,5	23320,9
20 kGy	1,774	9,173	8853,6	45783,9	8853,6	45783,9
30 kGy	1,974	10,226	9862,1	51082,6	9862,1	51082,6
30 kGy	2,198	11,479	10982,1	57342,1	10982,1	57342,1
30 kGy	1,542	7,592	7701,3	37922,8	7701,3	37922,8

Fonte: Autora da tese.

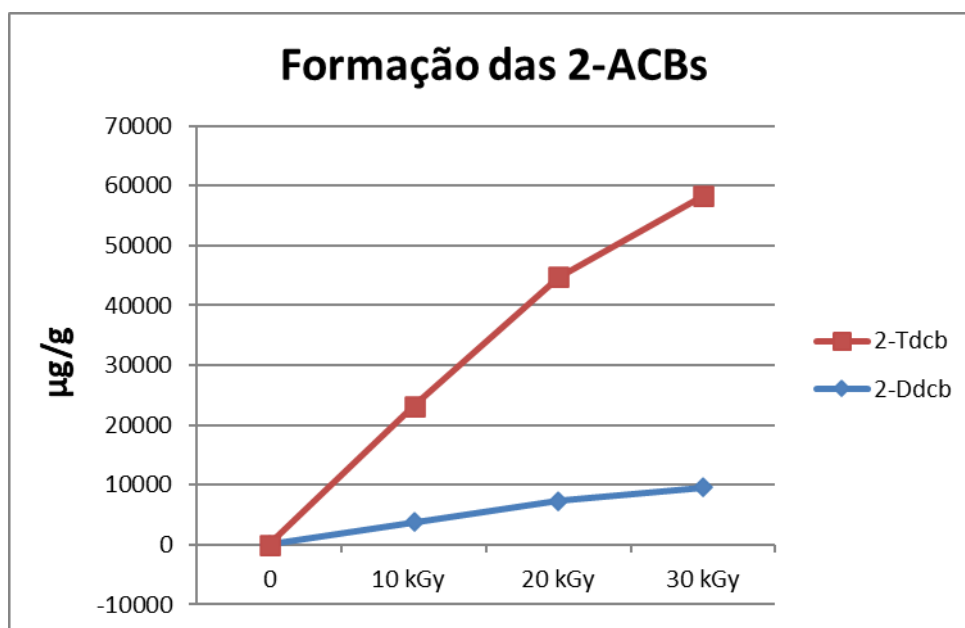
Considerando a média calculada, presente no quadro 9, nota-se um aumento considerável na concentração de 2-Tdcb, na concentração de 2-dCBs também houve aumento, porém mais discreto, ambas em função da dose de radiação aplicada na amostra, como mostra o gráfico 1, confirmando assim alguns trabalhos realizados que concluem que as concentrações dos compostos sejam dose-dependentes (BARBEZAN, 2017).

Quadro 9 – Média e desvio padrão das concentrações de 2-ACBS presentes nas amostras.

	<b>2-dDCB</b>	<b>2-tDCBs</b>
<b>Dose</b>	<b>Média±DV (µg/g )</b>	<b>Média±DV (µg/g )</b>
0	0,0±0	0,0±0
10 kGy	3787,7±711,4375	19422,7±4747,405
20 kGy	7361,1±1874,301	37382,2±12254,38
30 kGy	9515,27±1667,688	48782,5±9911,869

Fonte: Autora da tese.

Gráfico 1- Formação das 2-ACBs em µg/g, nas doses de 10, 20 e 30 kGy.



Fonte: Autora da tese.

### 4.3 Evolução de massa corporal dos animais

A ingestão de alimentos em cada grupo consistiu em ração comercial normocalórica Nuvilab® e suplementação diária com administração via oral de 1 g de manteiga de cacau solubilizada. Os animais foram pesados semanalmente.

A massa corpórea dos animais foi analisada estatisticamente por meio da Oneway ANOVA, por meio do programa Excel®, a fim de relacionar possíveis variâncias na massa corporal com a ingestão diária de manteiga de cacau (Tabela 3).

A Anova utilizada para avaliar a possível influência no aumento de peso dos animais que ingeriram manteiga de cacau diariamente, foi observado que tratamento não influenciou significamente o aumento de peso, para um nível de confiança de 95%. Como o valor de  $p$  (0,072297) foi maior que o  $\alpha$  especificado de 0,05 e  $F < F_c$ , considera-se a não rejeição da hipótese nula de igualdade das médias, podemos dizer que não existe diferenças estatisticamente consideráveis na massa corporal dos animais dos grupos avaliados.

Tabela 2 – Variância da massa corporal entre grupos de animais.

RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
		mg	mg	mg		
CTRL	2	648	324	128		
NACL	2	760	380	288		
CP	2	712	356	288		
10 kGy	2	646	323	882		
20 kGy	2	691	345,5	544,5		
30 kGy	2	667	333,5	264,5		
2-DCB	2	689	344,5	84,5		
2-TDCB	2	623	311,5	24,5		

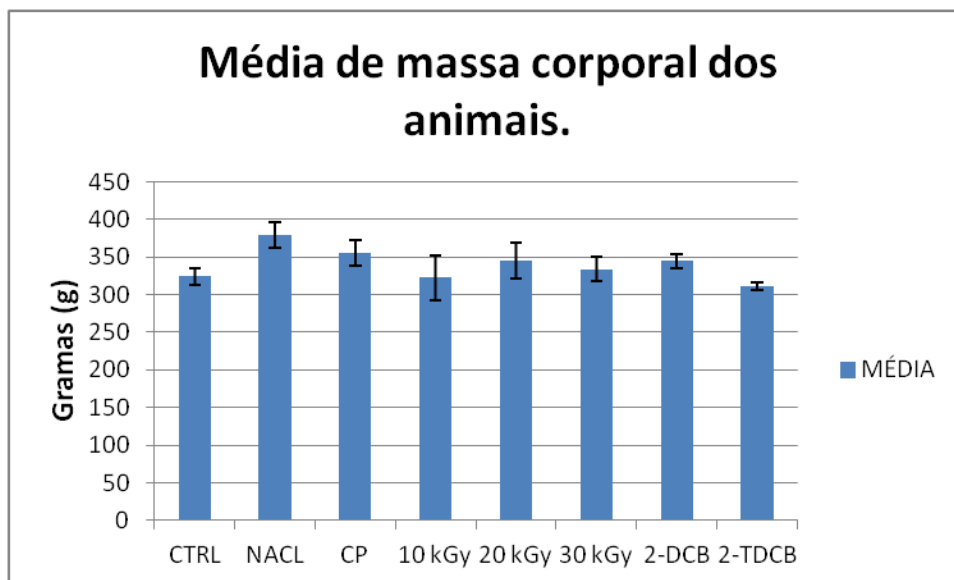
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6611	7	944,4286	3,017344	0,072297	3,500464
Dentro dos grupos	2504	8	313			
Total	9115	15				

Oneway ANOVA. ( $p < 0,05$ )

A evolução do peso de cada animal foi semelhante ao longo do período experimental mantendo parâmetro da linhagem *Wistar*, que é de 350-500 g para um macho adulto jovem de aproximadamente 8 semanas, de acordo com o MANUAL DA FCF-IQ/USP como apresentado no Gráfico 2.



Grafico 2– Média de massa corporal dos animais.



Fonte: Autora da tese.

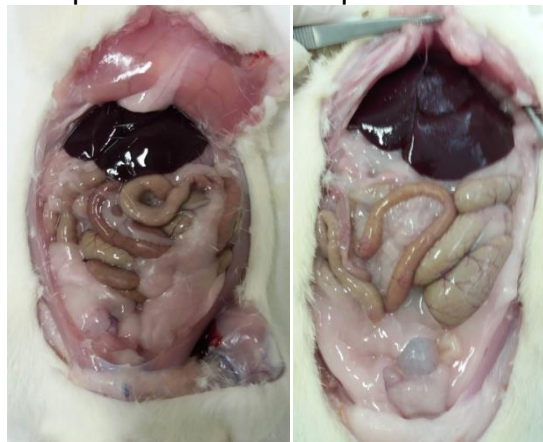
#### 4.4 Aspectos macroscópicos dos órgãos

Na macroscopia, os tecidos hepáticos foram considerados normais no que se refere à cor, forma, tamanho e consistência. Neste estudo, a coloração do órgão foi considerada como um dos principais parâmetros macroscópicos para descrição das alterações macroscópicas.

Identificou-se a presença de gordura visceral em toda cavidade abdominal. Nenhum animal apresentou pontos de esteatose hepática visíveis. A ingestão de ração se deu dentro da normalidade.

Análises macroscópicas dos tecidos hepáticos dos animais do grupo controle (CTRL), apresentaram cavidades abdominais de formação normais, fígado com aspectos dentro da normalidade (Figura 26).

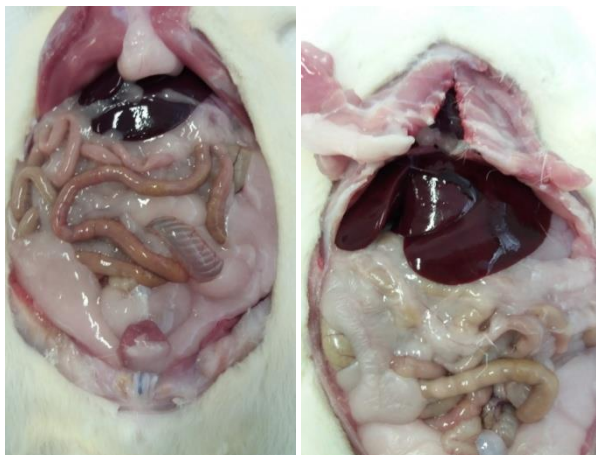
Figura 26 - Análise macroscópica dos tecidos hepáticos dos animais do grupo controle.



Fonte: Autora da tese.

Animais do grupo Controle Negativo (NaCl) apresentaram características macroscópicas normais do fígado e presença de gordura em toda cavidade abdominal (Figura 27).

Figura 27 - Animais do grupo Controle Negativo (NaCl).



Fonte: Autora da tese.

Os animais do grupo controle positivo (Ciclofosfamida) apresentaram aspecto e coloração normais, lóbulos bem definidos (Figura 28).

Figura 28 - Animais do grupo controle positivo (Ciclofosfamida).



Fonte: Autora da tese.

Nos animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 10 kGy, observam-se órgãos com aspectos totalmente normais, pouca gordura visceral, fígado com coloração normal (Figura 29).

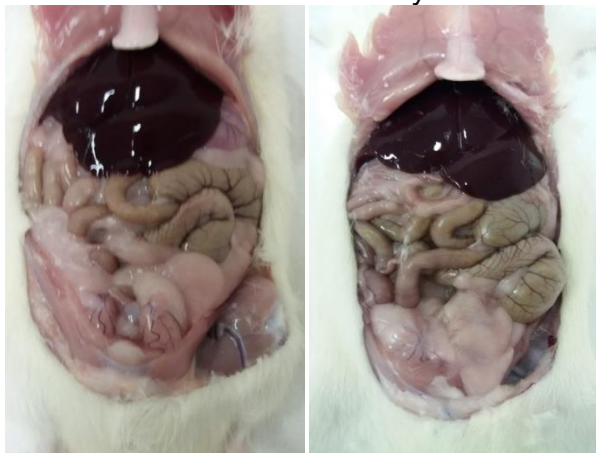
Figura 29 - Animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 10 kGy.



Fonte: Autora da tese.

Os animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 20 kGy apresentam órgãos de aspectos normais, fígado com coloração e irrigação dentro da normalidade, sem sinais visíveis de esteatose (Figura 30).

Figura 30 - Animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 20 kGy



Fonte: Autora da tese

Animais do grupo experimental, suplementados com manteiga de cacau irradiada a 30 kGy mantêm o fígado em condições normais, coloração e irrigação adequadas e lóbulos bem definidos (Figura 31).

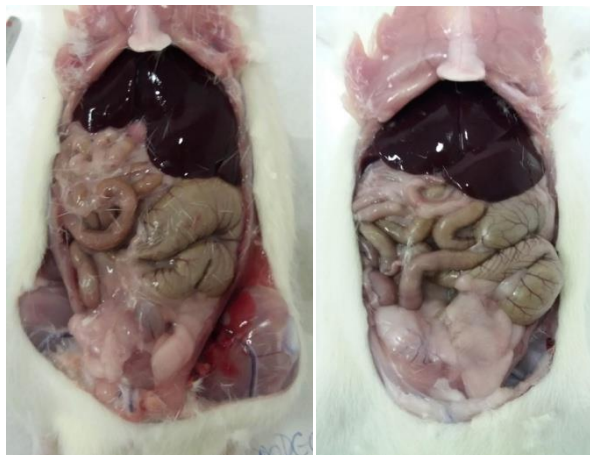
Figura 31 - Animais do grupo experimental alimentados com manteiga de cacau irradiada a 30 kGy.



Fonte: Autora da tese.

Os animais administrados via oral com 1 mg/mL diário de 2-dCBs, durante 5 dias, não apresentaram alterações visíveis, o fígado encontra-se em condições normais macroscopicamente (Figura 32).

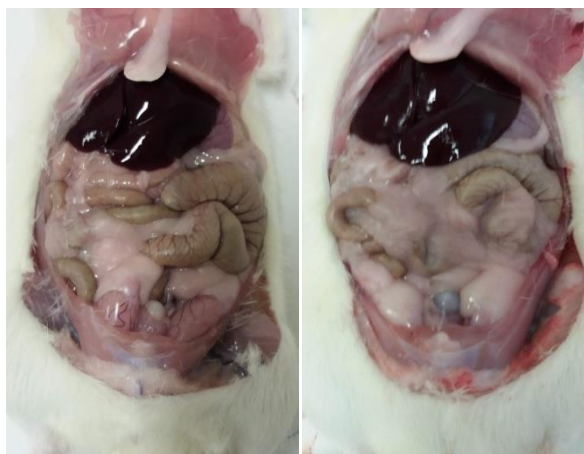
Figura 32- Animais grupo experimental 2-dBCBs.



Fonte: Autora da tese.

Os animais do grupo experimental 2-tDCBs que foram administrados via oral com 1 mg/mL ao dia durante 5 dias com o referido composto, macroscopicamente não encontram-se alterações, fígado de coloração e aspectos gerais normais (Figura 33).

Figura 33- Animais do grupo experimental 2-tDCBs.



Fonte: Autora da tese

#### 4.5 Ensaio de MNs

Neste teste os animais foram alimentados via oral durante 4 semanas com manteiga de cacau irradiada nas doses de 10, 20 kGy e 30 kGy (consideradas altas

doses), por conterem uma alta quantidade de 2-ACBs derivadas de seus ácidos graxos precursores.

Na figura 34 observamos Estratégia de Gating para análise da frequência de micronúcleos a partir de experimentos.

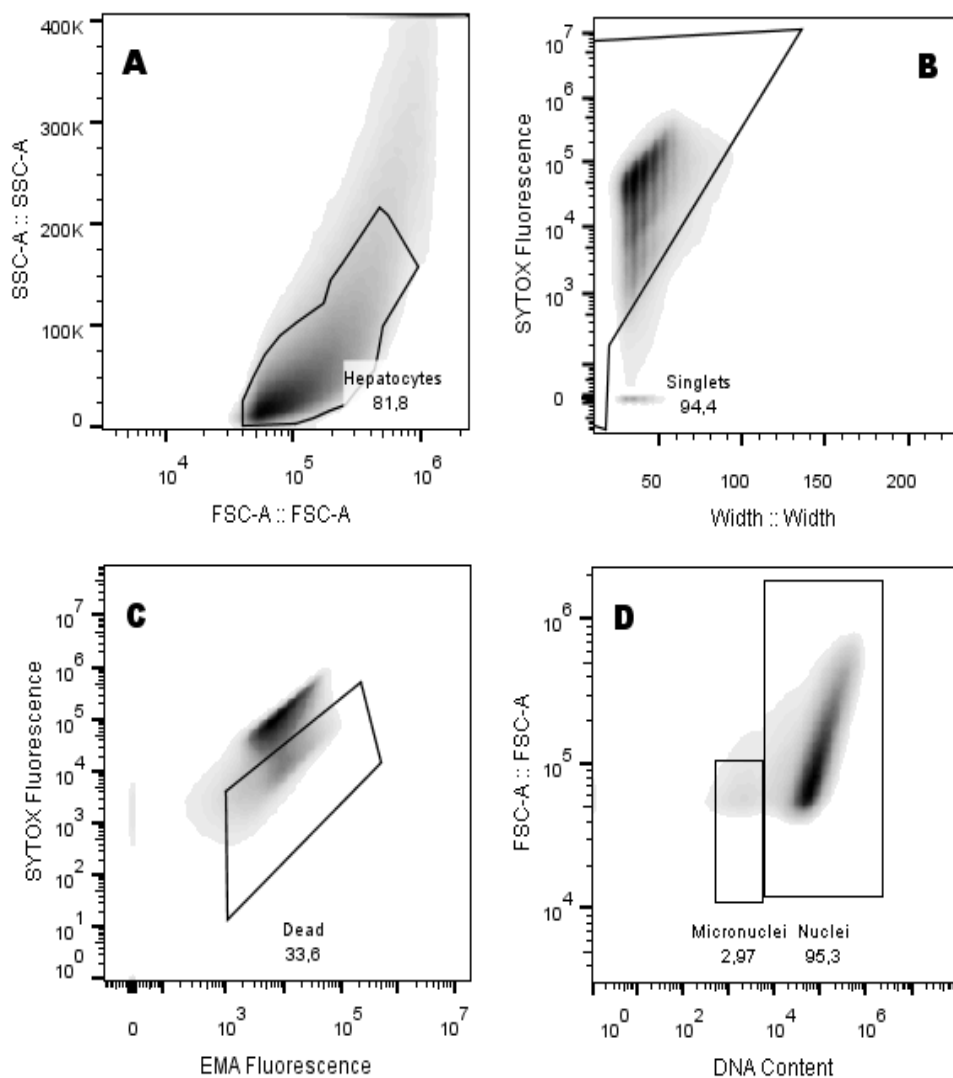
O ensaio foi primeiramente realizado no grupo 10 kGy. O controle positivo para genotoxicidade (CP) induziu o aumento na frequência de MNs, possibilitando assim validar o ensaio, o metil metano sulfonado, foi descartado das análises subsequentes por não atingir o dano genotóxico suficiente ou ter ocorrido reparo de dano, sendo inconsistente para a validação do ensaio (Figura 35).

Os ensaios dos grupos 20 e 30 kGy foram realizados posteriormente, juntamente com os grupos experimentais dos compostos sintetizados, importantes para comparação com os resultados a partir da ingestão de 2-ACBs naturalmente presentes nos alimentos que contenham gordura e passaram por processo de irradiação.

Os animais que foram tratados com 2-dDCB e 2-tDCB apresentaram um número considerável de indução de MNs, podendo ser comparado ao controle positivo.

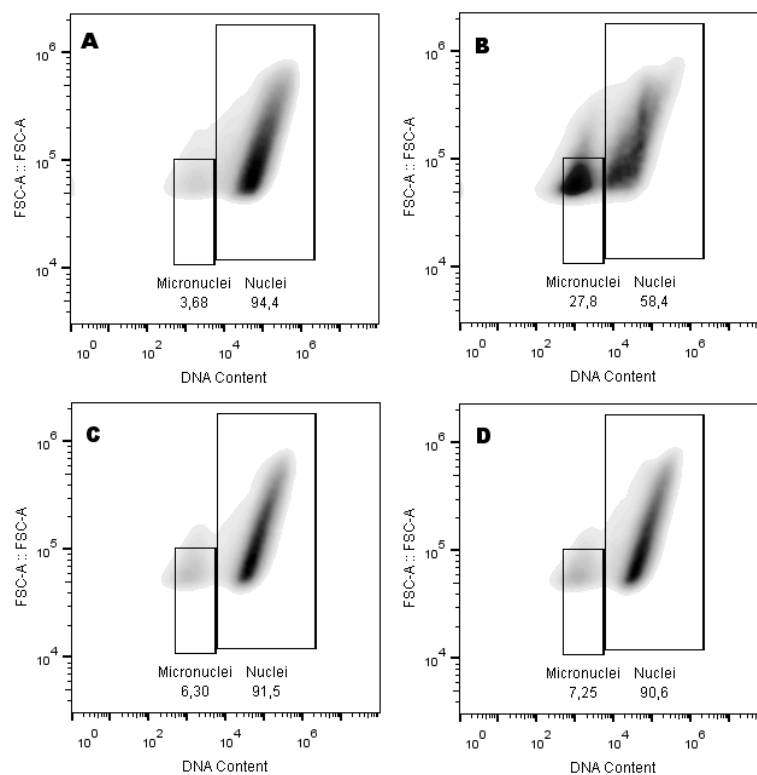
Por outro lado, o grupo experimental, alimentado com manteiga de cacau irradiada não apresentou potencial de indução genotóxica, mostrando que a concentração de 2-ACBs ingerida por meio da alimentação é insuficiente para causar danos genotóxicos (Gráfico 3).

Figura 34 - Estratégia de gating para análise da frequência de micronúcleos a partir de experimentos.



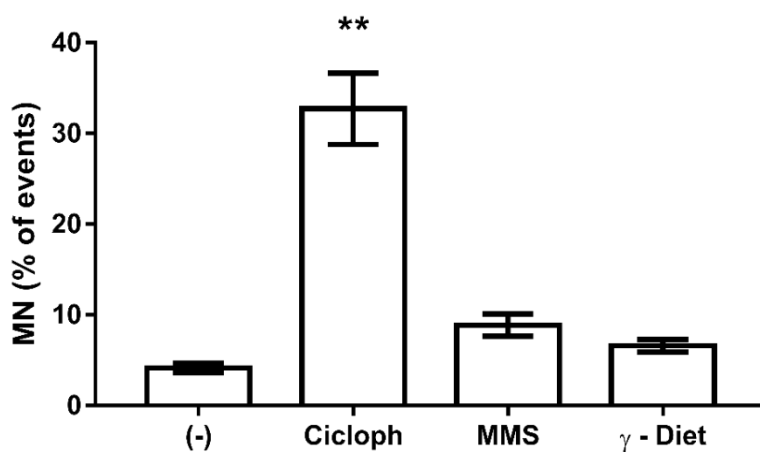
(A): gating celular; (B): eliminação de dobragem / caracterização de singlet; (C) Exclusão de células mortas da análise; (D) Núcleos e regiões MN delimitadas na trama. Os números nas parcelas referem-se a porcentagens dos eventos totais representados em cada parcela.

Figura 35 - Resultado do grupo experimental 10 kGy



(A) NaCl 0,9%; (B) Ciclofosfamida, (C) MMS, (D) Dieta irradiada 10 kGy.

Gráfico 3 - Porcentagem de MN (% dos eventos totais) de células hepáticas

NaCl (-), Ciclofosfamida, MMS (Metil metano sulfonado) e dieta irradiada 10 kGy ( $\gamma$ -diet). Barras: SEM. (\*\*):  $p < 0,01$  (diferença do controle negativo).



#### 4.5.1 Ensaio de Micronúcleos 20 kGy e 30 kGy

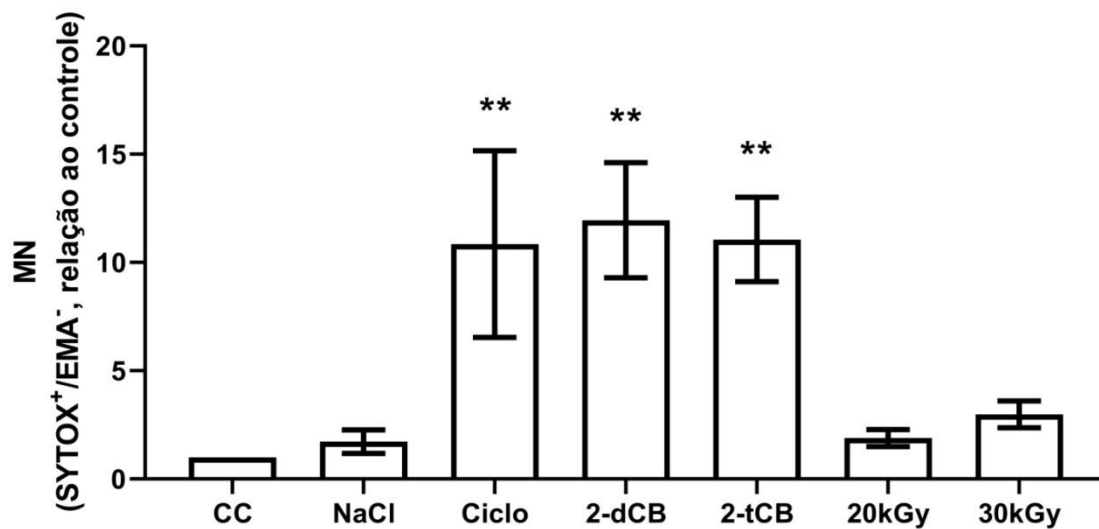
Os animais foram alimentados com dieta normocalórica Nuvilab® e suplementados diariamente com manteiga de cacau irradiada e não irradiada por 30 dias. Administramos via oral 1 mg / dia de 2-dDCB e 2-tDCB para cada animal do grupo experimental 2-ACBs nos últimos 5 dias antes do experimento.

Observamos um crescimento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos (MNs) das amostras dos animais dos grupos 2-dDCB e 2-tDCB comparado ao grupo controle.

Por outro lado, o grupo que ingeriu a manteiga de cacau irradiada, representando a quantidade ingerida naturalmente pelos alimentos, não apresentou quantidades significativas que induzam genotoxicidade (Gráfico 4). O controle positivo químico (CP) induziu claramente MNs (Figura 36).

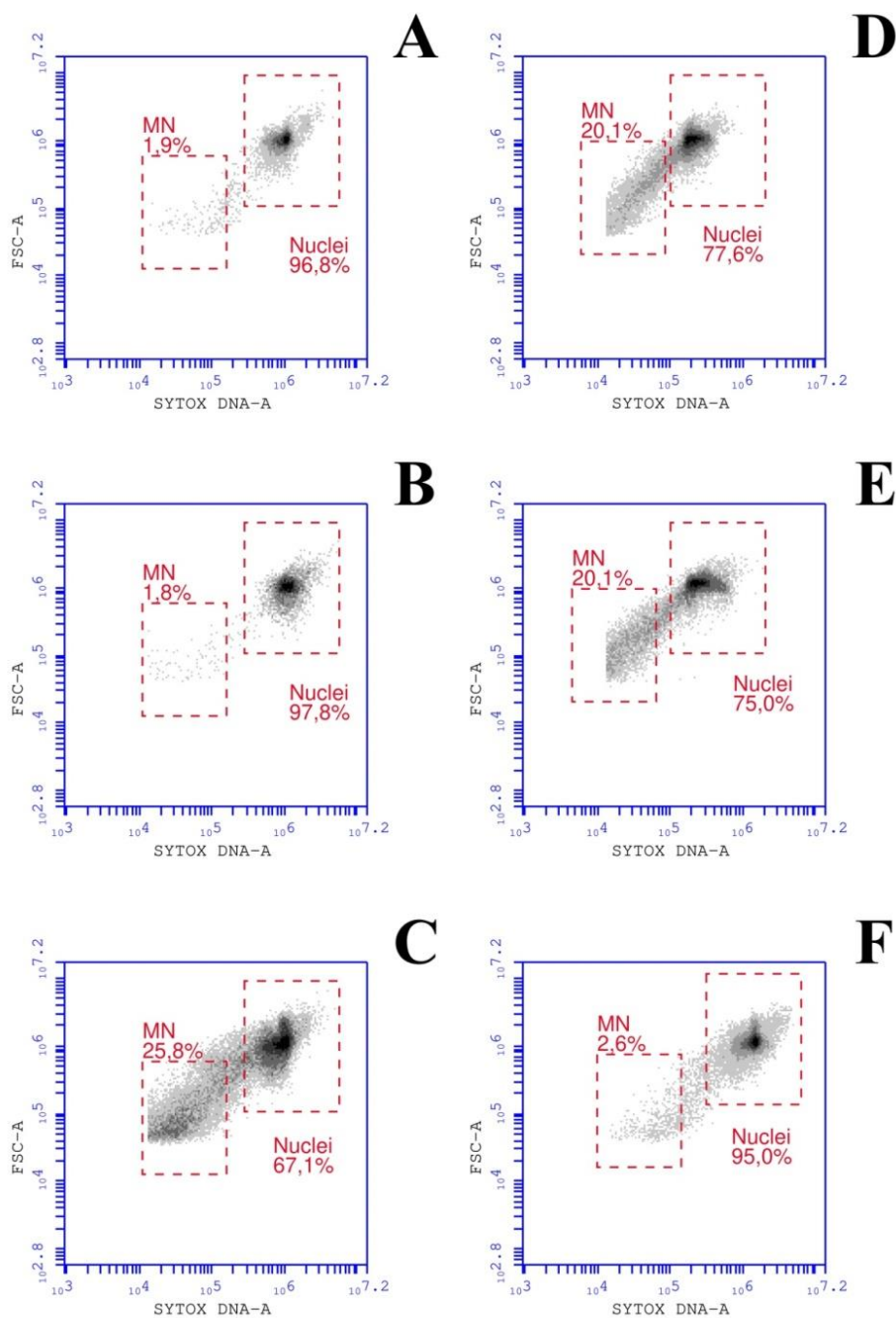
Na figura 37 podemos observar a formação de MNs em imagens microscópicas do grupo controle, controle positivo e negativo, na figura 38, visualizamos o grupo experimental que ingeriu manteiga de cacau irradiada e na figura 39 o grupo induzido com 2-Dcb e 2-Tdcb.

Gráfico 4 - Formação de Micronúcleos.



CC (controle celular), NaCl (controle negativo), ciclofosfamida (controle positivo), 2-dodecilciclobutanona, 2-tetradecilciclobutanona e manteiga de cacau irradiada a 20 kGy e 30 kGy. Barras: SEM. (\*\*):  $p < 0,01$  (diferença do controle negativo).

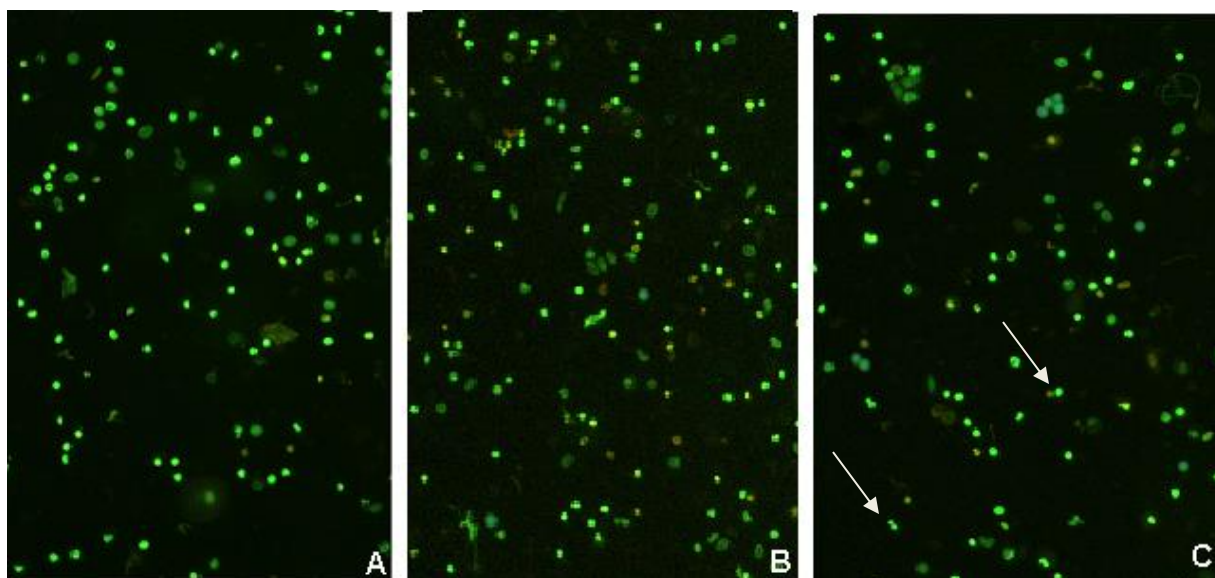
Figura 36 - Indução de micronúcleos.



(A) Controle de células, (B) NaCl 0,9%; (C) Ciclofosfamida, (D) 2-dodecilciclobutanona, (E) 2-tetradecilciclobutanona e (F) manteiga de cacau irradiada com 20 kGy.

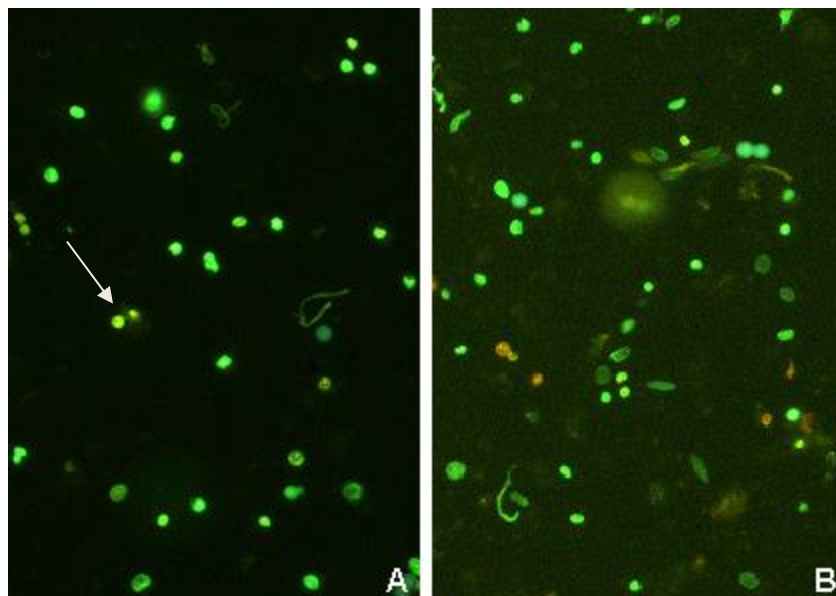
Após o plaqueamento e etapas de lise, as placas de 96 poços foram levadas ao microscópio de fluorescência Nikon 80I® e obtivemos imagens que ilustram a formação de MNs. Na figura 37, observamos a formação de MNs no poço de controle positivo CP, com a indução esperada. No grupo tratado com 20 e 30 kGy representado pela figura 38, a incidência de MNs foi baixa em relação ao grupo 2-ACBs, que houve uma maior indução de MNs (Figura 39).

Figura 37 – Imagens microscópicas (Controles)



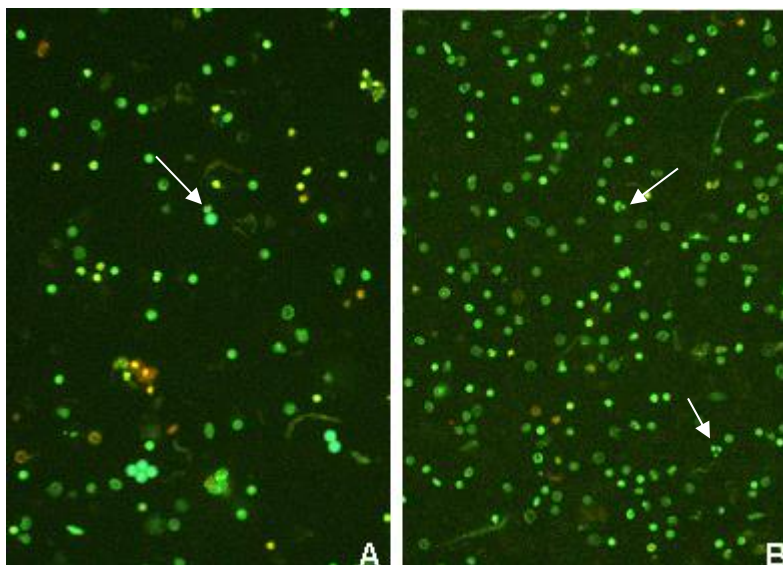
Células hepáticas dos animais tratados com controles positivos e negativos: (A) CC- Controle celular. (B) NaCl e (C) Ciclofosfamida. (Na ponta da seta, presença de micronúcleos).

Figura 38 - Imagens microscópicas (Grupos 20 e 30 kGy)



Células hepáticas dos animais: ( A) Grupo 20 kGy (B) Grupo 30 kGy e (Na ponta da seta, presença de micronúcleos).

Figura 39 - Imagens microscópicas (Grupo 2-ACBs)



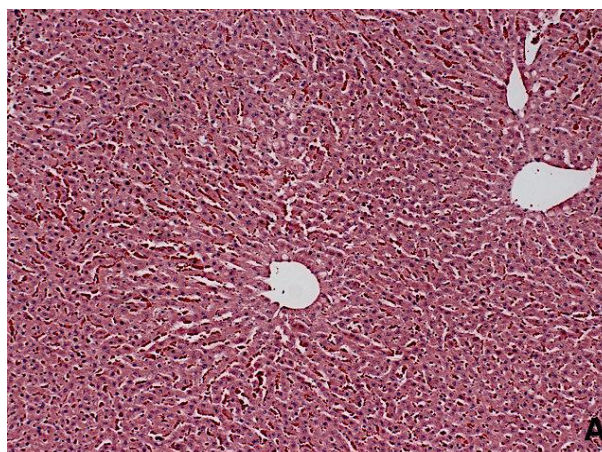
Células hepáticas dos animais tratados com: (A) 2-dDCB E (b) 2-tDCB. (Na ponta da seta, presença de micronúcleos).

#### **4.6 Análise Histológica**

Nos cortes histológicos analisados, em todos os grupos estudados, foi possível observar nas figuras 40, 41, 42, 43, 44 e 45 a preservação arquitetural hepática, com hepatócitos com amplo citoplasma, núcleocentralizado, contornos citoplasmáticos de aspectos normais. Esses estão arranjados em cordões e placas que se anastomosam. Os cordões de hepatócitos são delimitados por espaços sinusóides, conteúdo hemácias em seu interior, com aspecto de normalidade.

Eventuais células de Kupffer (CK) estão visíveis. A arquitetura lobular está mantida, tendo como área central a veia centrolobular, apresentando contornos preservados e por vezes é notado fluxo sanguíneo com presença de eritrócitos em seu interior. Quando visíveis, a tríade hepática também apresenta aspectos de normalidade. Dentro dos grupos analisados, não foi possível notar a presença de infiltrado inflamatório, alterações celulares, presença de áreas de necrose, assim como alterações displásicas. Eventuais áreas com presença focal de esteatose são vistas, porém, dentro dos limites de normalidade.

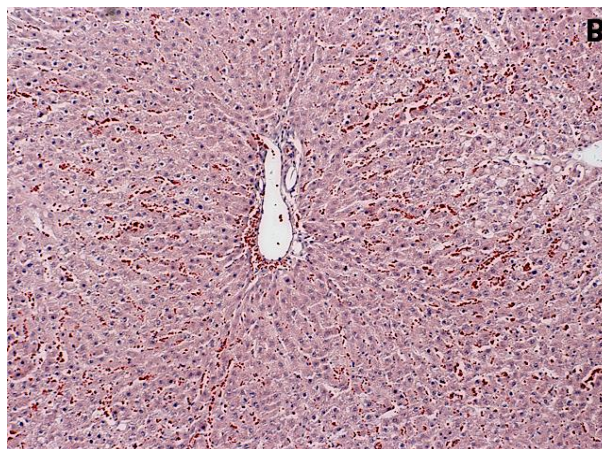
Figura 40 - Histologia Controle



Corte histológico hepático, corado em hematoxilina e eosina (H&E) em aumento de 100X (objetiva de 10x) mostrando características histológicas do fígado dos animais sendo em (A) Grupo Controle.

Fonte: Autora da tese

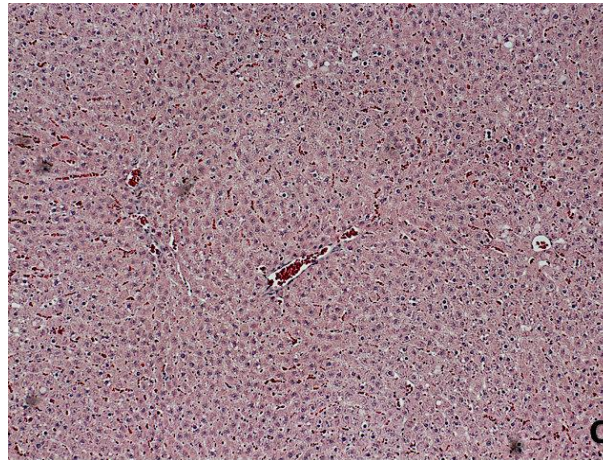
Figura 41 - Histologia Grupo 10 kGy.



Corte histológico hepático, corado em hematoxilina e eosina (H&E) em aumento de 100X (objetiva de 10x) mostrando características histológicas do fígado dos animais sendo em (B) Grupo 10 kGy.

Fonte: Autora da tese

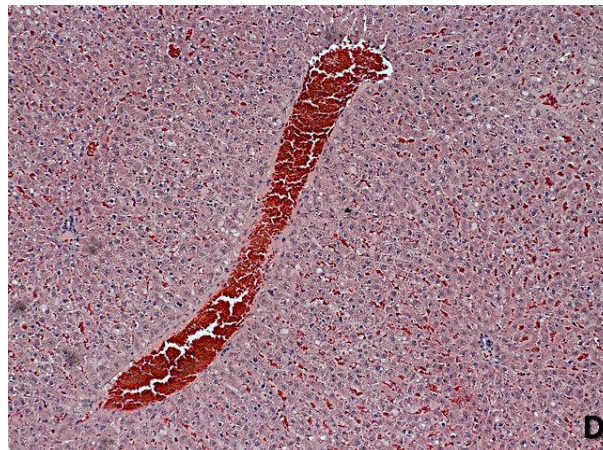
Figura 42 - Histologia Grupo 20 kGy.



Corte histológico hepático, corado em hematoxilina e eosina (H&E) em aumento de 100X (objetivade 10x) mostrando características histológicas do fígado dos animais sendo em (C) Grupo 20 kGy

Fonte: Autora da tese

Figura 43- Histologia Grupo 30 kGy

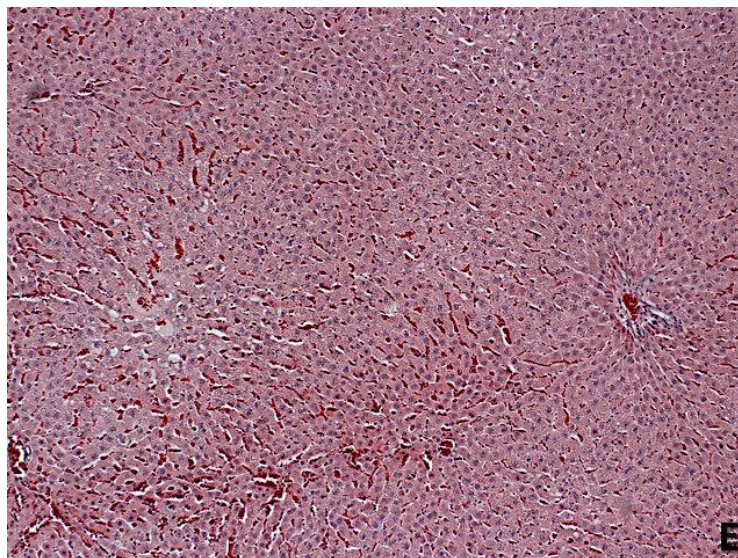


Corte histológico hepático, corado em hematoxilina e eosina (H&E) em aumento de 100X (objetivade 10x) mostrando características histológicas do fígado dos animais sendo em (D) Grupo 30 kGy.

Fonte: Autora da tese



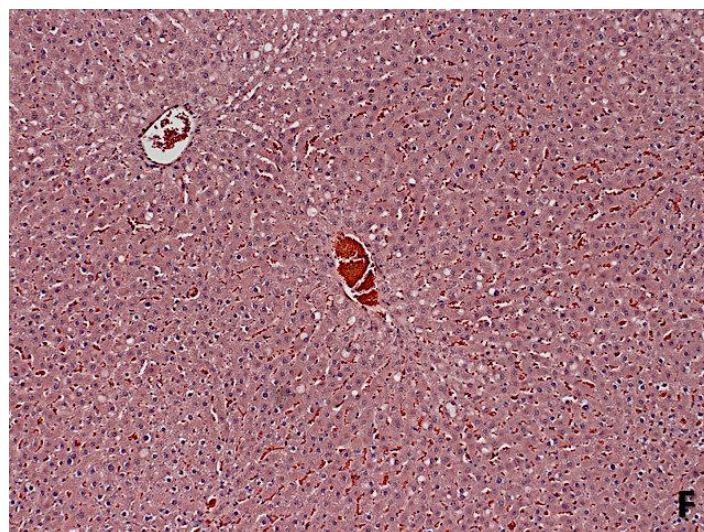
Figura 44 - Histologia Grupo 2- dDCBs.



Corte histológico hepático, corado em hematoxilina e eosina (H&E) em aumento de 100X (objetivade 10x) mostrando características histológicas do fígado dos animais sendo em (E) Grupo 2-DCBs.

Fonte: Autora da tese.

Figura 45 - Histologia Grupo 2-tDCBs.



Corte histológico hepático, corado em hematoxilina e eosina (H&E) em aumento de 100X (objetiva de 10x) mostrando características histológicas do fígado dos animais sendo em (F) Grupo 2-TDCBs

Fonte: Autora da tese.

## 5 DISCUSSÃO

A tecnologia de irradiação parece ser uma das técnicas mais capazes de satisfazer as crescentes demandas dos consumidores em termos de segurança e sustentabilidade, de modo a nutrir a população mundial, mantendo a qualidade do produto (BASHIR, 2020).

Todas as agências internacionais, como OMS, FDA e IAEA, aprovam a irradiação de alimentos como uma técnica segura e eficaz para garantir a segurança e qualidade dos alimentos.

A FDA preconiza doses não superiores a 1 kGy para frutas e legumes para controlar ou remover insetos, pragas e outros artrópodes e inibir a germinação e amadurecimento para manter o frescor. Além disso, a irradiação de aves não deve exceder 3 kGy para controlar patógenos de origem alimentar. Para carne refrigerada ou congelada, as doses recomendadas de irradiação para remover patógenos são 4,5 kGy e 7,0 kGy, respectivamente. As desidratadas podem ser tratadas com doses de até 10 kGy para controlar os microrganismos. Especiarias e temperos podem sofrer irradiação com doses que não excedam 30 kGy para controlar microrganismos (IAEA, 2002).

No entanto resultados de estudos recentes validam que a aplicação de altas doses de radiação (> 10 kGy) é segura e eficaz. Não há dúvida sobre a segurança e adequação nutricional dos alimentos irradiados. No entanto, em altas doses, foi observada redução nas propriedades sensoriais de alguns alimentos irradiados. Assim, são necessários mais estudos sobre como melhorar as qualidades sensoriais de alimentos irradiados em altas doses (FELICIANO, 2018).

Sobre os requisitos de rotulagem, o FDA exige que os fabricantes de alimentos informem os consumidores se um produto alimentício foi irradiado.

Os produtos alimentícios irradiados devem conter o símbolo radura ou devem ser rotulados com a informação "ALIMENTO TRATADO POR PROCESSO DE IRRADIAÇÃO" (BRASIL, 2001).

As pessoas associam a radiação ionizante ao câncer e consideram os alimentos irradiados como igualmente perigosos. Esse é um equívoco que deve ser erradicado pela educação adequada (RAVINDRAN; JAISWAL, 2019).

Apesar de todos os benefícios da técnica de irradiação de alimentos, nota-se claramente que a aceitação pública é negativa e a população, no mais das vezes, desinformada, os julgamentos dos consumidores e a tomada de decisões dependem da sua percepção sobre riscos e benefícios. (LEVY, 2018).

O tratamento de radiação ionizante de alimentos contendo lipídios resulta na produção dependente da dose de 2-dDCB, que é especificamente correlacionada com a concentração de lipídios contendo ácido palmítico, uma vez que o ácido palmítico é um precursor do 2-dDCB (OBANA et al., 2005). Resultado esse, compatível com o presente trabalho, com as análises realizadas no Laboratório Aerial/ Illkirch Graffenstaden, França, que teve um aumento na quantidade de 2-ACBs nas amostras e também associado à dose de radiação empregada.

A ingestão diária de 2-ACBs por aves irradiadas foi aproximadamente estimado em 0,5 µg / kg p.c / dia (SOMMERS, 2013). É comparado com o consumo estimado (0,3-0,8 µg /kg de peso corporal / dia para a população em geral) de acrilamida, encontrada em café, alimentos ricos em carboidratos, considerado cancerígeno para o ser humano.

De acordo com a literatura, poucos estudos *in vivo* foram realizados para avaliar a genotoxicidade de 2-ACBs.

HORVATOVICH et al. (2002) relataram que menos de 1% dos 2-ACBs são excretados nas fezes e uma pequena quantidade foi detectada no tecido adiposo.

RAUL et al. (2002), afirmaram a promoção do câncer de cólon, levando a comunidade científica a realizar mais estudos sobre o assunto. Até então, estudos com micronúcleos não haviam sido realizados.

YAMAKAGE et al. (2014) realizaram o teste de micronúcleo da medula óssea e sugeriram a não genotoxicidade de 2-ACBs, correlacionando os resultados desse presente trabalho em células alvo específicas hepáticas que também não apresentaram danos genotóxicos.

O último teste de micronúcleo realizado por SONG et.al. (2018), utiliza concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 mg/ g/ pc e apresentou resultados alinhados com YAMAKAGE et.al. (2014).

O conhecimento sobre as propriedades toxicológicas das 2-ACBs ainda é escasso, a avaliação dos valores de DL50 para os 2-ACBs é necessária porque não existem dados relacionados à toxicidade aguda em relação a esses compostos químicos (SONG, et al., 2018)

Em estudos anteriores foram utilizadas células de medula óssea no ensaio de MNs, enquanto o presente estudo, células extraídas do tecido hepático. Comparado aos presentes resultados há divergência quando se trata da análise de micronúcleos em células específicas submetidas às 2-ACBs sintetizadas, onde encontramos considerável dano genotóxico, comparado ao controle positivo.

O teste de micronúcleo com células hepáticas de ratos produziu resultados positivos com substâncias transformadoras metabólicas complexas, cujos resultados negativos são obtidos nos testes de MNs da medula óssea; os metabólitos produzidos no fígado não atingem a medula óssea. Essa técnica usando fígado de rato remove o problema de especificidade estudando diferentes órgãos-alvo, de acordo com (CLIET, 1989).

Correlacionando com os resultados de estudos *in vitro* de Barbezán et.al, as 2-ACBs podem ser consumidas com relativa segurança sob ponto de vista de possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos, pois não foram encontradas substâncias que causem ambos efeitos nas concentrações testadas por meio do teste de Ames e micronúcleos dos compostos 2- dDCB e 2- tDCB.

No entanto os grupos experimentais que consumiram as 2-ACBs por meio da manteiga de cacau irradiada, não induziram números consideráveis para genotoxicidade, e revelando cortes histológicos com preservação arquitetural hepática, mesmo com a administração de grande quantidade de ácidos graxos

diariamente na dieta, podendo refletir no aparecimento ou aumento de esteatose hepática.

## 6 CONCLUSÃO

Concluimos que o consumo de 2-ACBs por meio dos alimentos irradiados, sendo no presente estudo representado por manteiga de cacau tratada com doses 10, 20 e 30 kGy tem baixo potencial genotóxico em células hepáticas, não sendo suficientes para acarretar danos celulares irreversíveis.

Visto que as análises histológicas do fígado dos animais apresentaram a arquitetura preservada, somente alguns pontos de esteatose hepática dentro da normalidade.

Assim como, verificamos que ensaios com células específicas são mais indicados que o teste de MNs em células de medula óssea para determinados compostos, como os compostos mutagênicos instáveis (como por exemplo anilina, amianto, diclorometano), que podem não ser detectáveis em células de medula óssea.

No ensaio de MNs, a indução de MNs nos grupos que consumiram manteiga de cacau irradiada foi menor que 3%, comparando com o controle positivo, com porcentagem de 25,8%, nos leva a concluir que não foi significativo para genotoxicidade dentro dos modelos e limites de resultados avaliados.

Sendo assim, alimentos ricos em gorduras tratados com radiação são relativamente seguros para consumo em relação à genotoxicidade e mutagenicidade, porém não são recomendadas altas doses no processo de irradiação, por alterações sensoriais e pela alta oxidação lipídica que também são fatores a serem considerados em problemas de saúde como aterosclerose.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY- Disponível em:  
<<https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer.html>> Acesso em: 16  
mai. 2020.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTRYS' SOCIETY. **AOCS Official Method Ce 2-66, Preparation of Methyl Esters and Fatty Acids**. 7 ed., 2017.

ASEP, E. K.; JINAP, S.; TAN, T. J.; RUSSLY, A. R.; HARCHARAN, S.; NAZIMAH, S. A. H. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on super critical fluid extraction of cocoa butter. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 450–458, 2008

BAFFY, G.; BRUNT, E. M.; CALDWELL, S. H. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 1384-1391. 2012

BARBEZAN, A. B. **Estudos in vitro da genotoxicidade e toxicidade em células hepáticas da formação de 2-Alcilociclobutanonas resultantes da irradiação de alimentos que contenham gordura**. 2017. 132 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-07122017-104438/pt-br.php>> Acesso em: 13 jan. 2020

BASHIR, K.; JAN, K.; KAMBLE, D. B.; MAURYA, V. K.; JAN, S.; SWER, T. L. History, status and regulatory aspects of Gamma Irradiation for food processing. **Reference module in food science**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23051-5>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

BELLIARDO, J. J. Methods for the detection of food stuffs treated by irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 42, n. 1-3, p. 377-382, 1993

BONASSI, S.; FENECH, M.; LANDO, C.; LIN, Y.; CEPPI, M.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BAROLE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; JIA, C.; DI GIORGIO, M.; FERGUON, L. R.; FUCIC, A.; LIMA, O. G.; HRELIA, L.; MIKHALEVICH, L.; MIRKOVA, E.; MOSESSO, P.; MULLER, W.; ODAGIRI, Y.; SCARFI, M. R.; SZABOVA, E.; VOROBTSOVA, I.; VRAL, A.; ZIJNO, A. Human Micronucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block Micronucleus Assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, v. 37 p. 31- 45, 2001

BRACCO, U. Effect of triglyceride structure on fat absorption. ***The American Journal of Clinical Nutrition***, v. 60, p.1002–1009, 1994

BRASIL. ***Regulamento técnico para irradiação de alimentos. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001***, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/791ccc804a9b6b1b9672d64600696f00/Resolucao\\_RDC\\_n\\_21\\_de\\_26\\_de\\_janeiro\\_de\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/791ccc804a9b6b1b9672d64600696f00/Resolucao_RDC_n_21_de_26_de_janeiro_de_2001.pdf?MOD=AJPERES)> Acesso em: 11 jun. 2014.

BRYCE, S. M.; BEMIS, C. J.; AVLASEVICH, S. L.; DERTINGER, S. D. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. ***Mutation Research***, v. 630, n. 1-2, p. 78-91, 2007

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E., CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs.) ***Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde***.- Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Instituto Oswaldo Cruz, v. 2, 2010, p. 51- 147.

CAVALCANTE, A. L. M. ***Parâmetros sanguíneos de tilápia (Oreochromis niloticus) no monitoramento ambiental do chumbo***. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, Disponível em: <



<https://www.arca.fiocruz.br/xmlui/handle/icict/2445?show=full>> Acesso em: 15 mar. 2016.

CERDA, H., B.; HOFSTEN, V.; JOHANSON, K. J. Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. In: LEONARDI, M.; RAFFI, J. J. (Ed.) **Recent advances on detection of irradiated food**. Italy/Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993. p. 401-405

CHAN, W.; YE, Y.; LEUNG, E. M. K. Rapid identification of  $\gamma$ -irradiated food by direct solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of 2-Dodecylcyclobutanone: Application in surveillance of irradiated food. **Food chemistry**, v. 161, p. 312-316, 2014

CHINTHALAPALLY, V. R. Do Irradiated Foods Cause or Promote Colon Cancer? **Nutrition and Cancer**, v. 46, n. 2, p. 107-109, 2003.

CLIET, I.; FOURNIER, E.; MELCION, C.; CORDIER, A., *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes. **Mutation Research**, v. 216, p. 321-326, 1989

CODEX ALIMENTARIUS. General standard for irradiated food - Codex Stan-106-1983. Revisão 1-2003. Disponível em: <[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B106-1983%252FCXS\\_106e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B106-1983%252FCXS_106e.pdf)> Acesso em: 20 fev. 2016.

CRONE, A. V. J.; HAMILTON, J. T. G.; STEVENSON, M. Effect of storage and cooking on the dose response of 2-dodecylcyclobutanone, a potential marker for irradiated chicken. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 58, n. 2, p. 249-252, 1992

DELINCEÉ, H. Control of irradiated food: Recent developments in analytical detection methods. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 42, n. 1-3, p. 351-357, 1993

DELINCEÉ, H. Rapid and simple screening tests to detect the radiation treatment of foods. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, n. 4-6, p. 677-680, 1995

DELINCEE, H.; EHLERMANN, D. A. E. Recent advances in the identification of irradiated food. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 34, n. 6, p. 877-890, 1989

DELINCEE, H.; POOL-ZOBEL, B. L. Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 52, p. 39-42, 1998

EDMISON, J.; MCCULLOUGH, A. J. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. ***Clinical Liver Disease***, v.11, p. 75-104, 2007

EHLERMANN, D. A. E. The early history of food irradiation. ***Radiation Physics and Chemistry***, v.129, p.10-12, 2016.

EUROPEAN COMMISSION - ***Statement of the scientific committee on food: a report on 2- Alkylcyclobutanones. European commission, Health & consumer protection.*** Brussels, Belgium. 2002. Disponível em:<  
[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scf\\_out135\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out135_en.pdf)>  
Acesso em: 22 set. 2016.

FARKAS, C. M. Special solutions for the immunocompromised. ***Radiation Physics and Chemistry***, v.129, p. 58-60, 2016

FDA - U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. ***Guidance of industry and other stake holders' toxicological principles for the safety assessment of food ingredients.*** Redbook 2000. U.S. Department of health and human services, revised 2007. Disponível em:< <https://www.fda.gov/media/79074/download>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

FELICIANO, P. C. High-dose irradiated food: Current progress, applications, and prospects. ***Radiation Physics and chemistry***, v.144, p.34- 36. 2018.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. ***Revista Saúde e Pesquisa***, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FURUTA, M.; HAYASHI, T.; KAKEFUB, T.; NISHIHAR, H. Public status toward radiation and irradiated potatoes at "Youngster's Science Festival" in several cities including Tokyo, Osaka, and Hiroshima, Japan. ***Radiation Physics and Chemistry***, v. 57, p. 325-328, 2000

GADGIL, P.; HACHMEISTER, K.; SMITH, J. S.; KROPF, D. H. 2-alkylcyclobutanones as irradiation dose indicators in irradiated ground beef Patties. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 50, p. 5746-5750, 2002

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. ***Tratado de histologia***. 3. ed. Amsterdã: Elsevier, 1999.

GIDDINGS, G. G.; MARCOTTE, M. Poultry irradiation for hygiene/safety and market-life enhancement. ***Food Reviews International***, v. 7, n. 3., p. 258-282, 1991

GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: Epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. ***Revista da associação médica Brasileira***, v. 59 p. 514-524, 2013

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. ***The Lipid Handbook***. 3 ed., Boca Raton: CRC Press, 2007

HAYASHI, T. ***Comparative effectiveness of gamma-rays and electron beams in food irradiation***. In: THORNE, S. (Ed.) Elsevier Applied Science: United Kingdom, 1991. p. 169-206.

HEIDE, L.; BOGL, K. W. The identification of irradiated spices with thermo and chemiluminescence measurements. ***International Journal of Food Science + Technology***, v. 22, n. 2, p. 93-103, 1987

HIJAZ, F.; SHRESTHA, T. B.; BOSSMAN, S. H.; HUSSAIN, F.; SMITH, J. S. *In vitro* and *in vivo* metabolism of the radiolytic compound 2-dodecylcyclobutanone. ***Journal of Food Science***. v. 75, p. 72– 80. 2010

HORVATOVICH, P.; RAUL, F.; MIESCH, M.; BURNOU, F. D.; DELINCÉE, H.; HARTWIG, A.; WERNER, D.; MARCHIONI, E. Detection of 2-alkylcyclobutanones, markers for irradiated foods, in adipose tissues of animals fed with these substances. ***Journal of Food Protection***, v. 65, p. 1610–1613, 2002

FELICIANO, P. C. High-dose irradiated food: Current progress, applications, and prospects. ***Radiation Physics and chemistry***, v.144, p.34- 36. 2018.

IAEA - International Atomic Energy Agency. **Manual of good practice in food irradiation: sanitary, phytosanitary and other applications**. International Atomic Energy Agency, n. 481, p. 9. Vienna, 2015.

ISEO - Institute of shortening and edible oils. **Food fat and oils. 10 ed.** Washington: Institute of shortening and edible oils, Inc., 2 ed., 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KOOIJ, J. V.; LEVELING, H; SCHUBERT, J. Food preservation by Irradiation. **IAEA Bulletin**, v. 23, n. 3, p.33-36, 1981

LETELLIER, L. H.; NAWAR, W. W. 2-Alkylcyclobutanones from the radiolysis of triglycerides. **Lipids**, v. 7, p. 75–76, 1972.

LEVY, D. S.; SORDI, G. M. A. A.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Construindo pontes entre ciência e sociedade: divulgação científica sobre irradiação de alimentos. **Brazilian journal of radiation sciences**. v. 6-01, p. 1-13, 2018.

LI, A.; GANGPAN, L.; TONGZHANG, X.; XINJIN, X.; ZAOMA, H. Rapid determination method for 2-DCB in irradiated pork by ASE–Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–GC–MS. **Radiation Physics and Chemistry**, v.130, p. 277–281, 2017.

LOAHARANU, P. Legislative and administrative control of processing of and trade in irradiated foods. In: EHIERMANN, D. A. E.; SPIESS, W. E. L.; WOLF, W. (Ed.), **Colloquium on food irradiation**. Karlsruhe, p. 105-111, 1992.

MAHESH, K.; VIJ, D. R. **Techniques of Radiation Dosimetry**. New Delhi: Wiley Eastern, 1985

MANUAL DE CUIDADOS E PROCEDIMENTOS COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO DO BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP. Disponível

em:< <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>>  
Acesso em: 20 mai. 2015.

MANUAL DE UTILIZAÇÃO DO BIOTÉRIO IPEN/CNEN - Disponível em:<  
<http://www.ipen.br/sitio/index.php?idc=345>>\_Acesso em: 15 out. 2014.

MARTINS, M. N.; SILVA, T. F. Electron accelerators: History, applications and perspectives. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 95, p. 78-85, 2014

MCMURRAY, C. H.; STEWART, E. M., GRAY, R.; PEARCE, J. *Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996

MOREHOUSE, K. M. Food irradiation- US regulatory considerations. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 63 p. 281- 284, 2002

NAIR, P. K. P. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World*. Elsevier: London, 2010, p. 131–180.

NARUMI, K.; ASHIZAWA, K.; TAKASHIMA, R.; TAKASAWA, H.; KATAYAMA, S.; TSUZUKI, Y.; TATEMOTO, H.; MORITA, T.; HAYASHI, M.; HAMADA, S. Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats: an investigation of diethylnitrosamine and 2,4-diaminotoluene. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. v.747, p. 234-239. 2012

NDIAYE, B.; JAMET, G.; MIESCH, M.; HASSELMANN, C.; MARCHIONI, E. 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 55, p. 437-445, 1999

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, v. 37, p. 1202-1219, 2003.

OBANA, H.; FURUTA, M.; TANAKA, Y. Analysis of 2-Alkylcyclobutanones with Accelerated Solvent Extraction To Detect Irradiated Meat and Fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6603-6608, 2005

OECD - THE ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPED. **N. 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. Disponível em: <<https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm>> Acesso em: 20 mar. 2015.

ONG, J. P.; YOUNOSSI, Z. M. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2007

OWEN, L. C.; HUBSCHER, S. G. Histological assessment of the liver. **Medicine**, v. 47, p. 707-712, 2019

PERES, W. A. F.; COELHO, J. M.; DE PAULA, T. P. **Nutrição e fisiologia das doenças hepáticas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2015.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Wholesomeness and safety aspects of irradiated foods. **Food chemistry**, v. 285, p. 363- 368, 2019.

RAUL, F.; GOSSÉ, F.; DELINCÉE, H.; HARTWIG, A.; MARCHIONI, E.; MIESCH, M.; WERNER, D.; BURNOUF, D. Food-Borne radiolytic compounds (2-alkylcyclobutanones) may promote experimental colon carcinogenesis. **Nutrition and cancer**, v. 44, n. 2, p. 188–191, 2002.

SATIN, M. **Food Irradiation: A Guidebook**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003.

SHUKLA, V. K. S. Cocoa butter, cocoa butter equivalents, and cocoa butter substitutes. In: AKOH, C. C. (Ed.) **Handbook of Functional Lipids**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006, p. 279-307

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA Disponível em: <  
<https://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>> Acesso em: 20 abr. 2020.

SOMMERS, C.H. Recent Advances in Food Irradiation: Mutagenicity Testing of 2-Dodecylcyclobutanone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6367-6370, 2003.

SONCIN, S.; PANSERI, S.; RUSCONI, M.; MARIANI, M.; CHIESA, L. M.; BIONDI, P. A. Improved determination of 2-dodecylcyclobutanone in irradiated ground beef patties by gas-chromatography–mass-spectrometry (GC/MS) coupled with solid-phase microextraction (SPME) technique. *Food Chemistry*, v. 134, p. 440–444, 2012

SONG, B. S.; KIM, Y.; JIN, Y. B; KANG, I. J.; KIM, K. S.; PARK, J. K.; KIM, J. K.; PARK, H. Y.; JEONG, S. H. Toxicological evaluation of 2-Dodecylcyclobutanone, a unic radiolitic compound of palmitic acid. *Food and Chemical Toxicology*, v. 121, p. 639-647, 2018

STEVENS, A.; LOWE, J. *Histologia*. 1. ed. São Paulo: Manole,1995.

STEVENSON, M. H. Validation of the cyclobutanone protocol for detection of irradiated lipid containing foods by interlaboratory trial. In: MCMURRAY, C. H.; STEWART, E. M.; GRAY, R.; PEARCE J. (Ed) *Detection Methods for Irradiated Foods – Current Status*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996, p. 269–284.

STEVENSON, M. H.; CRONE, A. V. J.; HAMILTON, J. T. G.; MCMURRAY, C. H. The use of 2-dodecylcyclobutanone for the identification of Irradiated chicken meat and eggs. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 42, n. 1-3, p. 363-366, 1993

STEVENSON, M. H; STEWART, E. M. Identification of irradiation food; a current status. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 46, n. 4-6, p. 653-658, 1995

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análises de lâminas histológicas. *Caderno La Salle XI*, Canoas, v. 2, n. 1, p. 231- 239, 2005

VARIYAR, P. S.; CHATTERJEE, S.; SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S., SHARMA, A. Natural existence of 2-alkylcyclobutanones. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. v. 56, p. 11817–11823, 2008

WANG, W; MALEKY, F. Effects of cocoa butter triacylglycerides and minor compounds on oil migration. ***Food Research International***, v. 106, p. 213-224, 2018

WILLIAMS, S. K; MACKENNY, S; JARREL, B. E. Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion. ***Cell transplantation***. v.4 p. 281-289, 1995

YAMAKAGE, K; SUIA, H. Genotoxic potential and *in vitro* tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids. ***Mutation Research***, v. 770, p. 95-104, 2014

YUELIANG, Z.; YIMING, H.; JIACHANG, Y.; FENG, W. Development of a novel biosensor based on F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase for the detection of 2-dodecylcyclobutanone in irradiated beef. ***Food Chemistry***, v.188, p. 320-324, 2015

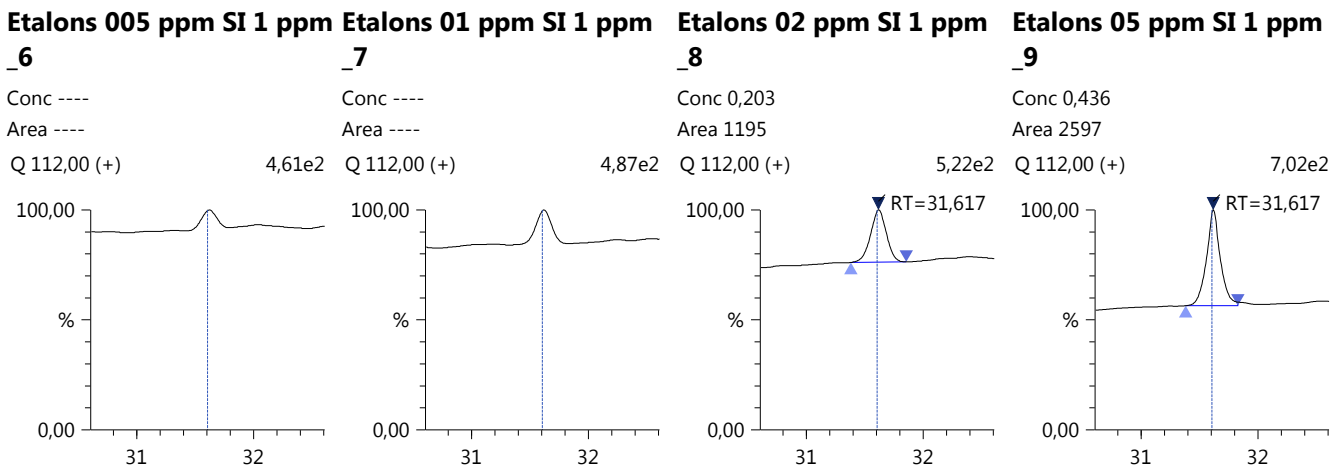
ZARRINGHALAMI, S; SAHARI, M. A; BARZEGAR, M; HAMIDI-ESFEHANIE, Z. Enzymatically modified tea seed oil as cocoa butter replacer in dark chocolate. ***Int. Journal of Food Science and Technologies***, v. 45, p. 540-545, 2010



Batch File: D:\191017\191017 - process beurre de cacao ion 112.qgb  
 Method File: D:\191017\PR\_2ACB\_DB624\_SIM-scan\_new-191017 ion 112.qgm  
 Project File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet ion 112.damlp  
 Flags File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet ion 112.damlp

ID3: 2-tetradecylcyclobutanone

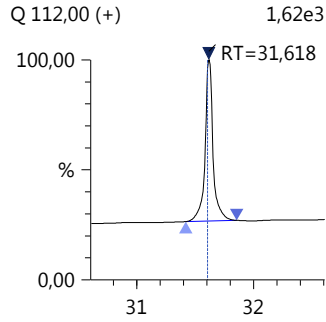
Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
Etalons 005 ppm SI 1 ppm_6	----	----	----	----
Etalons 01 ppm SI 1 ppm_7	----	----	----	----
Etalons 02 ppm SI 1 ppm_8	0,203	1195	18,81	31,617
Etalons 05 ppm SI 1 ppm_9	0,436	2597	54,22	31,617
Etalons 1 ppm SI 1 ppm_10	0,951	5796	209,63	31,618
Etalons 2 ppm SI 1 ppm_11	2,050	13133	498,66	31,621
Etalons 5 ppm SI 1 ppm_12	4,995	36144	1525,11	31,620
hexane 4_13	----	----	----	----
hexane 5_14	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	----	----	----	----
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	21,149	249340	3530,08	31,615
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	9,584	81748	1918,79	31,614
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	17,829	193506	3306,78	31,613
hexane_9	0,658	3954	89,69	31,617
etalons 1 ppm_10	1,872	11898	410,81	31,619
hexane_11	0,606	3632	48,21	31,618
hexane_12	0,449	2676	37,38	31,621
hexane_1	2,631	17282	498,52	31,576
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	----	----	----	----
CHCH 1 ppm 191029_4	----	----	----	----
Etalons 2 ppm_5	2,267	14657	537,65	31,608
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	29,282	412346	4941,56	31,605
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	21,175	249799	4957,78	31,603
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	40,108	687211	5404,01	31,604
hexane_11	0,487	2902	46,90	31,609
hexane_12	0,305	1802	29,15	31,605
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	23,680	296067	4637,72	31,604
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	43,901	799161	5244,03	31,610
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	27,468	372771	5338,28	31,606
hexane_16	0,921	5604	79,81	31,610
hexane_17	0,717	4325	68,28	31,607
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	----	----	----	----
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----



**Etalons 1 ppm SI 1 ppm  
\_10**

Conc 0,951

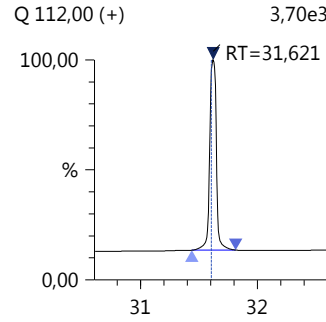
Area 5796



**Etalons 2 ppm SI 1 ppm  
\_11**

Conc 2,050

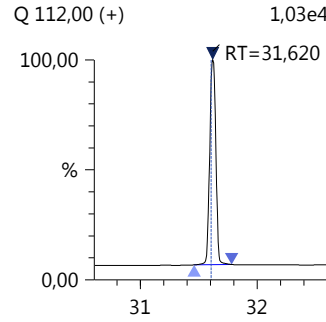
Area 13133



**Etalons 5 ppm SI 1 ppm  
\_12**

Conc 4,995

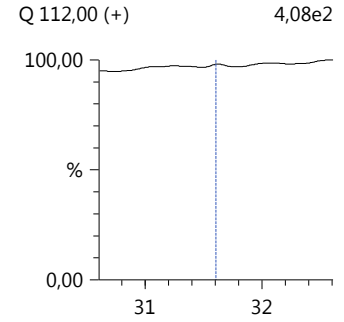
Area 36144



**hexane 4\_13**

Conc ----

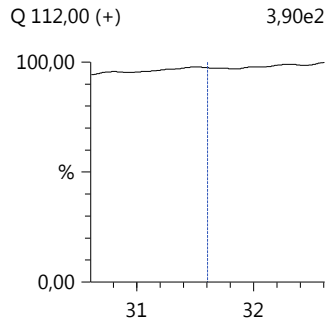
Area ----



**hexane 5\_14**

Conc ----

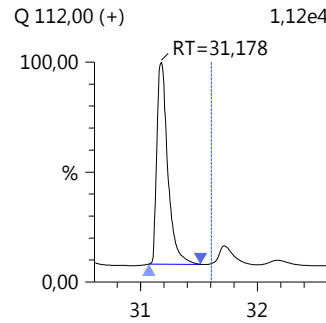
Area ----



**hexane\_1**

Conc ----

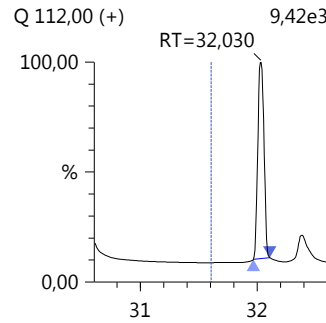
Area ----



**beurre de cacao 0 kGy -  
repet1\_2**

Conc ----

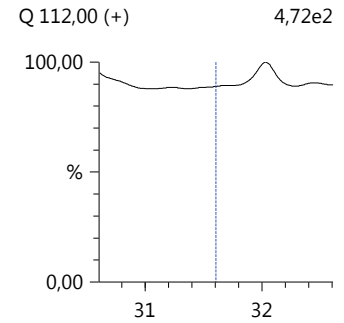
Area ----



**beurre de cacao 0 kGy -  
repet2\_3**

Conc ----

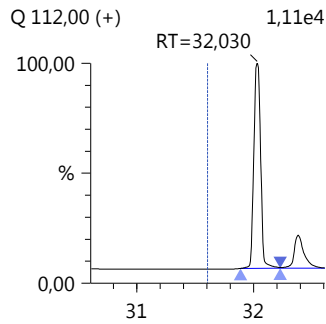
Area ----



**beurre de cacao 0 kGy -  
repet3\_4**

Conc ----

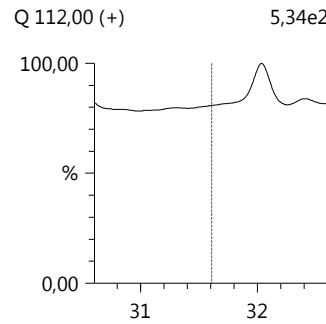
Area ----



**hexane\_5**

Conc ----

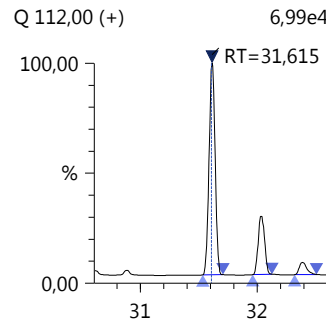
Area ----



**beurre de cacao 10 kGy -  
repet1\_6**

Conc 21,149

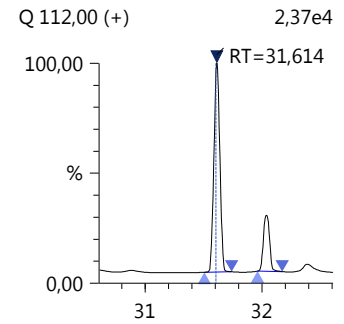
Area 249340



**beurre de cacao 10 kGy -  
repet2\_7**

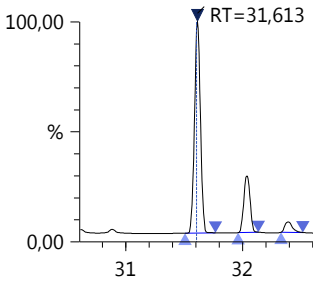
Conc 9,584

Area 81748

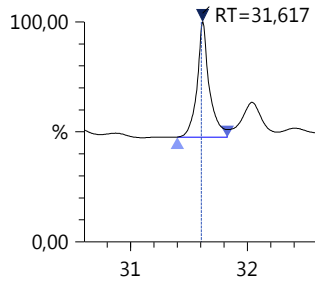


**beurre de cacao 10 kGy - hexane\_9  
repet3\_8**

Conc 17,829  
Area 193506  
Q 112,00 (+) 5,55e4

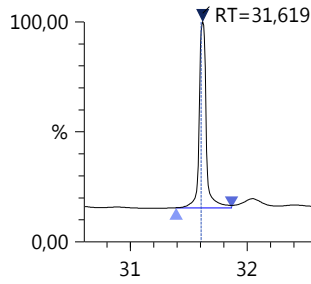


Conc 0,658  
Area 3954  
Q 112,00 (+) 1,01e3



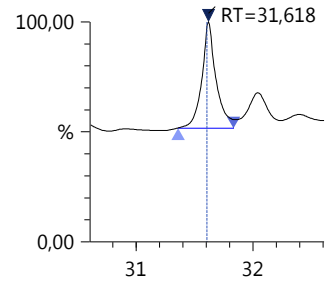
**etalons 1 ppm\_10**

Conc 1,872  
Area 11898  
Q 112,00 (+) 3,26e3



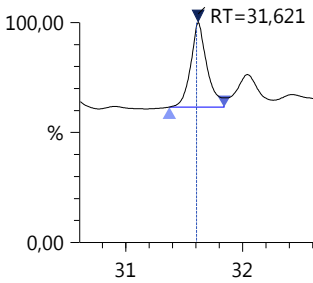
**hexane\_11**

Conc 0,606  
Area 3632  
Q 112,00 (+) 8,63e2



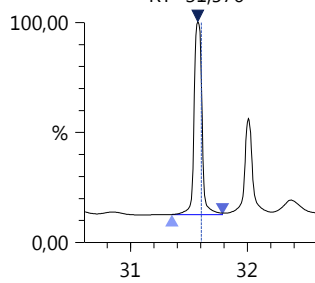
**hexane\_12**

Conc 0,449  
Area 2676  
Q 112,00 (+) 6,94e2



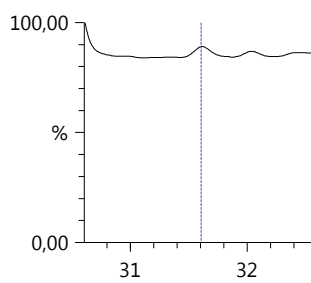
**hexane\_1**

Conc 2,631  
Area 17282  
Q 112,00 (+) 4,12e3



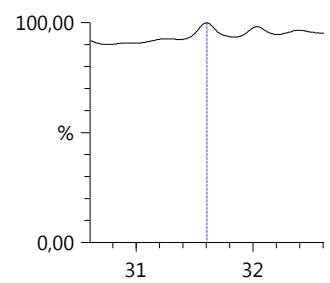
**hexane\_2**

Conc ----  
Area ----  
Q 112,00 (+) 4,89e2



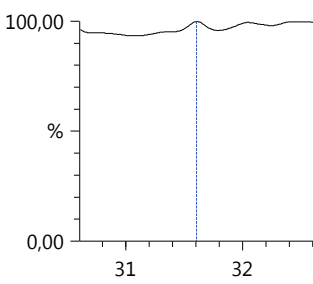
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc ----  
Area ----  
Q 112,00 (+) 4,19e2



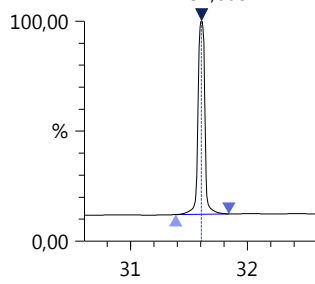
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc ----  
Area ----  
Q 112,00 (+) 3,87e2



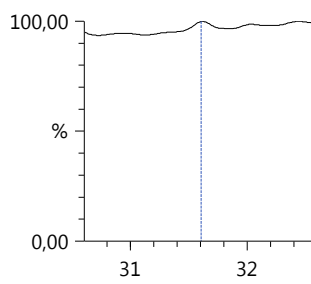
**Etalons 2 ppm\_5**

Conc 2,267  
Area 14657  
Q 112,00 (+) 4,00e3



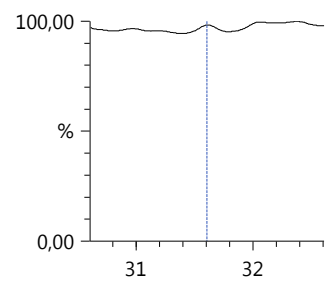
**hexane\_6**

Conc ----  
Area ----  
Q 112,00 (+) 3,70e2



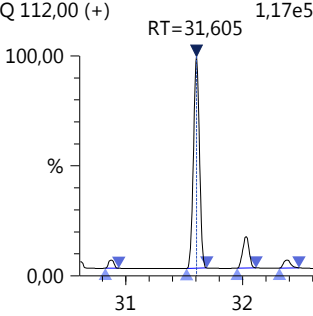
**hexane\_7**

Conc ----  
Area ----  
Q 112,00 (+) 3,84e2



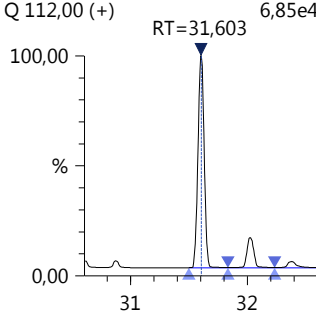
**beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8**

Conc 29,282  
Area 412346  
Q 112,00 (+)



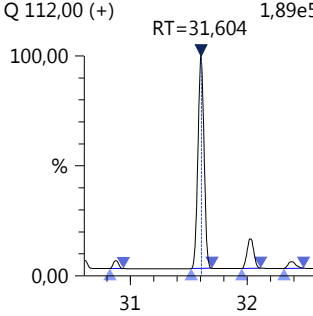
**beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9**

Conc 21,175  
Area 249799  
Q 112,00 (+)



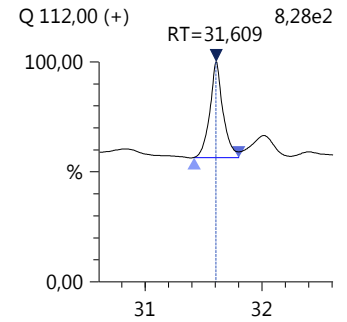
**beurre de cacao 20 kGy - repet3\_10**

Conc 40,108  
Area 687211  
Q 112,00 (+)



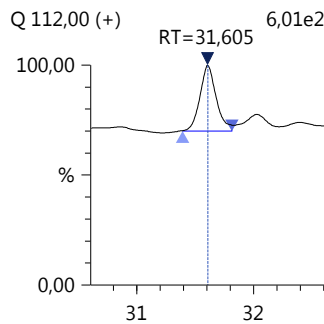
**hexane\_11**

Conc 0,487  
Area 2902



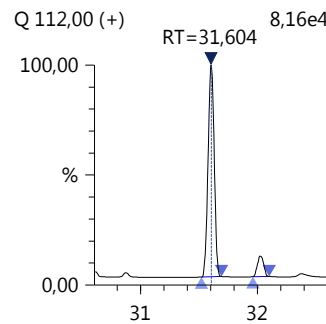
**hexane\_12**

Conc 0,305  
Area 1802



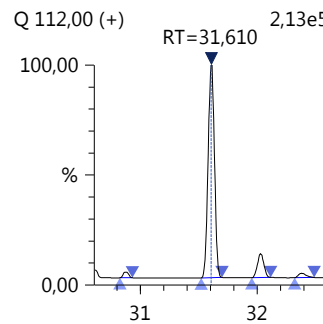
**beurre de cacao 30 kGy - repet1\_13**

Conc 23,680  
Area 296067



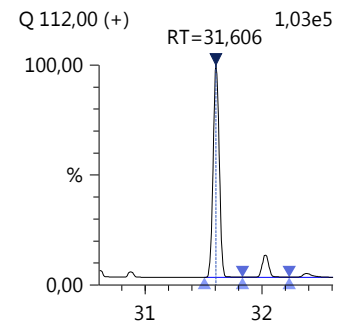
**beurre de cacao 30 kGy - repet2\_14**

Conc 43,901  
Area 799161



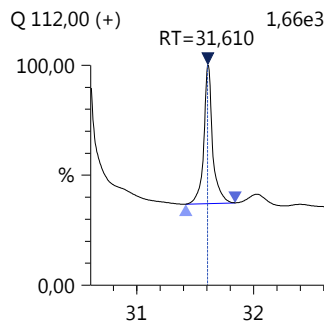
**beurre de cacao 30 kGy - repet3\_15**

Conc 27,468  
Area 372771



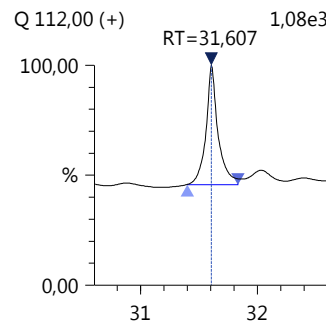
**hexane\_16**

Conc 0,921  
Area 5604



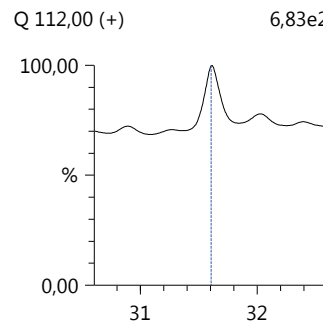
**hexane\_17**

Conc 0,717  
Area 4325



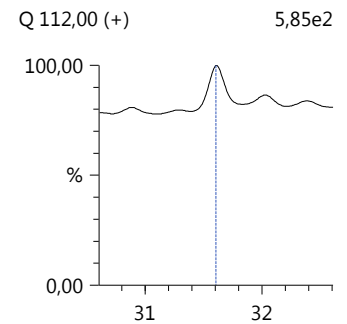
**waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2\_18**

Conc ----  
Area ----



**waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3\_19**

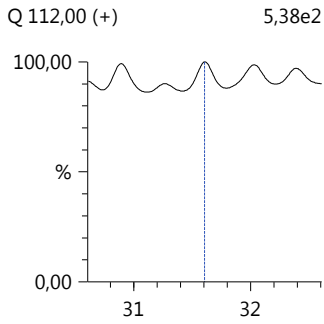
Conc ----  
Area ----



**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet2\_20**

Conc ----

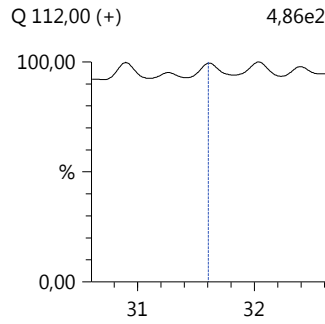
Area ----



**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet3\_21**

Conc ----

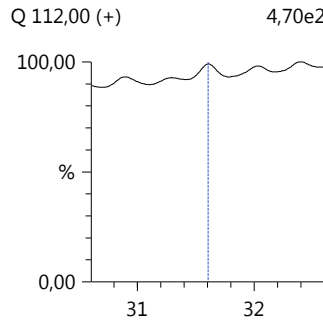
Area ----



**hexane\_22**

Conc ----

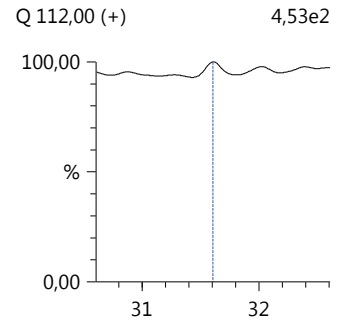
Area ----



**hexane\_23**

Conc ----

Area ----



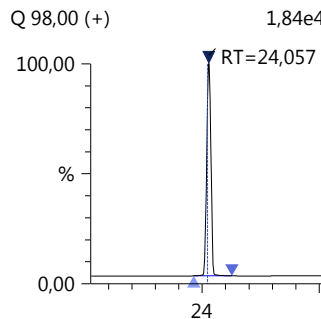
Batch File: D:\191017\191017 - process beurre de cacao.qgb  
 Method File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet.qgm  
 Project File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet.dampl  
 Flags File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet.dampl

ID1: 2-cyclohexylcyclohexanone

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6	1,018	46501	12087,37	24,057
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7	1,116	50996	16064,10	24,056
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8	0,890	40656	31172,36	24,054
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9	1,006	45936	17067,02	24,054
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10	0,948	43319	15804,96	24,054
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11	1,035	47296	24646,48	24,056
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12	0,986	45044	13711,57	24,056
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	1,173	53588	794,60	24,041
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	0,261	11915	749,68	24,047
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	1,362	62207	3382,15	24,040
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	1,885	86092	2305,54	24,043
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	1,004	45868	2366,41	24,046
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	1,493	68176	2453,13	24,046
hexane_9	----	----	----	----
etalons 1 ppm_10	1,340	61199	5236,83	24,049
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	1,626	74272	6154,23	24,043
CHCH 1 ppm 191029_4	0,082	3737	242,51	24,043
Etalons 2 ppm_5	1,110	50707	4682,92	24,043
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	1,609	73518	2396,46	24,039
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	1,792	81842	2466,33	24,042
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	2,521	115153	2332,75	24,039
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	0,978	44664	1983,32	24,040
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	2,338	106783	2464,35	24,041
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	1,647	75226	2065,55	24,043
hexane_16	----	----	----	----
hexane_17	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	0,511	23330	893,16	24,043
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	0,246	11222	602,38	24,042
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	0,378	17268	670,71	24,036
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	0,400	18256	730,08	24,040
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----

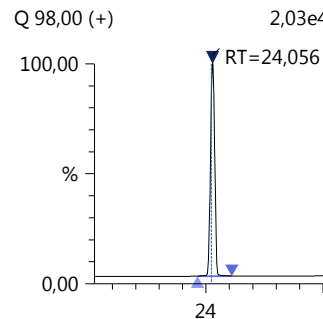
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM\_6

Conc 1,018  
 Area 46501  
 Q 98,00 (+)



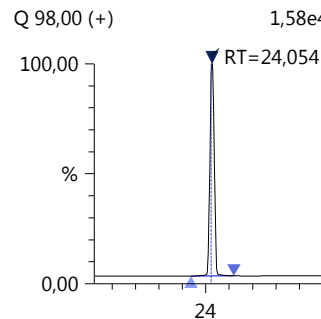
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM\_7

Conc 1,116  
 Area 50996  
 Q 98,00 (+)



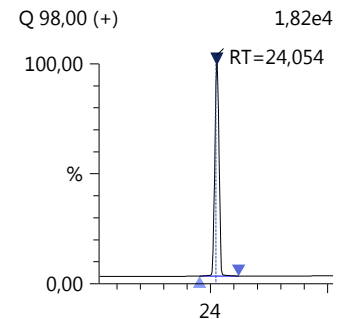
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM\_8

Conc 0,890  
 Area 40656  
 Q 98,00 (+)



ETALONS 05 PPM SI 1 PPM\_9

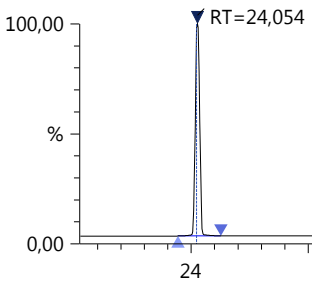
Conc 1,006  
 Area 45936  
 Q 98,00 (+)



ETALONS 1 PPM SI 1 PPM ETALONS 2 PPM SI 1 PPM ETALONS 5 PPM SI 1 PPM hexane\_1

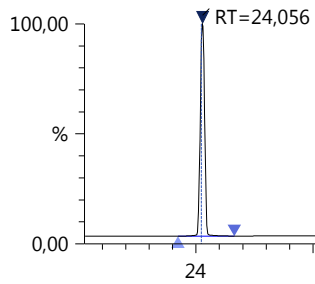
**\_10**

Conc 0,948  
Area 43319  
Q 98,00 (+)



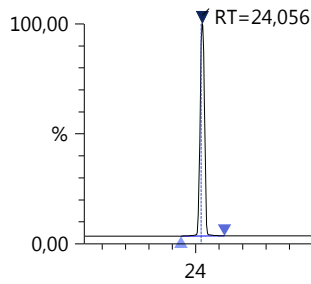
**\_11**

Conc 1,035  
Area 47296  
Q 98,00 (+)

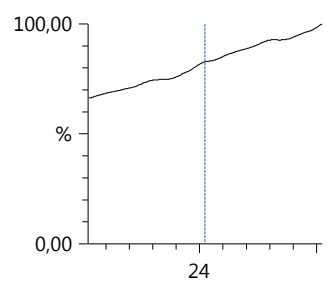


**\_12**

Conc 0,986  
Area 45044  
Q 98,00 (+)

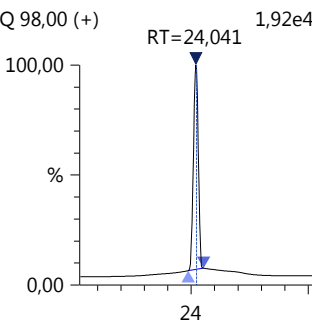


Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+) 3,24e2



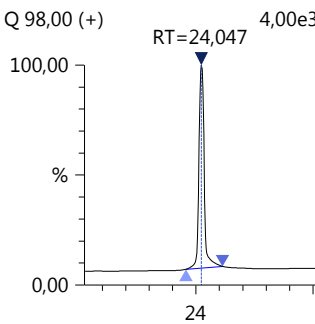
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_2**

Conc 1,173  
Area 53588  
Q 98,00 (+)



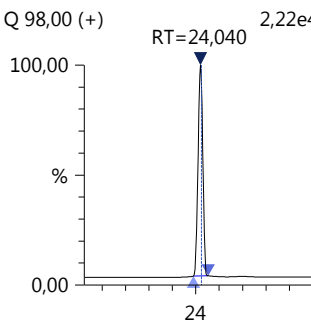
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_3**

Conc 0,261  
Area 11915  
Q 98,00 (+)



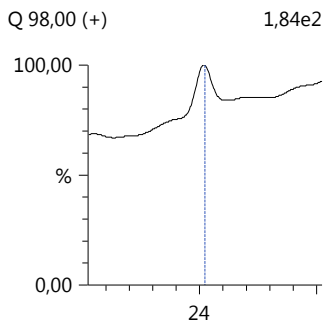
**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_4**

Conc 1,362  
Area 62207  
Q 98,00 (+)



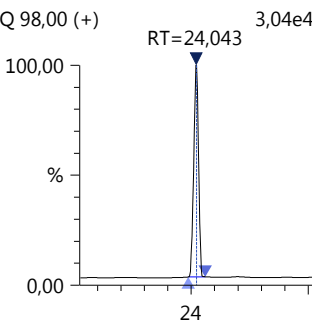
**hexane\_5**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+) 1,84e2



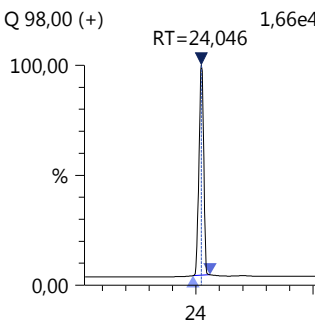
**beurre de cacao 10 kGy - repet1\_6**

Conc 1,885  
Area 86092  
Q 98,00 (+)



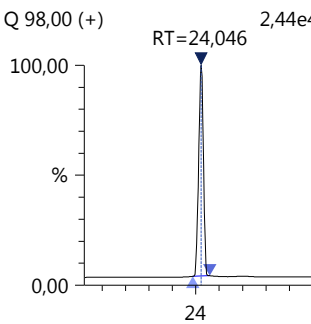
**beurre de cacao 10 kGy - repet2\_7**

Conc 1,004  
Area 45868  
Q 98,00 (+)



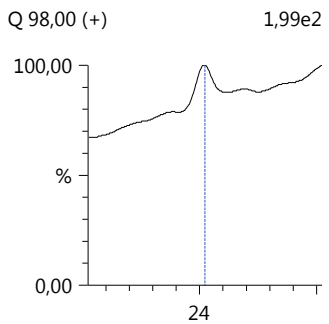
**beurre de cacao 10 kGy - repet3\_8**

Conc 1,493  
Area 68176  
Q 98,00 (+)



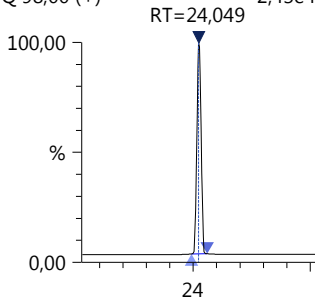
**hexane\_9**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+) 1,99e2



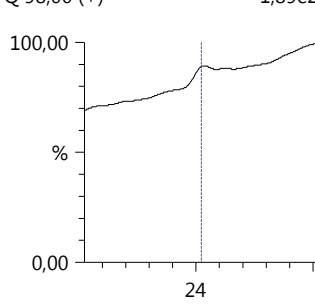
**etalons 1 ppm\_10**

Conc 1,340  
Area 61199  
Q 98,00 (+)



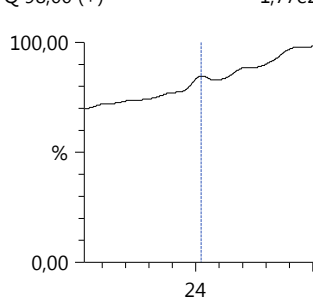
**hexane\_11**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



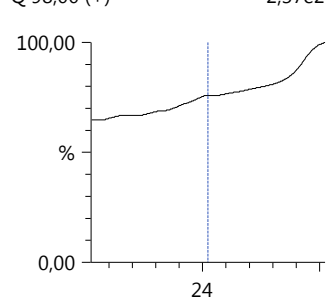
**hexane\_12**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



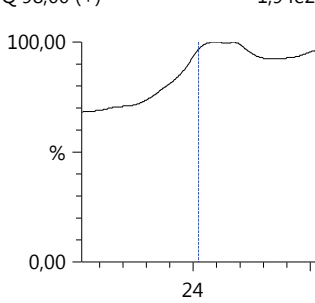
**hexane\_1**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



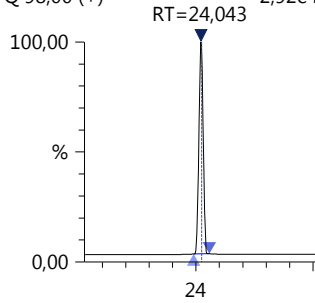
**hexane\_2**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



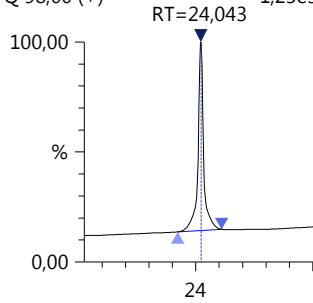
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc 1,626  
Area 74272  
Q 98,00 (+)



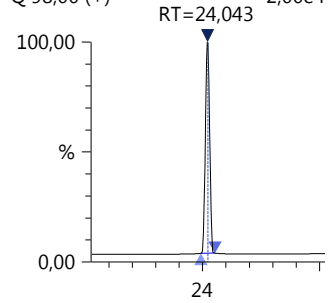
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc 0,082  
Area 3737  
Q 98,00 (+)



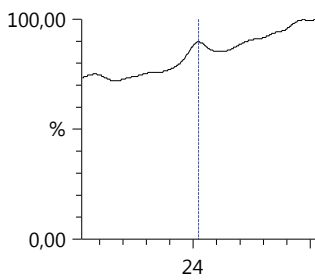
**Etalons 2 ppm\_5**

Conc 1,110  
Area 50707  
Q 98,00 (+)



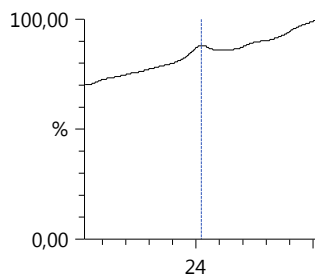
**hexane\_6**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



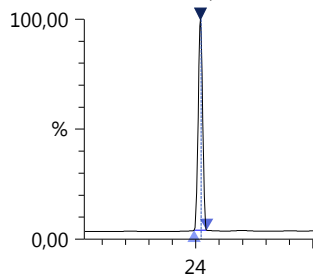
**hexane\_7**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



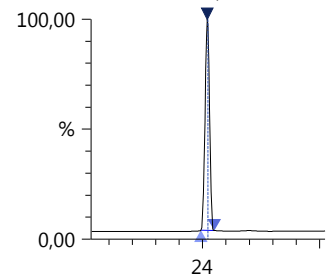
**beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8**

Conc 1,609  
Area 73518  
Q 98,00 (+)



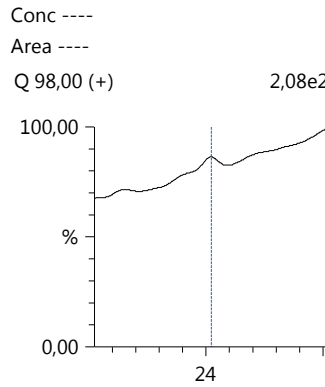
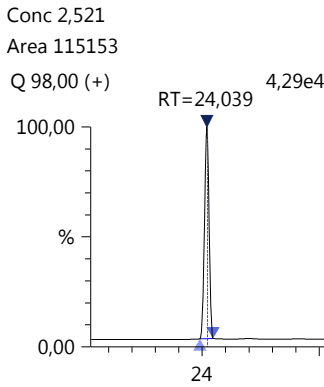
**beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9**

Conc 1,792  
Area 81842  
Q 98,00 (+)

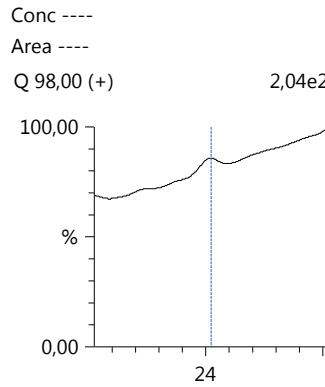




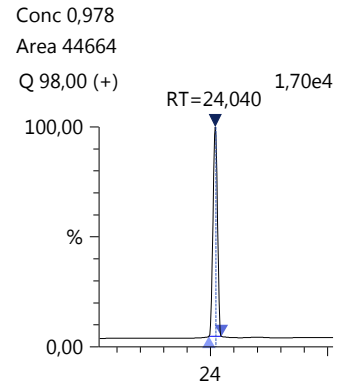
**beurre de cacao 20 kGy - hexane\_11  
repet3\_10**



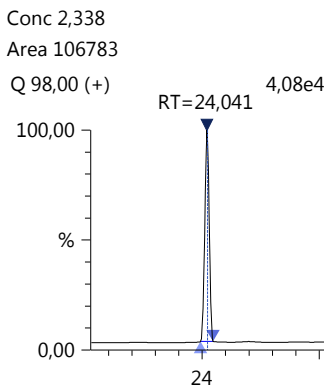
**hexane\_12**



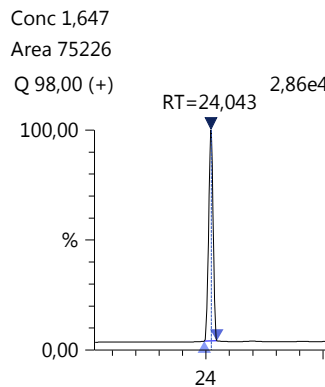
**beurre de cacao 30 kGy -  
repet1\_13**



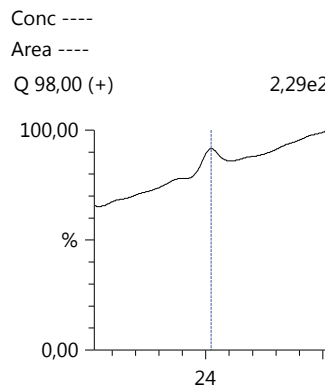
**beurre de cacao 30 kGy -  
repet2\_14**



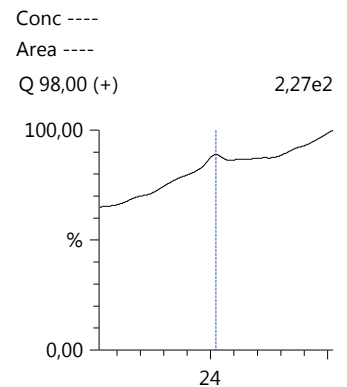
**beurre de cacao 30 kGy -  
repet3\_15**



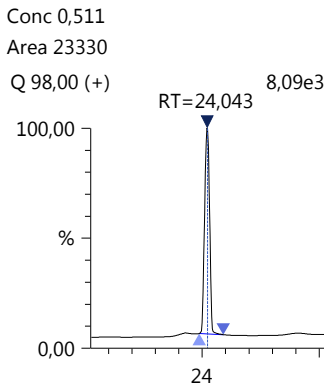
**hexane\_16**



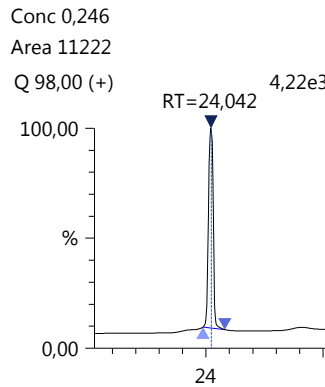
**hexane\_17**



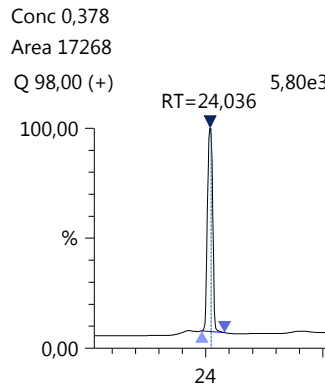
**waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet2\_18**



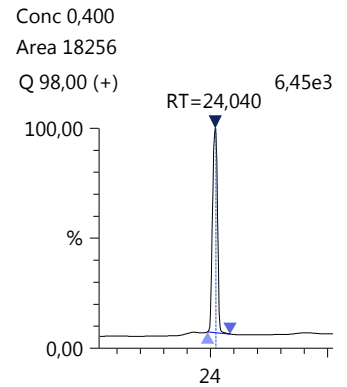
**waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet3\_19**



**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet2\_20**



**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet3\_21**



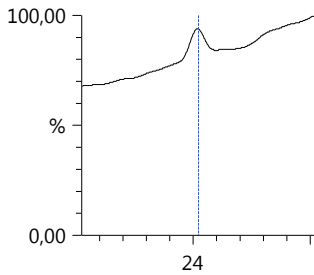
hexane\_22

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

2,07e2



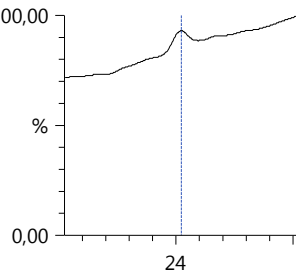
hexane\_23

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

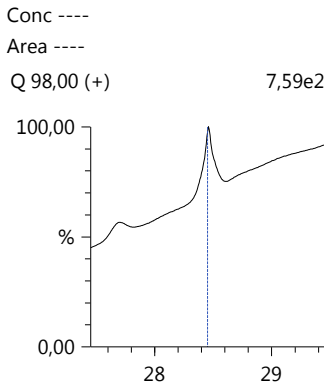
1,99e2



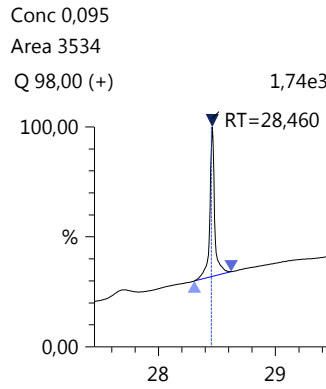
ID2: 2-dodecylcyclobutanone

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7	0,095	3534	65,90	28,460
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8	0,154	5724	191,34	28,458
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9	0,419	15793	560,52	28,458
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10	0,924	35758	1119,39	28,459
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11	2,079	85120	3276,00	28,462
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12	4,993	232724	10119,98	28,462
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	----	----	----	----
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	5,956	288796	574,35	28,454
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	2,615	109799	569,65	28,454
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	4,998	233039	590,07	28,454
hexane_9	0,261	9769	147,01	28,458
etalons 1 ppm_10	1,386	54876	1218,67	28,457
hexane_11	0,096	3562	38,04	28,457
hexane_12	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	----	----	----	----
CHCH 1 ppm 191029_4	----	----	----	----
Etalons 2 ppm_5	2,168	89144	1736,05	28,450
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	8,781	473956	891,07	28,449
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	6,912	347958	946,51	28,447
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	13,184	824457	850,93	28,449
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	7,036	355886	923,24	28,449
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	14,538	947486	911,21	28,450
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	8,698	468075	976,18	28,451
hexane_16	0,060	2227	14,07	28,450
hexane_17	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	----	----	----	----
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----

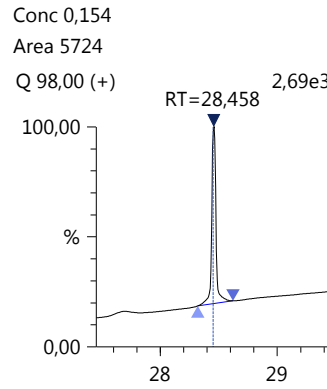
**ETALONS 005 PPM SI 1 PPM\_6**



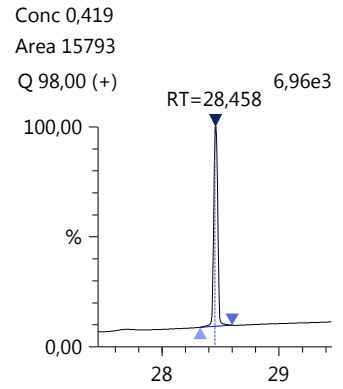
**ETALONS 01 PPM SI 1 PPM\_7**



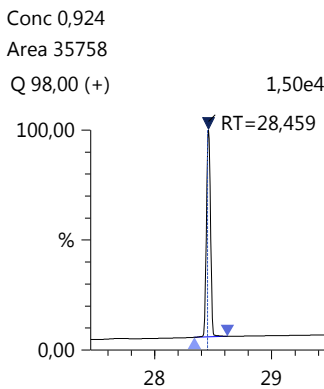
**ETALONS 02 PPM SI 1 PPM\_8**



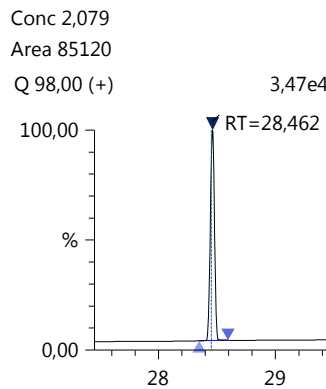
**ETALONS 05 PPM SI 1 PPM\_9**



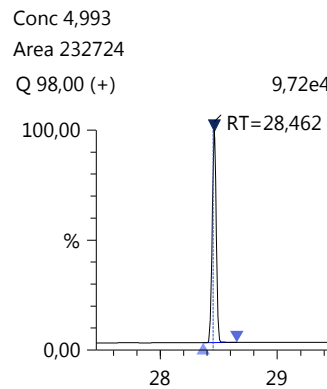
**ETALONS 1 PPM SI 1 PPM\_10**



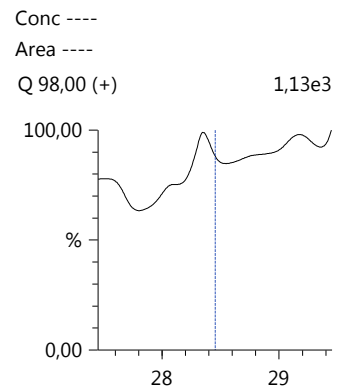
**ETALONS 2 PPM SI 1 PPM\_11**



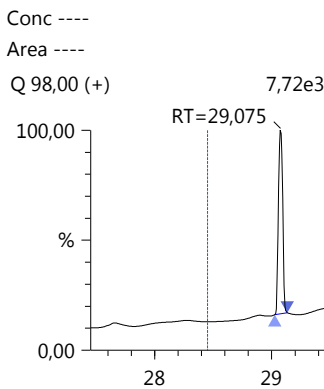
**ETALONS 5 PPM SI 1 PPM\_12**



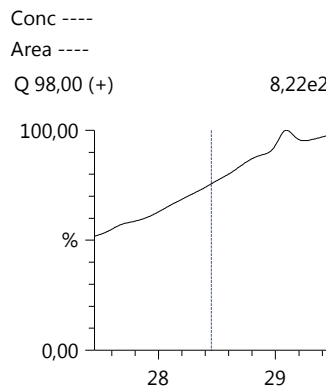
**hexane\_1**



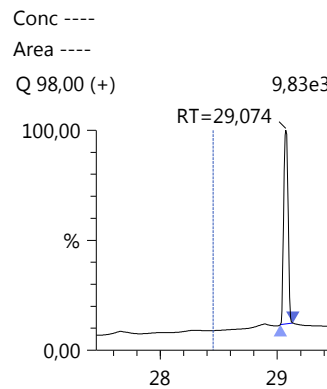
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_2**



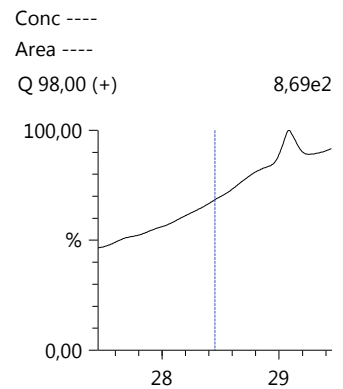
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_3**



**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_4**

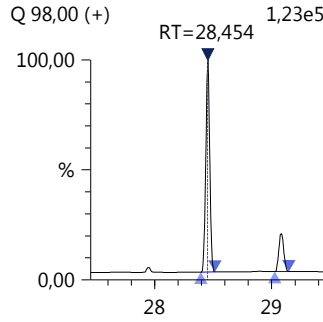


**hexane\_5**



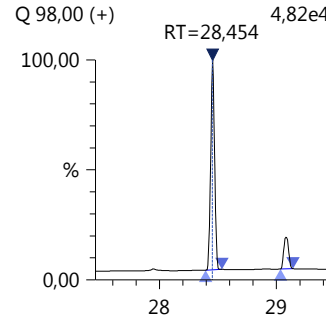
**beurre de cacao 10 kGy - repet1\_6**

Conc 5,956  
Area 288796



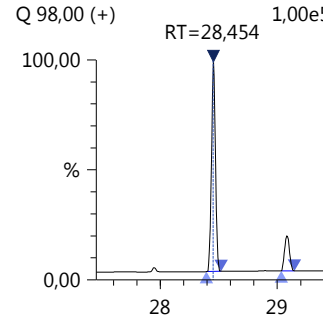
**beurre de cacao 10 kGy - repet2\_7**

Conc 2,615  
Area 109799



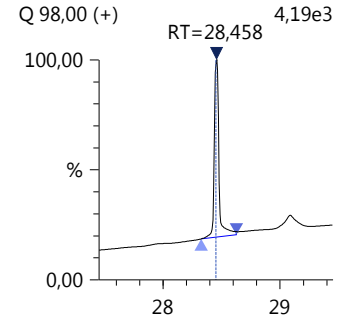
**beurre de cacao 10 kGy - repet3\_8**

Conc 4,998  
Area 233039



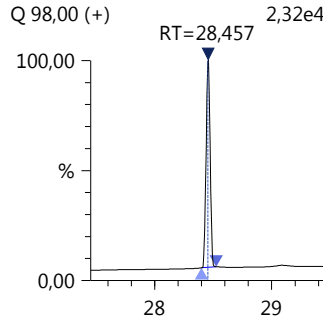
**hexane\_9**

Conc 0,261  
Area 9769



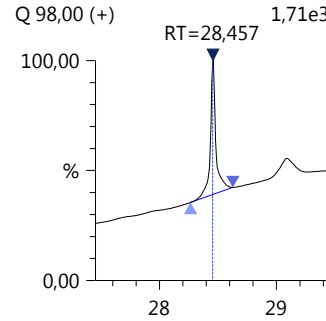
**etalons 1 ppm\_10**

Conc 1,386  
Area 54876



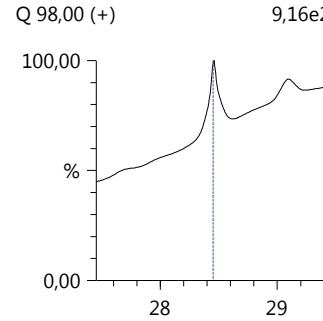
**hexane\_11**

Conc 0,096  
Area 3562



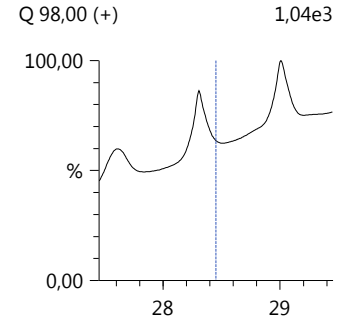
**hexane\_12**

Conc ----  
Area ----



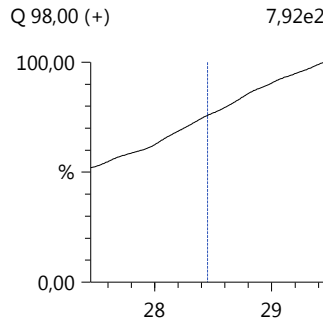
**hexane\_1**

Conc ----  
Area ----



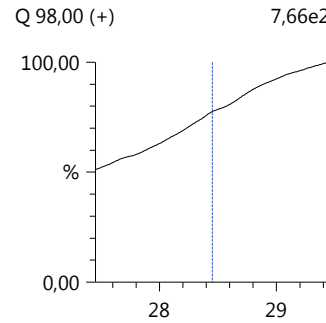
**hexane\_2**

Conc ----  
Area ----



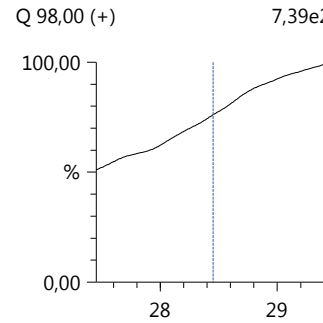
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc ----  
Area ----



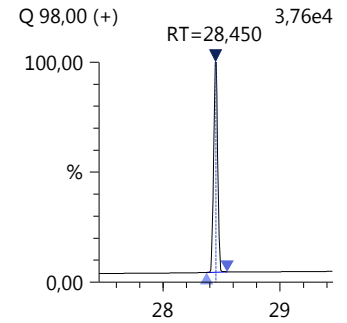
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc ----  
Area ----

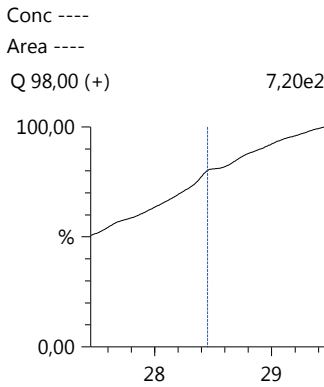


**Etalons 2 ppm\_5**

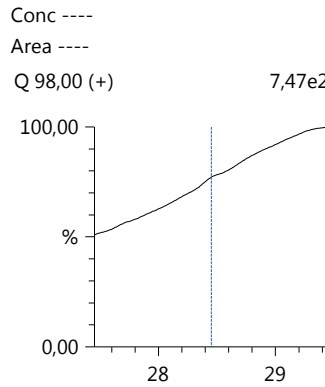
Conc 2,168  
Area 89144



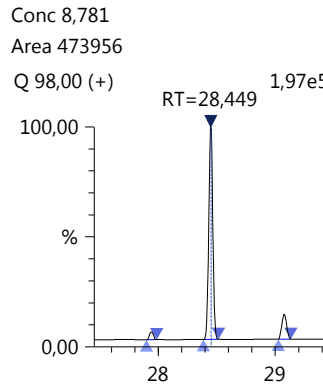
hexane\_6



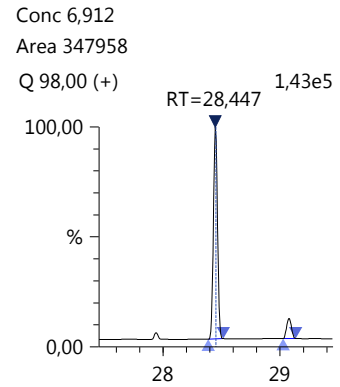
hexane\_7



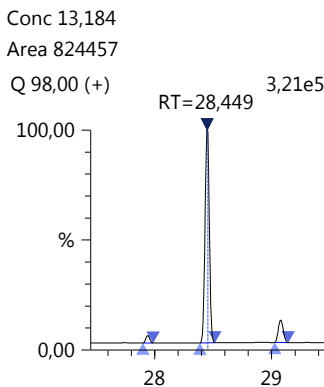
beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8



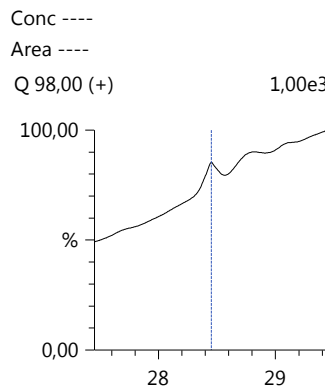
beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9



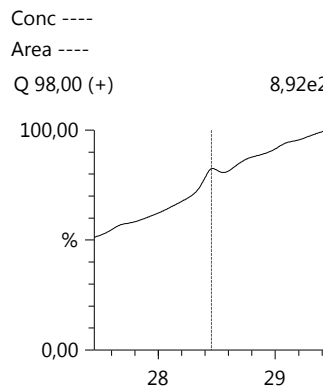
beurre de cacao 20 kGy - repet3\_10



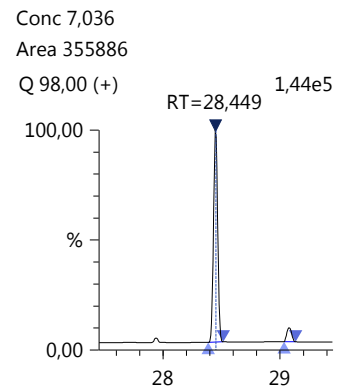
hexane\_11



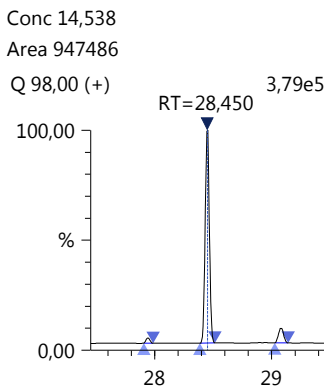
hexane\_12



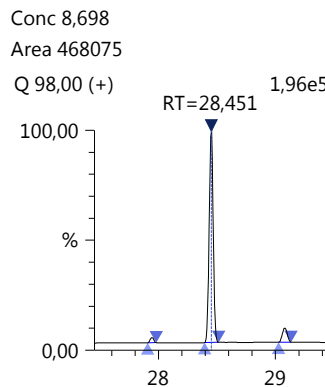
beurre de cacao 30 kGy - repet1\_13



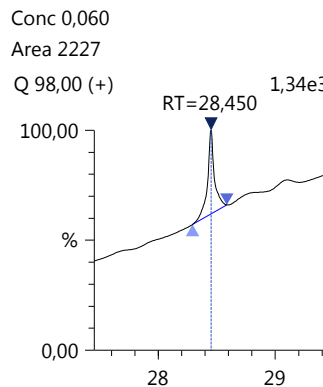
beurre de cacao 30 kGy - repet2\_14



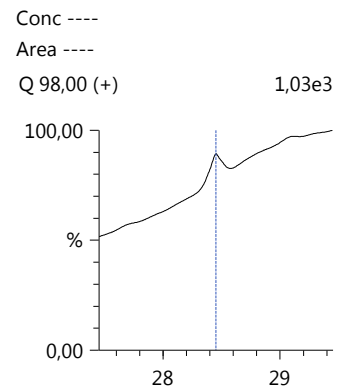
beurre de cacao 30 kGy - repet3\_15



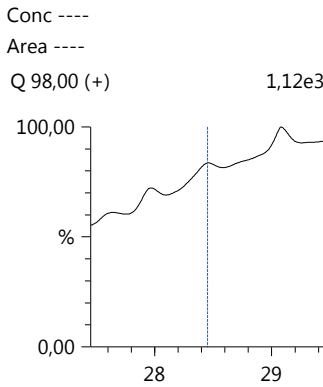
hexane\_16



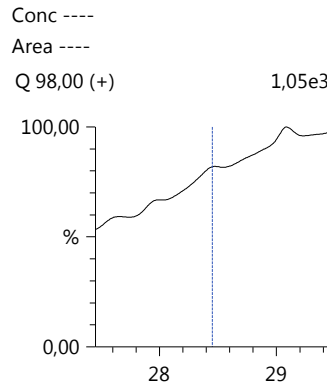
hexane\_17



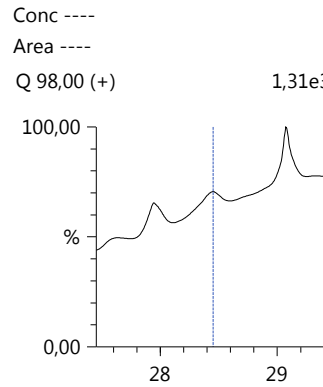
waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet2\_18



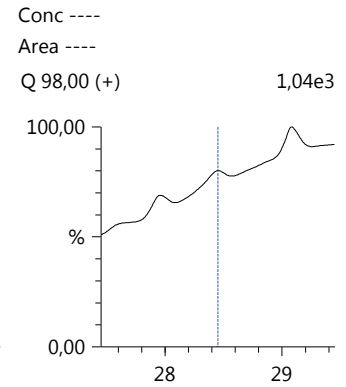
waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet3\_19



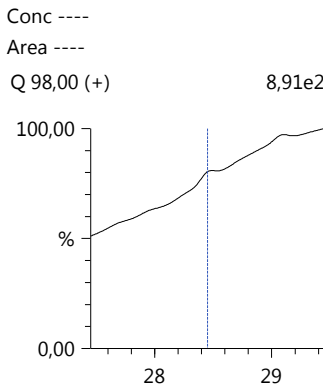
waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet2\_20



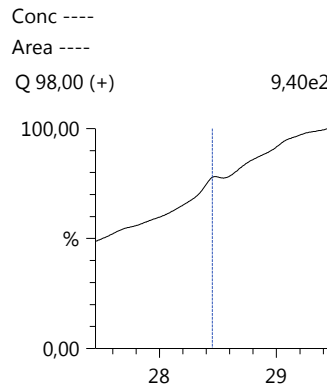
waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet3\_21



hexane\_22



hexane\_23



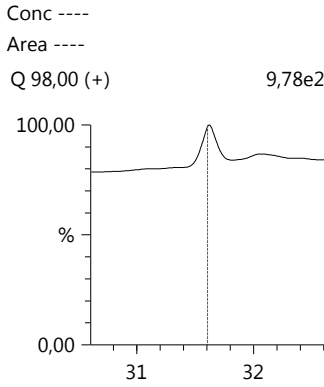
ID3: 2-tetradecylcyclobutanone

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7	0,114	2773	134,61	31,618
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8	0,172	4194	408,69	31,618
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9	0,381	9399	819,67	31,616
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10	0,964	24341	2007,90	31,616
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11	2,065	54515	5232,02	31,620
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12	4,993	146995	23989,74	31,620
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	----	----	----	----
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	21,568	1005383	4100,11	31,614
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	9,712	333376	4052,77	31,613
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	18,093	778253	3995,80	31,612
hexane_9	0,563	13989	392,89	31,616
etalons 1 ppm_10	1,752	45696	1085,60	31,619
hexane_11	0,487	12071	216,95	31,618
hexane_12	0,353	8702	129,22	31,617
hexane_1	2,567	69100	952,19	31,575
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	----	----	----	----
CHCH 1 ppm 191029_4	----	----	----	----
Etalons 2 ppm_5	2,236	59426	1777,24	31,605
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	29,911	1652893	5569,57	31,604
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	21,446	996970	6938,68	31,602
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	41,156	2753900	5716,24	31,603
hexane_11	0,428	10573	157,65	31,608
hexane_12	0,239	5866	104,53	31,604
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	24,155	1190705	6139,50	31,604
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	45,044	3195580	5991,30	31,608
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	27,963	1488818	6580,13	31,605
hexane_16	0,938	23675	308,88	31,610
hexane_17	0,615	15321	296,37	31,605
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	0,244	5978	68,30	31,611
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	0,164	4014	42,31	31,608
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	----	----	----	----

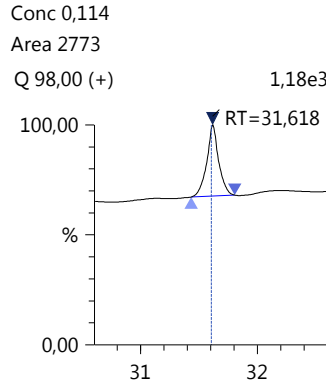
(Table continued from previous page)

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	----	----	----	----
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----

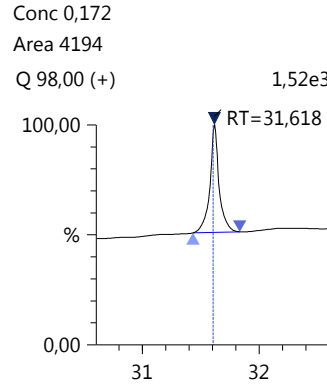
**ETALONS 005 PPM SI 1 PPM\_6**



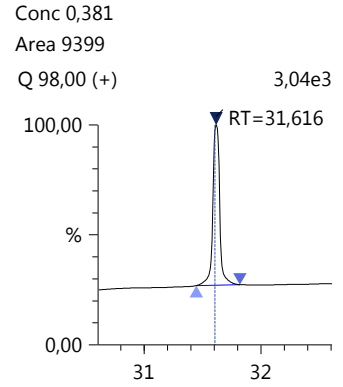
**ETALONS 01 PPM SI 1 PPM\_7**



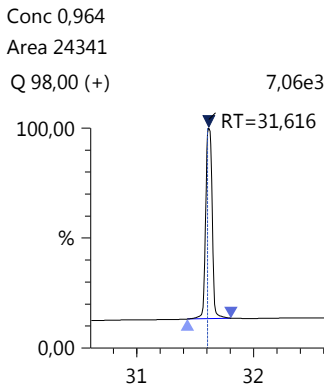
**ETALONS 02 PPM SI 1 PPM\_8**



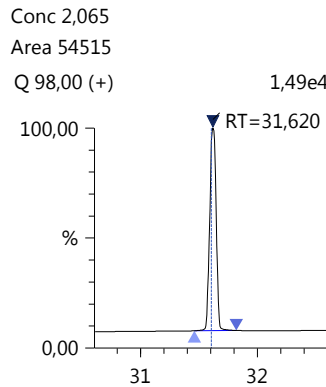
**ETALONS 05 PPM SI 1 PPM\_9**



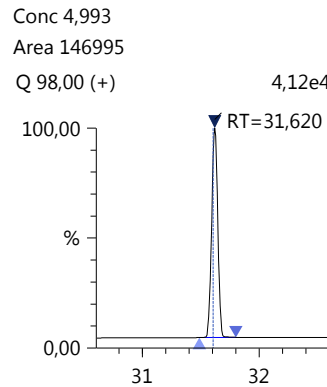
**ETALONS 1 PPM SI 1 PPM\_10**



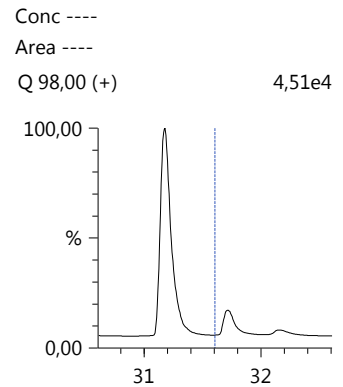
**ETALONS 2 PPM SI 1 PPM\_11**



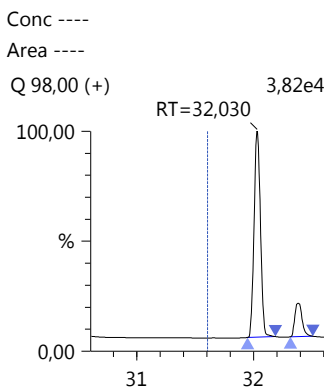
**ETALONS 5 PPM SI 1 PPM\_12**



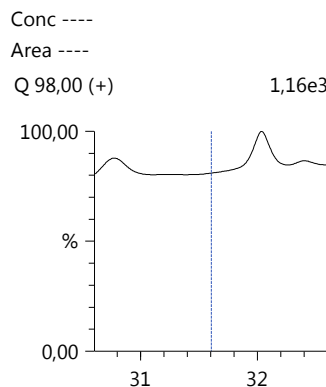
**hexane\_1**



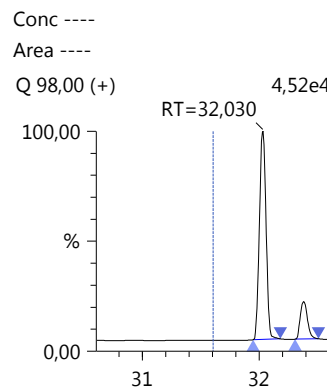
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_2**



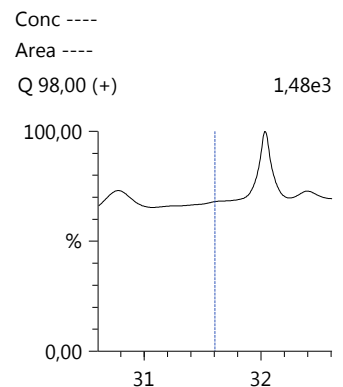
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_3**



**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_4**

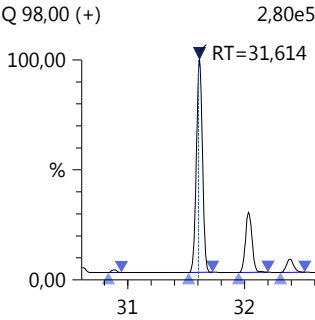


**hexane\_5**



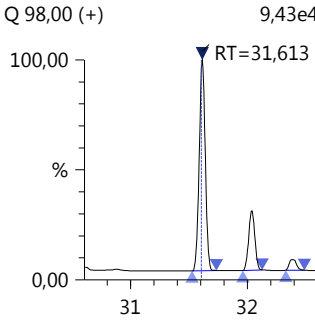
**beurre de cacao 10 kGy - repet1\_6**

Conc 21,568  
Area 1005383  
Q 98,00 (+)



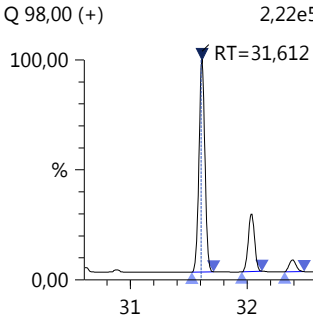
**beurre de cacao 10 kGy - repet2\_7**

Conc 9,712  
Area 333376  
Q 98,00 (+)



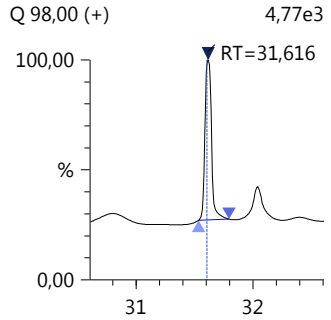
**beurre de cacao 10 kGy - repet3\_8**

Conc 18,093  
Area 778253  
Q 98,00 (+)



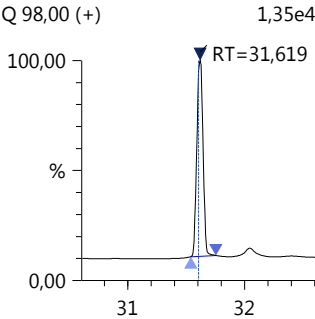
**hexane\_9**

Conc 0,563  
Area 13989  
Q 98,00 (+)



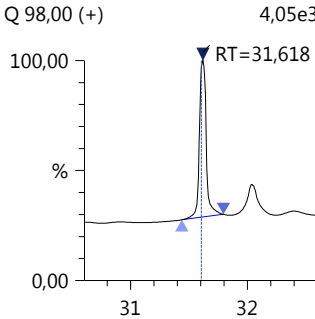
**etalons 1 ppm\_10**

Conc 1,752  
Area 45696  
Q 98,00 (+)



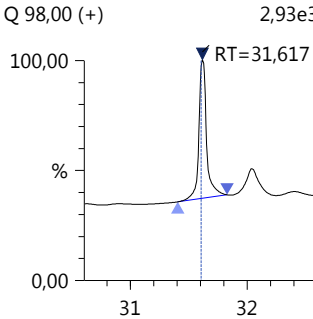
**hexane\_11**

Conc 0,487  
Area 12071  
Q 98,00 (+)



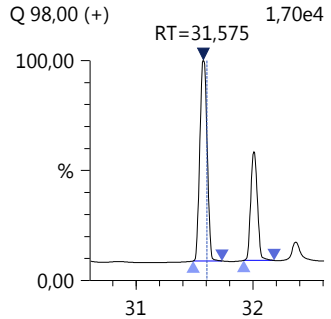
**hexane\_12**

Conc 0,353  
Area 8702  
Q 98,00 (+)



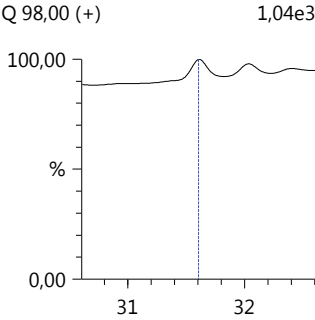
**hexane\_1**

Conc 2,567  
Area 69100  
Q 98,00 (+)



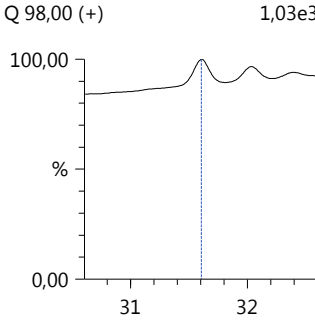
**hexane\_2**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



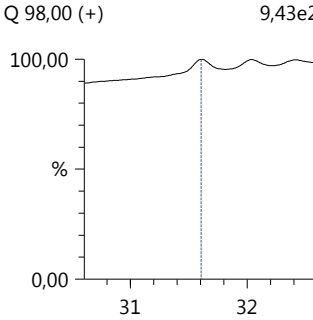
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



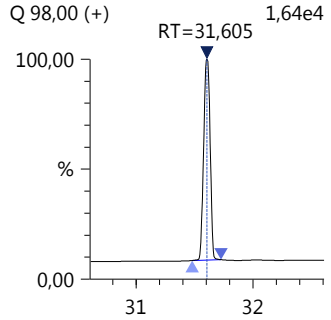
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



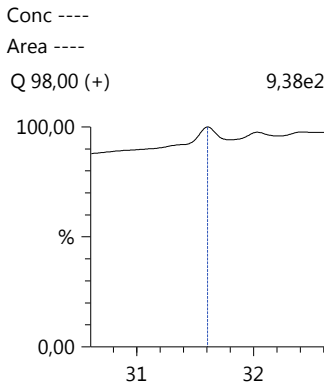
**Etalons 2 ppm\_5**

Conc 2,236  
Area 59426  
Q 98,00 (+)

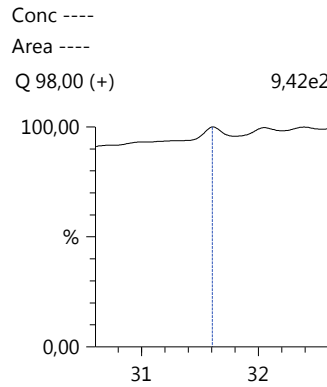




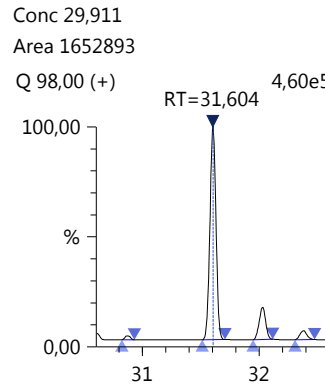
hexane\_6



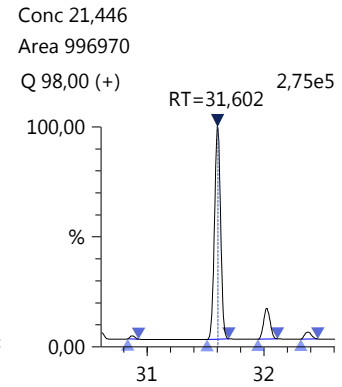
hexane\_7



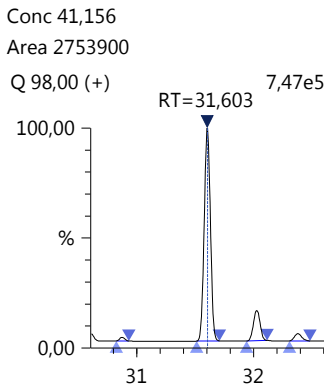
beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8



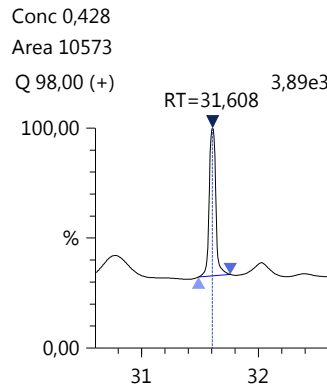
beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9



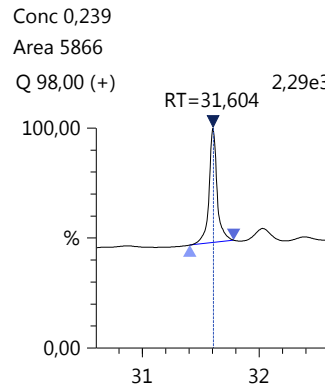
beurre de cacao 20 kGy - repet3\_10



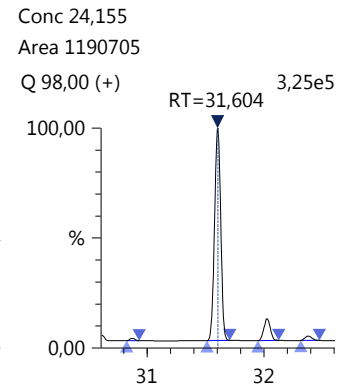
hexane\_11



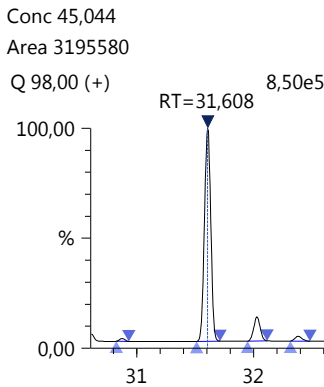
hexane\_12



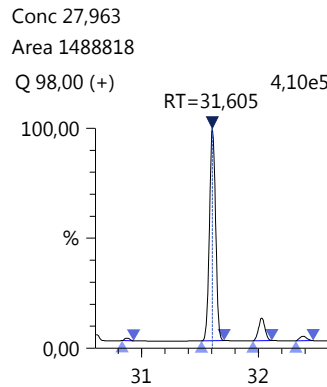
beurre de cacao 30 kGy - repet1\_13



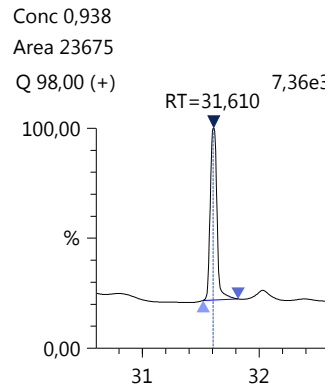
beurre de cacao 30 kGy - repet2\_14



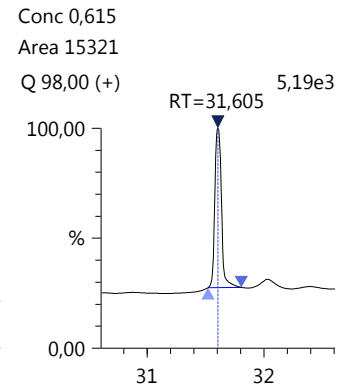
beurre de cacao 30 kGy - repet3\_15



hexane\_16



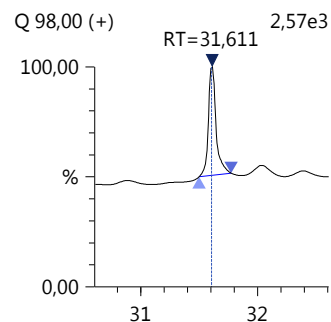
hexane\_17



**waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet2\_18**

Conc 0,244

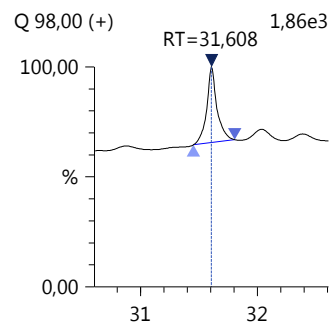
Area 5978



**waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet3\_19**

Conc 0,164

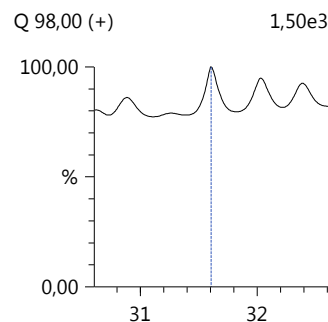
Area 4014



**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet2\_20**

Conc ----

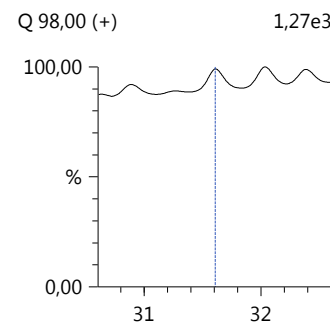
Area ----



**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet3\_21**

Conc ----

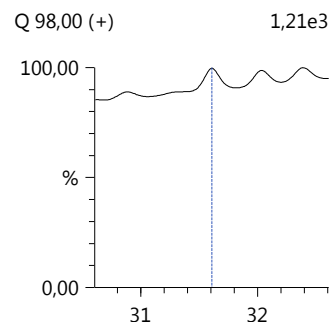
Area ----



**hexane\_22**

Conc ----

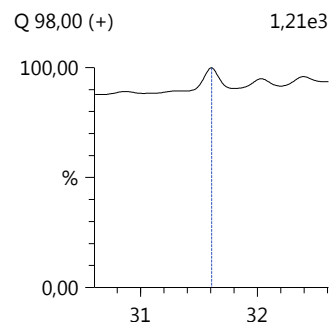
Area ----



**hexane\_23**

Conc ----

Area ----



Method File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet.qgm  
 Project File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet.damlp  
 Flags File: D:\191029\191017 calibration - 191028-29 repet.damlp

## ID1: 2-cyclohexylcyclohexanone

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12 (Not Available)	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	1,173	53588	794,60	24,041
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	0,261	11915	749,68	24,047
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	1,362	62207	3382,15	24,040
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	1,883	86034	2304,93	24,043
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	1,003	45807	2365,39	24,046
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	1,491	68123	2452,52	24,046
hexane_9	----	----	----	----
etalons 1 ppm_10	1,340	61199	5236,83	24,049
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	1,626	74272	6154,23	24,043
CHCH 1 ppm 191029_4	0,082	3732	242,51	24,043
Etalons 2 ppm_5	1,110	50707	4682,92	24,043
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	1,609	73518	2396,46	24,039
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	1,792	81842	2466,33	24,042
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	2,521	115153	2332,75	24,039
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	0,978	44664	1983,32	24,040
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	2,338	106783	2464,35	24,041
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	1,647	75226	2065,55	24,043
hexane_16	----	----	----	----
hexane_17	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	0,511	23330	893,16	24,043
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	0,246	11222	602,38	24,042
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	0,378	17268	670,71	24,036
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	0,400	18256	730,08	24,040
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_3	0,029	1313	29,12	24,028
beurre de cacao 0 kGy - repet2_4	0,100	4561	275,51	24,043
beurre de cacao 0 kGy - repet3_5	0,248	11322	740,45	24,042
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy_8	0,482	22016	1399,62	24,044
beurre de cacao 10 kGy + 5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB_9	0,527	24068	2163,28	24,044
5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB_10	2,457	112236	4846,57	24,043
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----

**ETALONS 005 PPM SI 1 PPM\_6 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 01 PPM SI 1 PPM\_7 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 02 PPM SI 1 PPM\_8 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 05 PPM SI 1 PPM\_9 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

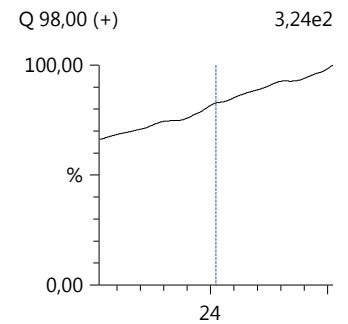
**ETALONS 1 PPM SI 1 PPM\_10 (Not Available) ETALONS 2 PPM SI 1 PPM\_11 (Not Available) ETALONS 5 PPM SI 1 PPM\_12 (Not Available) hexane\_1**

Conc ----  
Area ----

Conc ----  
Area ----

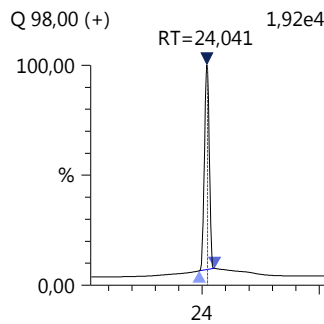
Conc ----  
Area ----

Conc ----  
Area ----



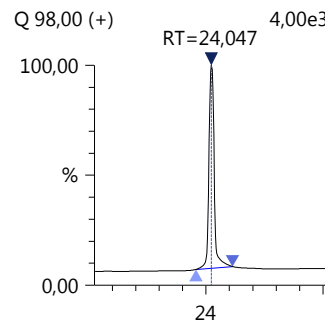
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_2**

Conc 1,173  
Area 53588



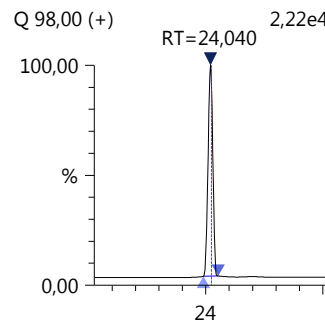
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_3**

Conc 0,261  
Area 11915



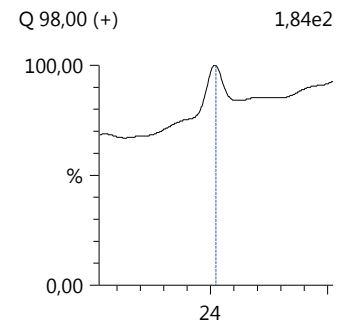
**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_4**

Conc 1,362  
Area 62207



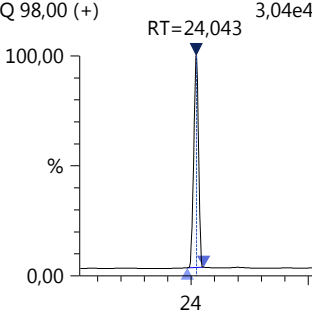
**hexane\_5**

Conc ----  
Area ----



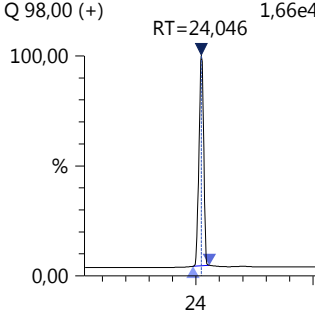
**beurre de cacao 10 kGy - repet1\_6**

Conc 1,883  
Area 86034  
Q 98,00 (+)



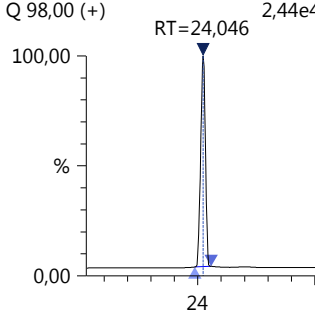
**beurre de cacao 10 kGy - repet2\_7**

Conc 1,003  
Area 45807  
Q 98,00 (+)



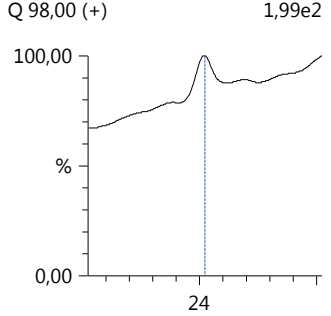
**beurre de cacao 10 kGy - repet3\_8**

Conc 1,491  
Area 68123  
Q 98,00 (+)



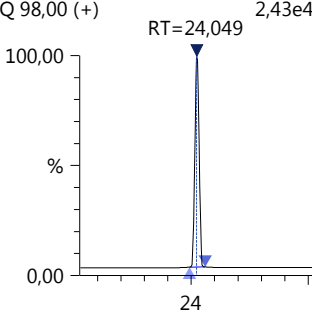
**hexane\_9**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



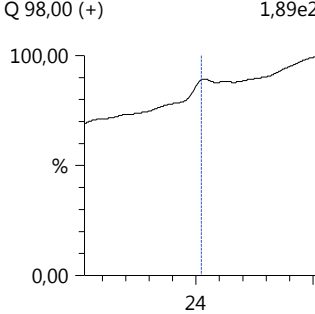
**etalons 1 ppm\_10**

Conc 1,340  
Area 61199  
Q 98,00 (+)



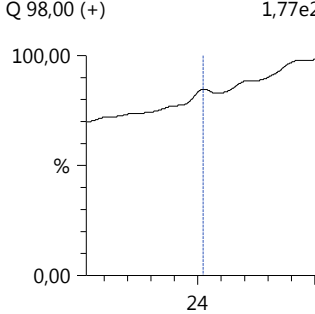
**hexane\_11**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



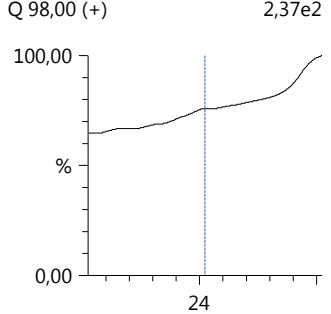
**hexane\_12**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



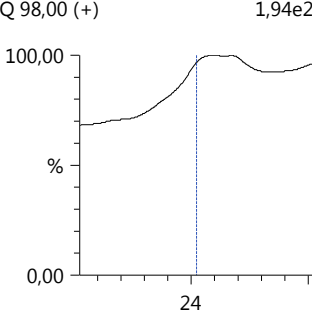
**hexane\_1**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



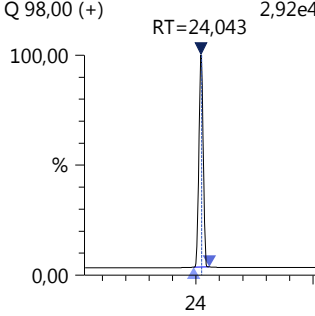
**hexane\_2**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



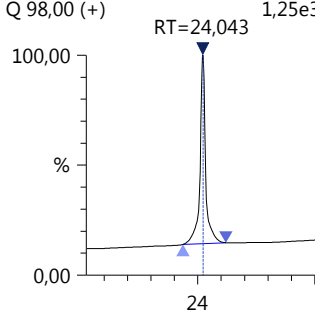
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc 1,626  
Area 74272  
Q 98,00 (+)



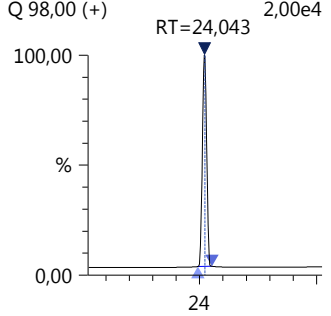
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc 0,082  
Area 3732  
Q 98,00 (+)

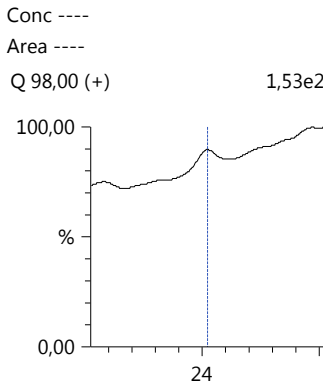


**Etalons 2 ppm\_5**

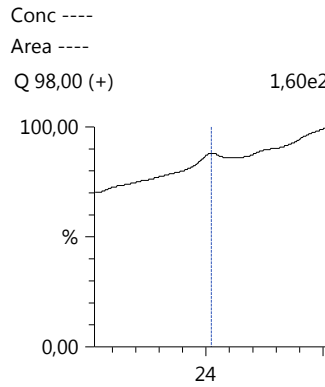
Conc 1,110  
Area 50707  
Q 98,00 (+)



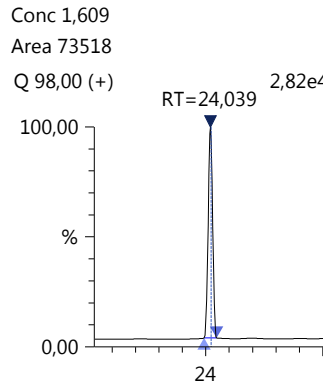
hexane\_6



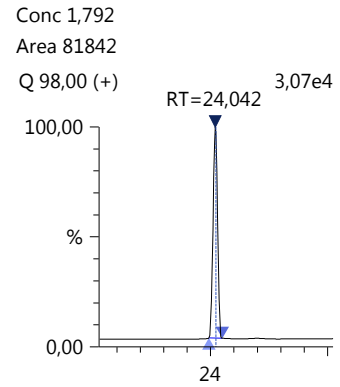
hexane\_7



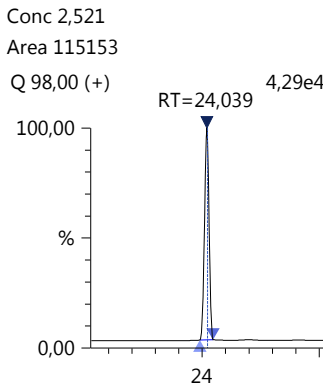
beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8



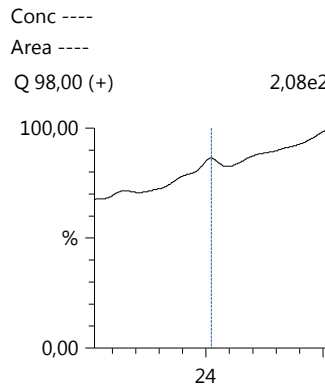
beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9



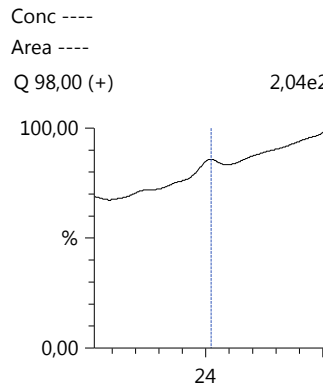
beurre de cacao 20 kGy - repet3\_10



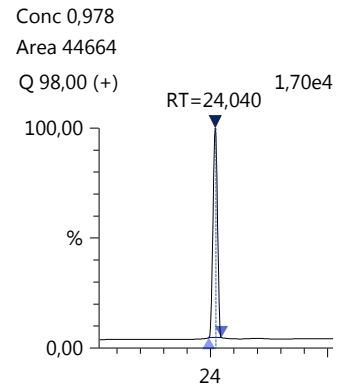
hexane\_11



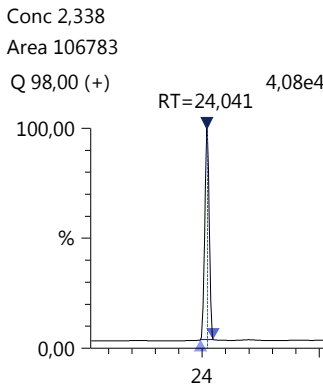
hexane\_12



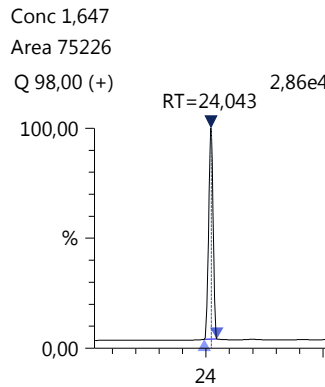
beurre de cacao 30 kGy - repet1\_13



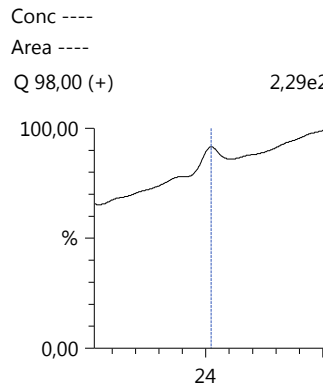
beurre de cacao 30 kGy - repet2\_14



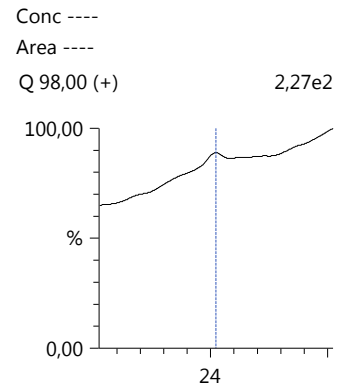
beurre de cacao 30 kGy - repet3\_15



hexane\_16

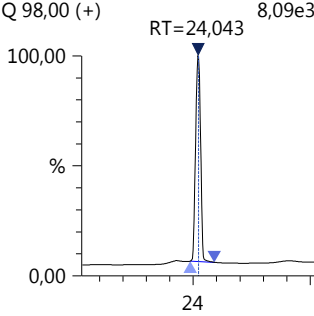


hexane\_17



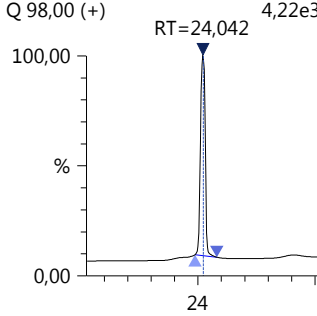
**waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet2\_18**

Conc 0,511  
Area 23330  
Q 98,00 (+)



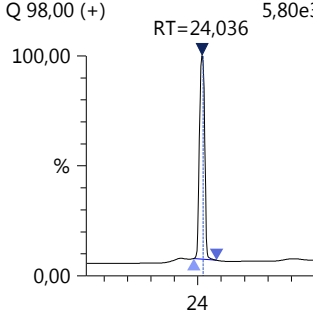
**waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet3\_19**

Conc 0,246  
Area 11222  
Q 98,00 (+)



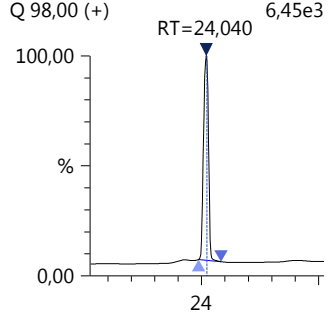
**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet2\_20**

Conc 0,378  
Area 17268  
Q 98,00 (+)



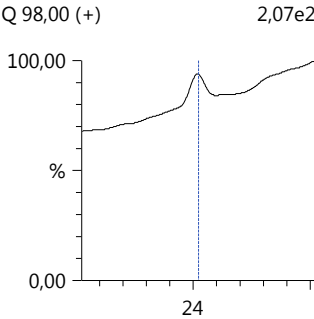
**waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet3\_21**

Conc 0,400  
Area 18256  
Q 98,00 (+)



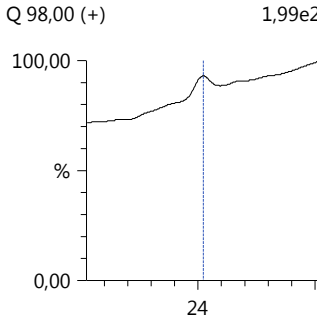
**hexane\_22**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



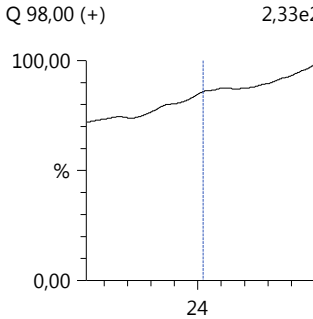
**hexane\_23**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



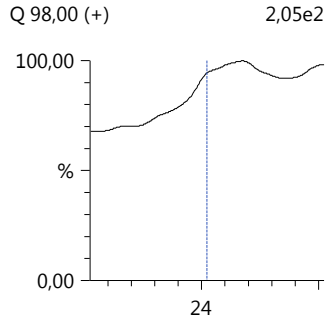
**hexane\_1**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



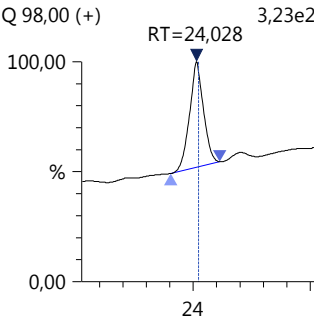
**hexane\_2**

Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



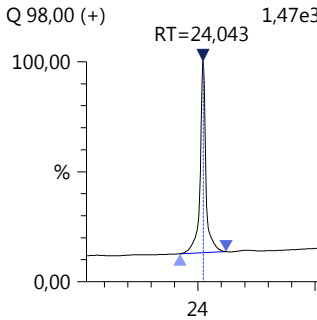
**beurre de cacao 0 kGy -  
repet1\_3**

Conc 0,029  
Area 1313  
Q 98,00 (+)



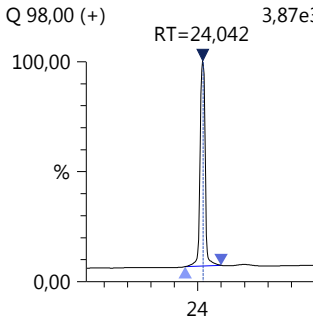
**beurre de cacao 0 kGy -  
repet2\_4**

Conc 0,100  
Area 4561  
Q 98,00 (+)



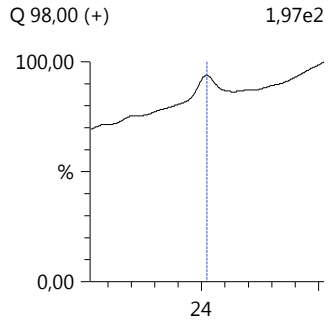
**beurre de cacao 0 kGy -  
repet3\_5**

Conc 0,248  
Area 11322  
Q 98,00 (+)

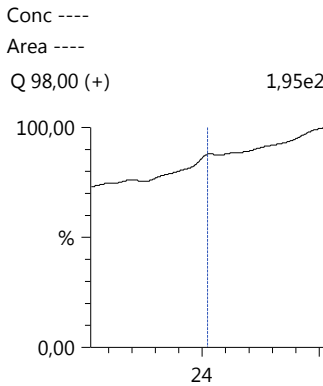


**hexane\_6**

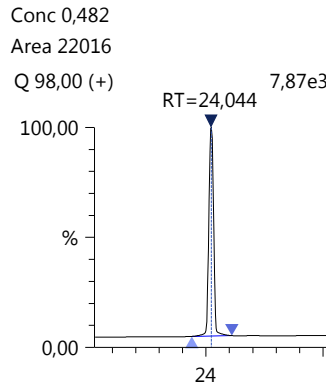
Conc ----  
Area ----  
Q 98,00 (+)



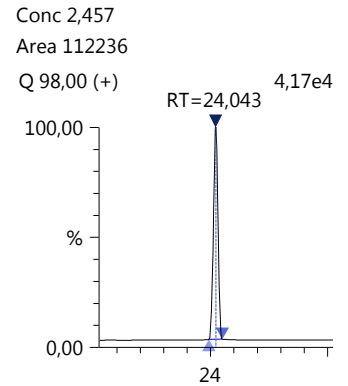
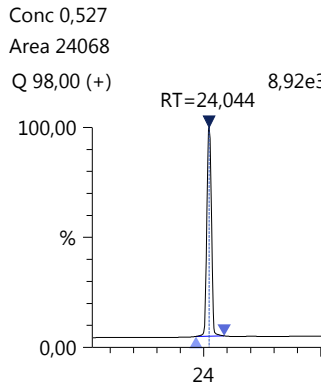
hexane\_7



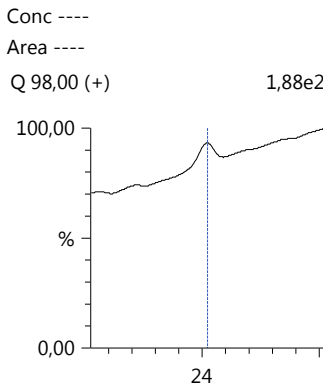
beurre de cacao 10 kGy\_8



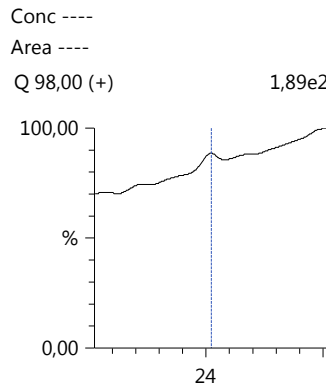
beurre de cacao 10 kGy + 5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB\_9



hexane\_11



hexane\_12



ID2: 2-dodecylcyclobutanone

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12 (Not Available)	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	----	----	----	----
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	----	----	----	----
hexane_9	----	----	----	----
etalons 1 ppm_10	----	----	----	----
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	----	----	----	----
CHCH 1 ppm 191029_4	----	----	----	----
Etalons 2 ppm_5	----	----	----	----
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	----	----	----	----
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	----	----	----	----
hexane_16	----	----	----	----
hexane_17	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	----	----	----	----



(Table continued from previous page)

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	----	----	----	----
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_4	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_5	----	----	----	----
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy_8	0,476	18004	239,92	28,454
beurre de cacao 10 kGy + 5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB_9	1,096	42779	407,86	28,453
5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB_10	4,612	211537	2621,70	28,454
hexane_11	0,134	4964	69,31	28,454
hexane_12	0,053	1958	13,38	28,455

**ETALONS 005 PPM SI 1 PPM\_6 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 01 PPM SI 1 PPM\_7 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 02 PPM SI 1 PPM\_8 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 05 PPM SI 1 PPM\_9 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 1 PPM SI 1 PPM\_10 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 2 PPM SI 1 PPM\_11 (Not Available)**

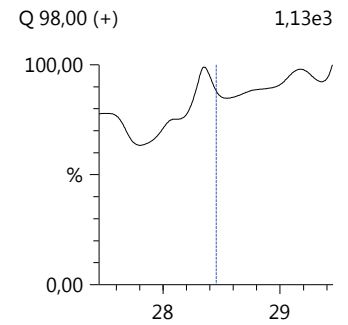
Conc ----  
Area ----

**ETALONS 5 PPM SI 1 PPM\_12 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**hexane\_1**

Conc ----  
Area ----



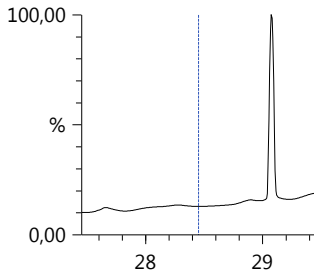
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_2**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

7,72e3



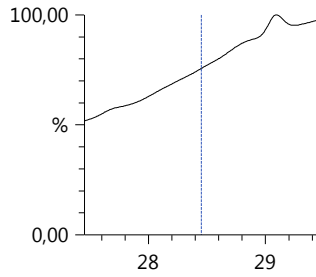
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_3**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

8,22e2



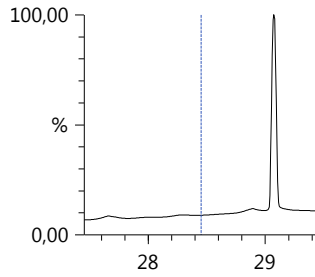
**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_4**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

9,83e3



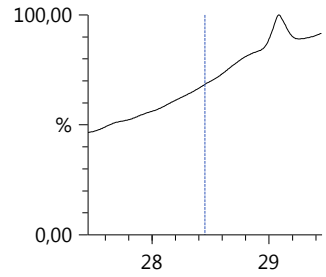
**hexane\_5**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

8,69e2



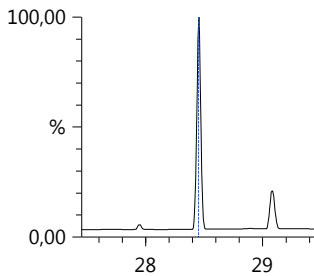
**beurre de cacao 10 kGy - repet1\_6**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,23e5



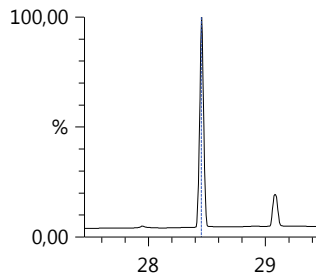
**beurre de cacao 10 kGy - repet2\_7**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

4,82e4



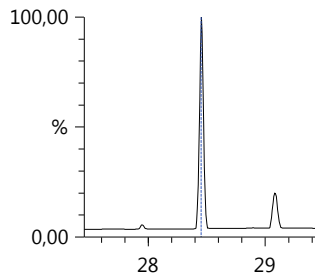
**beurre de cacao 10 kGy - repet3\_8**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,00e5



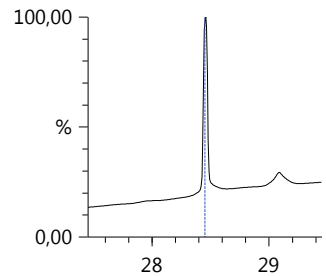
**hexane\_9**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

4,19e3



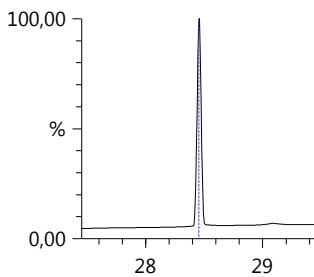
**etalons 1 ppm\_10**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

2,32e4



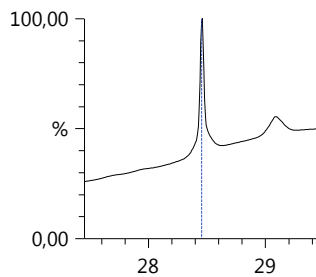
**hexane\_11**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,71e3



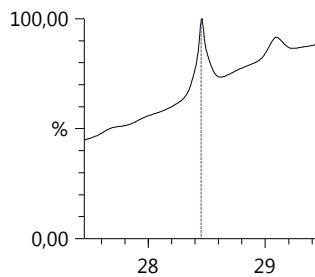
**hexane\_12**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

9,16e2



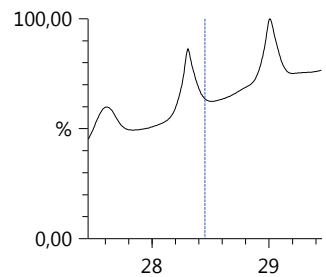
**hexane\_1**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,04e3



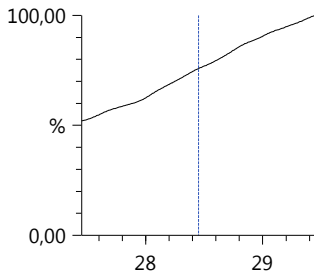
**hexane\_2**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

7,92e2



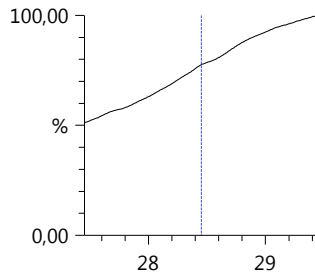
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

7,66e2



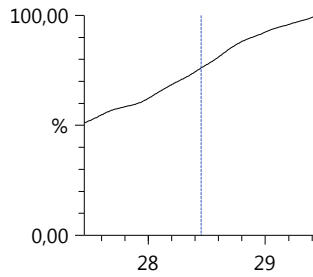
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

7,39e2



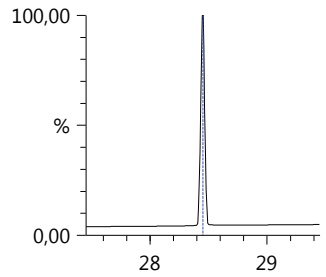
**Etalons 2 ppm\_5**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

3,76e4



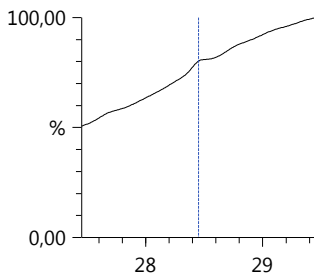
**hexane\_6**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

7,20e2



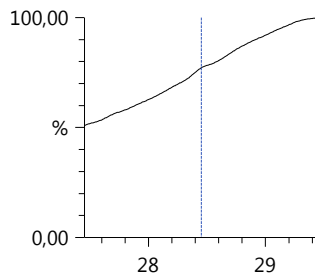
**hexane\_7**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

7,47e2



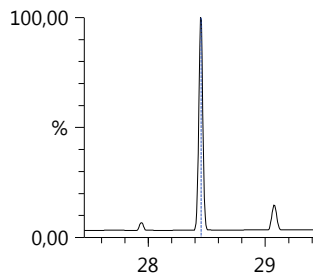
**beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,97e5



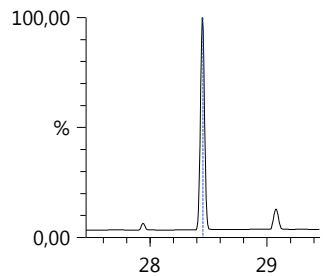
**beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,43e5



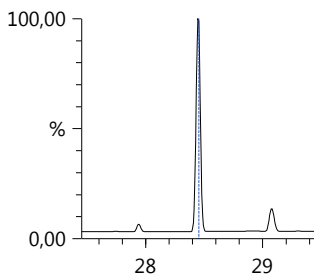
**beurre de cacao 20 kGy - repet3\_10**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

3,21e5



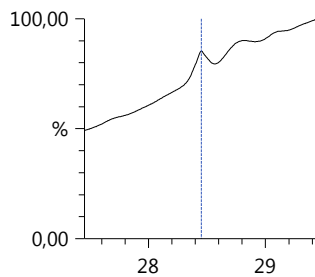
**hexane\_11**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,00e3



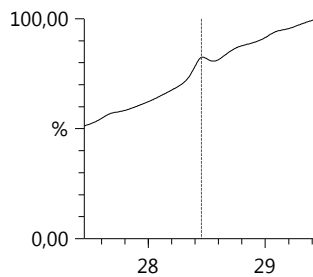
**hexane\_12**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

8,92e2



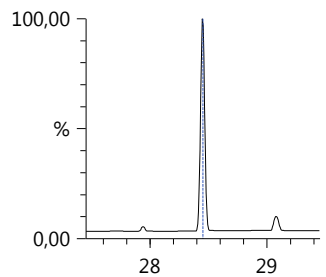
**beurre de cacao 30 kGy - repet1\_13**

Conc ----

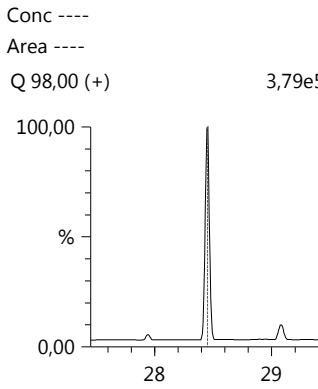
Area ----

Q 98,00 (+)

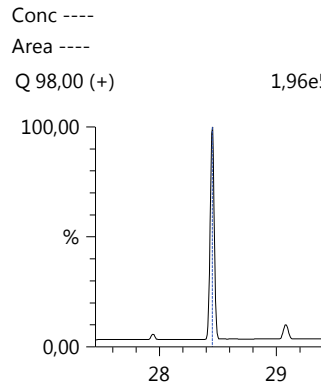
1,44e5



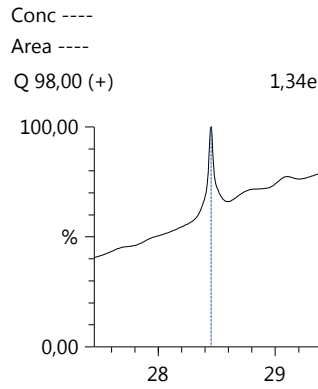
**beurre de cacao 30 kGy - repet2\_14**



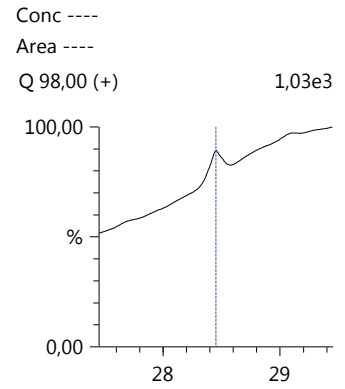
**beurre de cacao 30 kGy - repet3\_15**



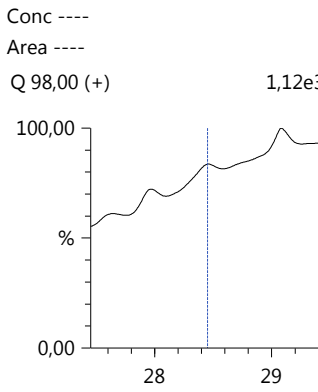
**hexane\_16**



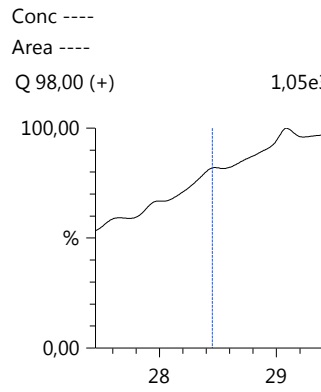
**hexane\_17**



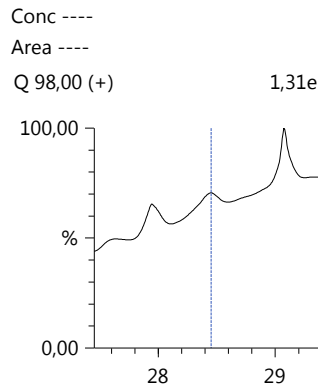
**waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2\_18**



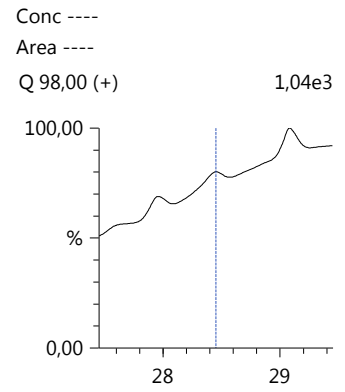
**waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3\_19**



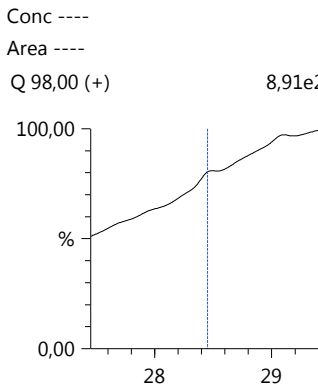
**waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2\_20**



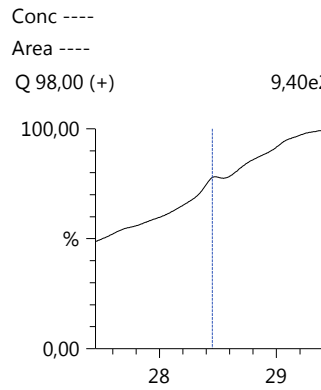
**waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3\_21**



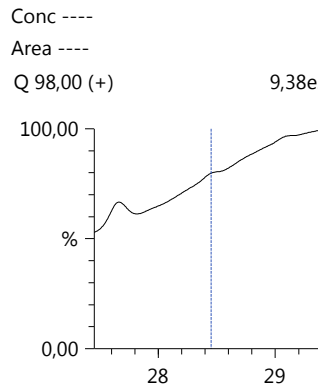
**hexane\_22**



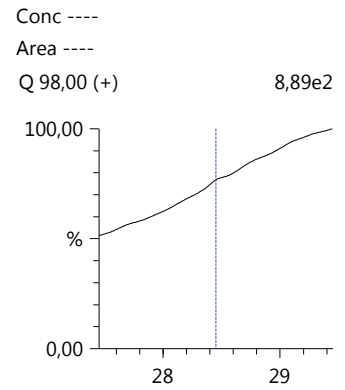
**hexane\_23**



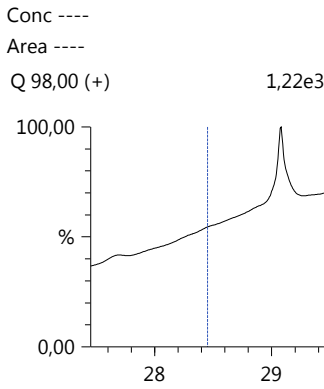
**hexane\_1**



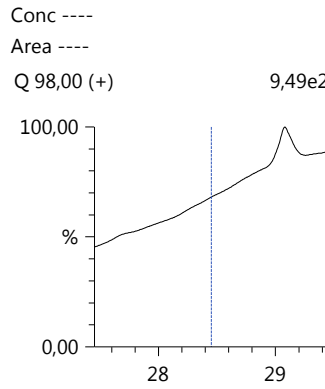
**hexane\_2**



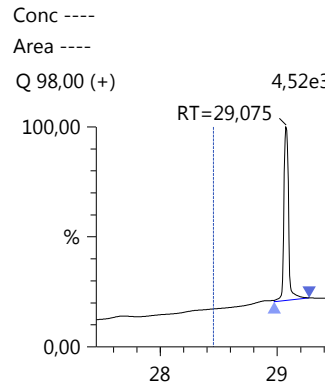
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_3**



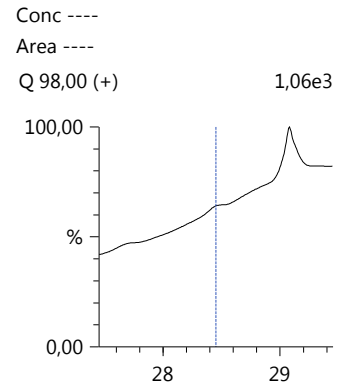
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_4**



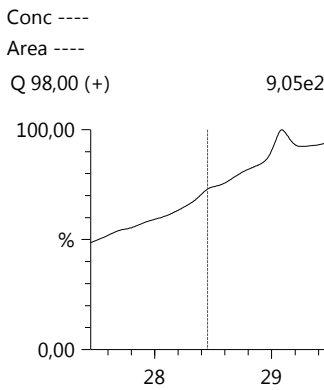
**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_5**



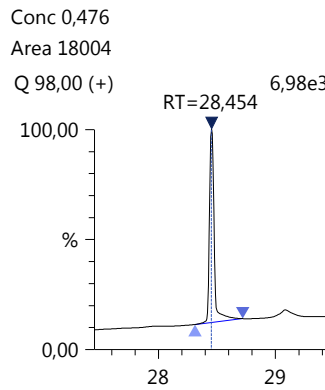
**hexane\_6**



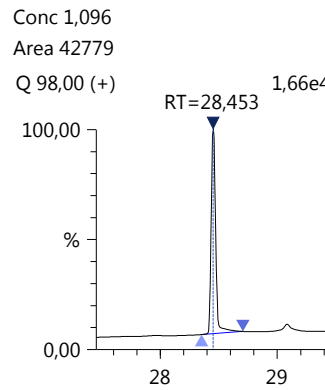
**hexane\_7**



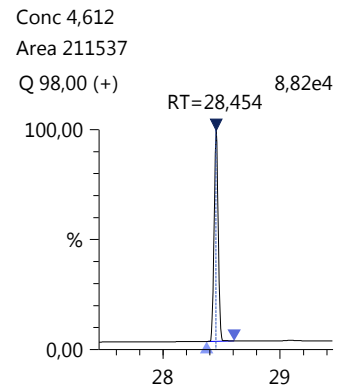
**beurre de cacao 10 kGy\_8**



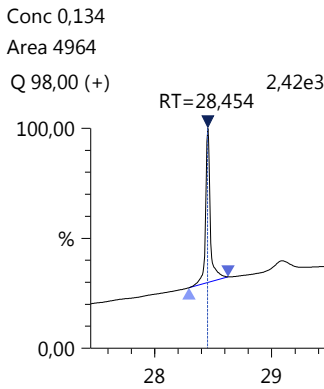
**beurre de cacao 10 kGy + 5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB\_9**



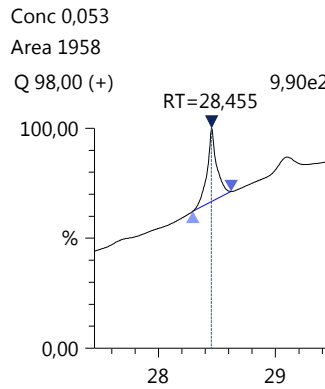
**5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB\_10**



**hexane\_11**



**hexane\_12**



## ID3: 2-tetradecylcyclobutanone

Data Filename	Conc.	Area	S/N	Found RT
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11 (Not Available)	----	----	----	----
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12 (Not Available)	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_4	----	----	----	----
hexane_5	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet1_6	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet2_7	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy - repet3_8	----	----	----	----
hexane_9	----	----	----	----
etalons 1 ppm_10	----	----	----	----
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
CHCH 1 ppm_3	----	----	----	----
CHCH 1 ppm 191029_4	----	----	----	----
Etalons 2 ppm_5	----	----	----	----
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet1_8	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet2_9	----	----	----	----
beurre de cacao 20 kGy - repet3_10	----	----	----	----
hexane_11	----	----	----	----
hexane_12	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet1_13	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet2_14	----	----	----	----
beurre de cacao 30 kGy - repet3_15	----	----	----	----
hexane_16	----	----	----	----
hexane_17	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet2_18	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 20 kGy - repet3_19	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet2_20	----	----	----	----
waste - beurre de cacao 30 kGy - repet3_21	----	----	----	----
hexane_22	----	----	----	----
hexane_23	----	----	----	----
hexane_1	----	----	----	----
hexane_2	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet1_3	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet2_4	----	----	----	----
beurre de cacao 0 kGy - repet3_5	----	----	----	----
hexane_6	----	----	----	----
hexane_7	----	----	----	----
beurre de cacao 10 kGy_8	0,706	17652	332,66	31,613
beurre de cacao 10 kGy + 5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB_9	3,362	93282	1433,41	31,610
5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB_10	28,422	1526770	17597,85	31,614
hexane_11	1,598	41409	589,85	31,612
hexane_12	1,236	31566	582,61	31,614

**ETALONS 005 PPM SI 1 PPM\_6 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 01 PPM SI 1 PPM\_7 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 02 PPM SI 1 PPM\_8 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 05 PPM SI 1 PPM\_9 (Not Available)**

Conc ----  
Area ----

**ETALONS 1 PPM SI 1 PPM\_10 (Not Available) ETALONS 2 PPM SI 1 PPM\_11 (Not Available) ETALONS 5 PPM SI 1 PPM\_12 (Not Available) hexane\_1**

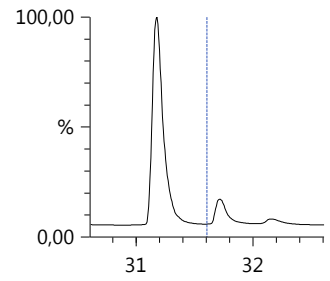
Conc ----  
Area ----

Conc ----  
Area ----

Conc ----  
Area ----

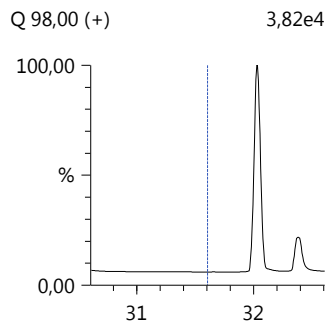
Conc ----  
Area ----

Q 98,00 (+) 4,51e4



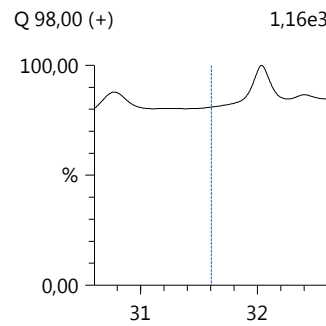
**beurre de cacao 0 kGy - repet1\_2**

Conc ----  
Area ----



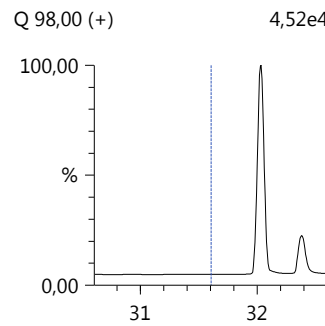
**beurre de cacao 0 kGy - repet2\_3**

Conc ----  
Area ----



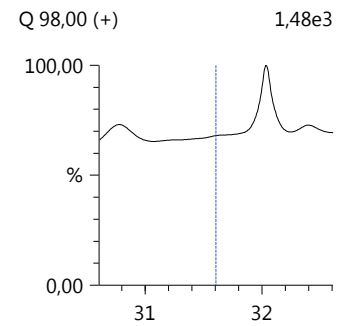
**beurre de cacao 0 kGy - repet3\_4**

Conc ----  
Area ----



**hexane\_5**

Conc ----  
Area ----



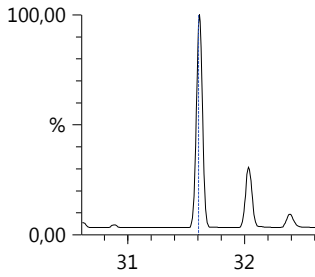
**beurre de cacao 10 kGy - repet1\_6**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

2,80e5



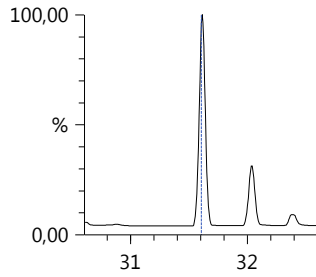
**beurre de cacao 10 kGy - repet2\_7**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

9,43e4



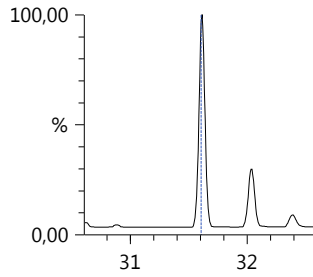
**beurre de cacao 10 kGy - repet3\_8**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

2,22e5



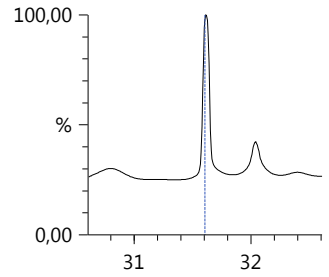
**hexane\_9**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

4,77e3



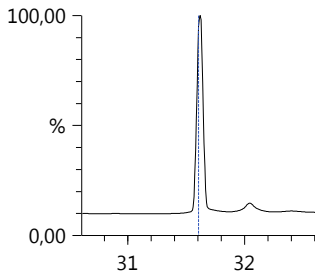
**etalons 1 ppm\_10**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,35e4



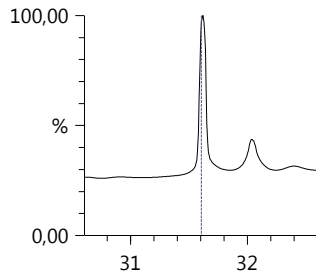
**hexane\_11**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

4,05e3



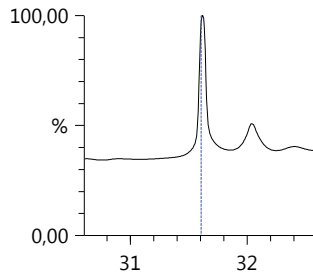
**hexane\_12**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

2,93e3



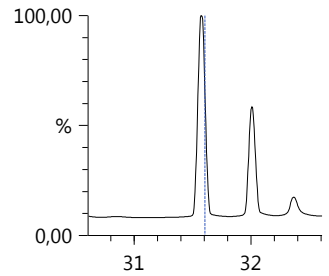
**hexane\_1**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,70e4



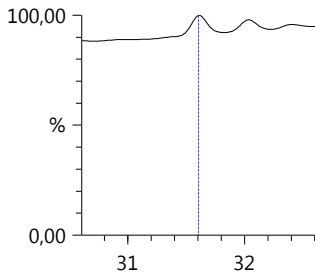
**hexane\_2**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,04e3



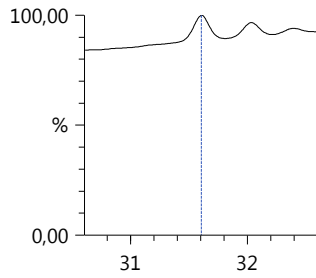
**CHCH 1 ppm\_3**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

1,03e3



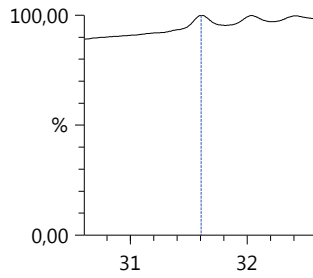
**CHCH 1 ppm 191029\_4**

Conc ----

Area ----

Q 98,00 (+)

9,43e2



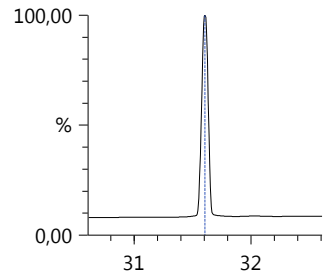
**Etalons 2 ppm\_5**

Conc ----

Area ----

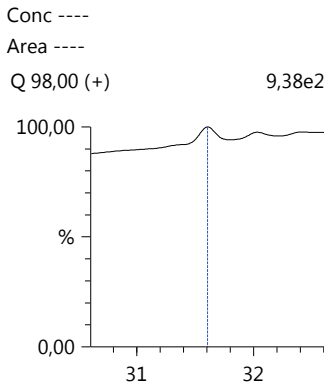
Q 98,00 (+)

1,64e4

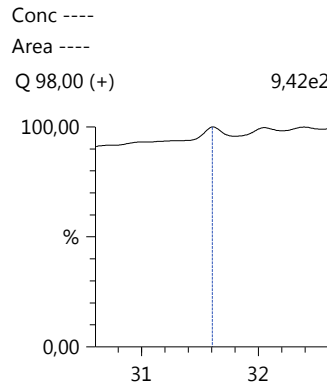




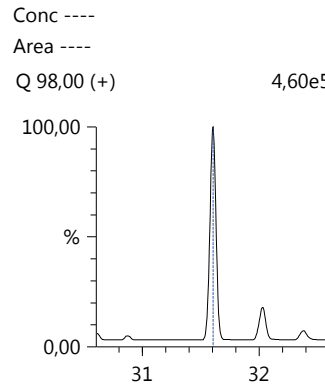
hexane\_6



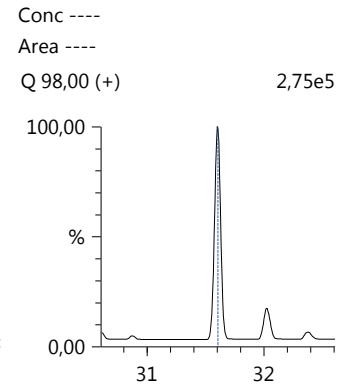
hexane\_7



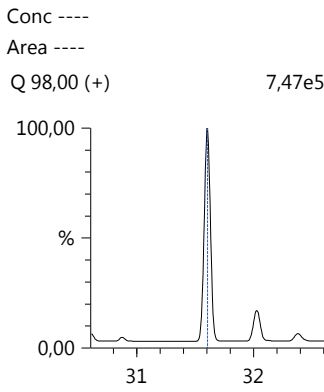
beurre de cacao 20 kGy - repet1\_8



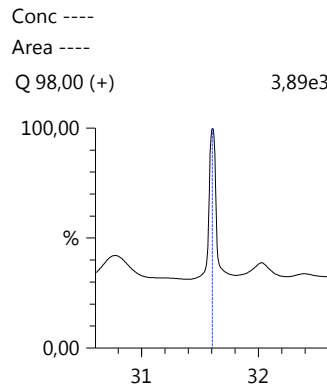
beurre de cacao 20 kGy - repet2\_9



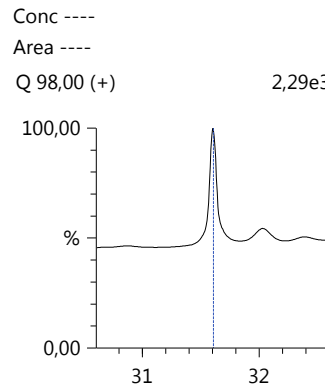
beurre de cacao 20 kGy - repet3\_10



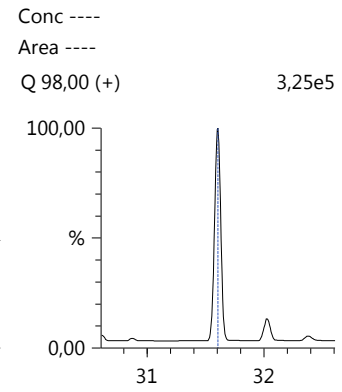
hexane\_11



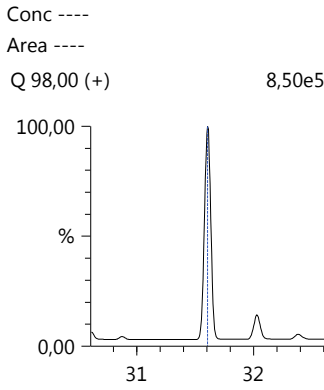
hexane\_12



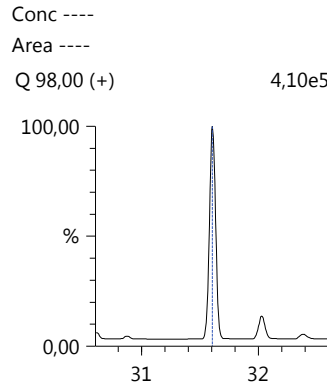
beurre de cacao 30 kGy - repet1\_13



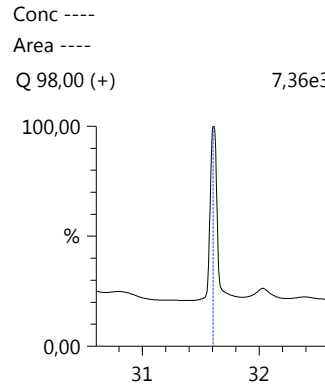
beurre de cacao 30 kGy - repet2\_14



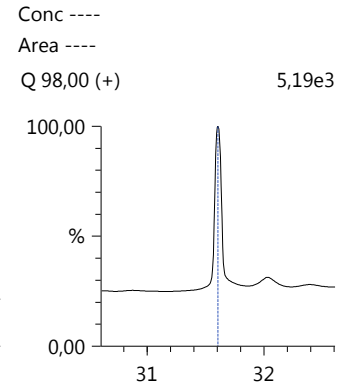
beurre de cacao 30 kGy - repet3\_15



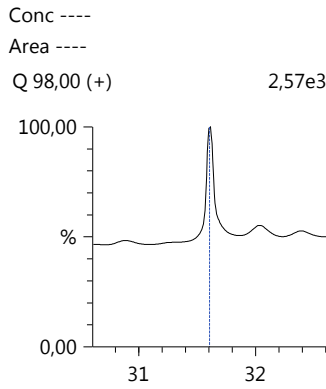
hexane\_16



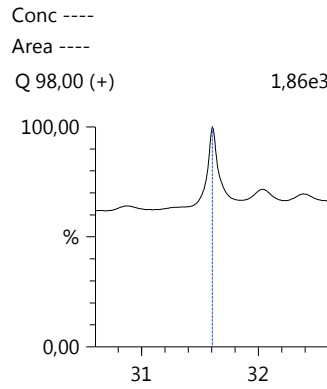
hexane\_17



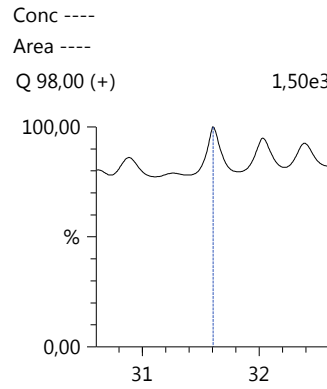
waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet2\_18



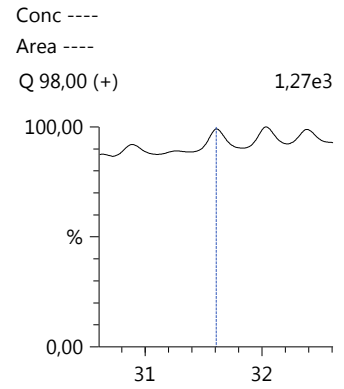
waste - beurre de cacao  
20 kGy - repet3\_19



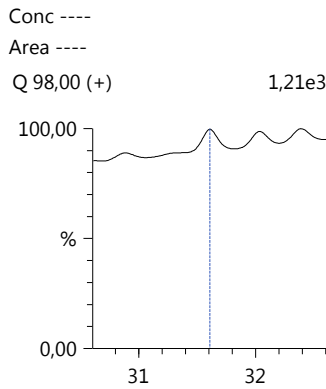
waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet2\_20



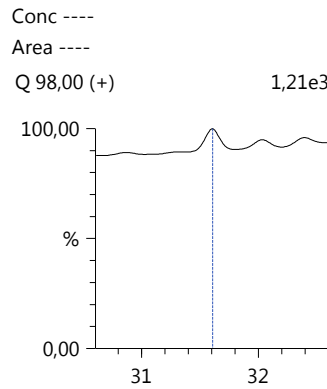
waste - beurre de cacao  
30 kGy - repet3\_21



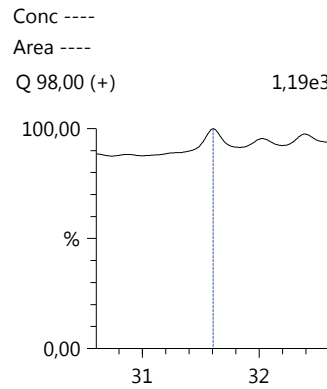
hexane\_22



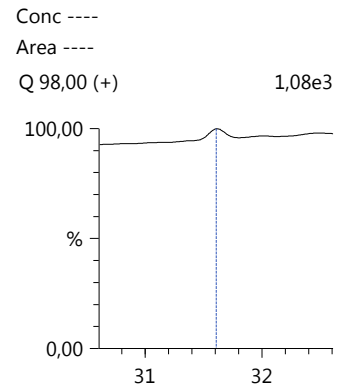
hexane\_23



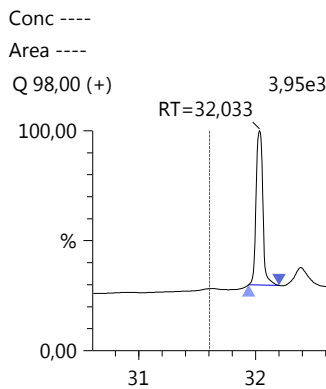
hexane\_1



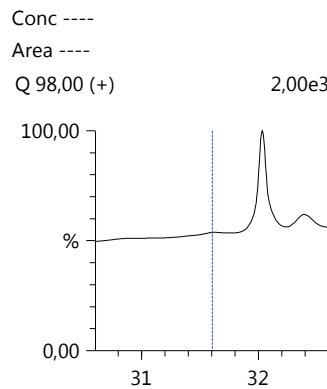
hexane\_2



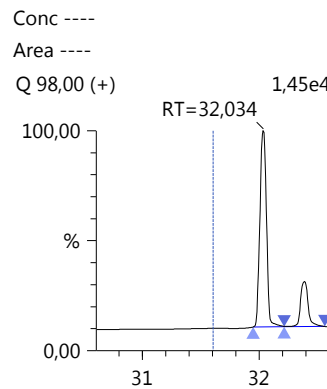
beurre de cacao 0 kGy -  
repet1\_3



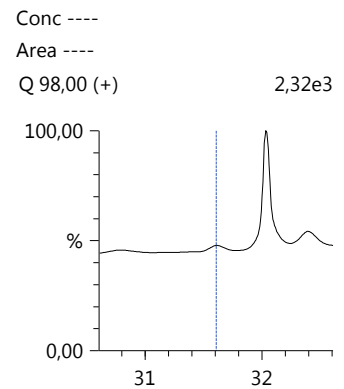
beurre de cacao 0 kGy -  
repet2\_4



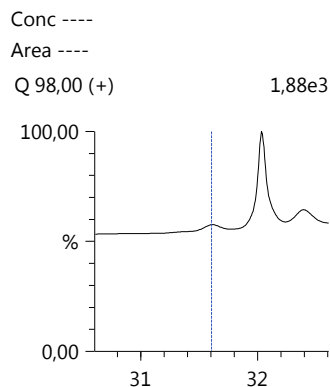
beurre de cacao 0 kGy -  
repet3\_5



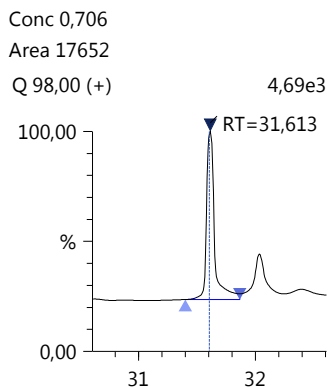
hexane\_6



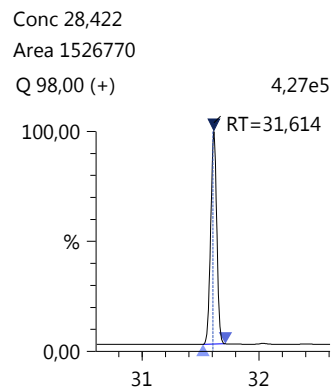
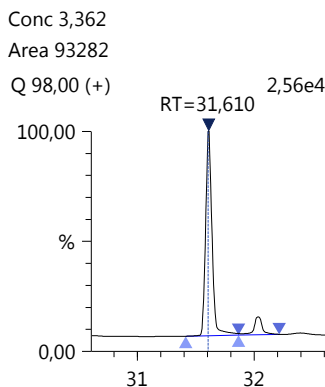
hexane\_7



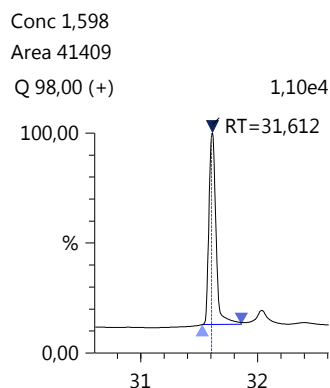
beurre de cacao 10 kGy\_8



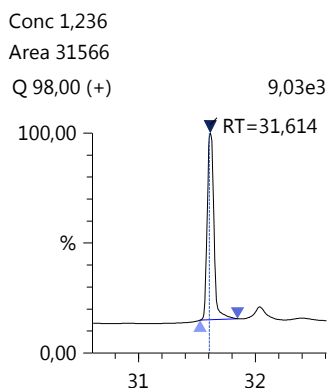
beurre de cacao 10 kGy + 5 ppm 2-DCB + 10 ppm 2-TCB\_9



hexane\_11



hexane\_12



SHIMADZU  
LabSolutions

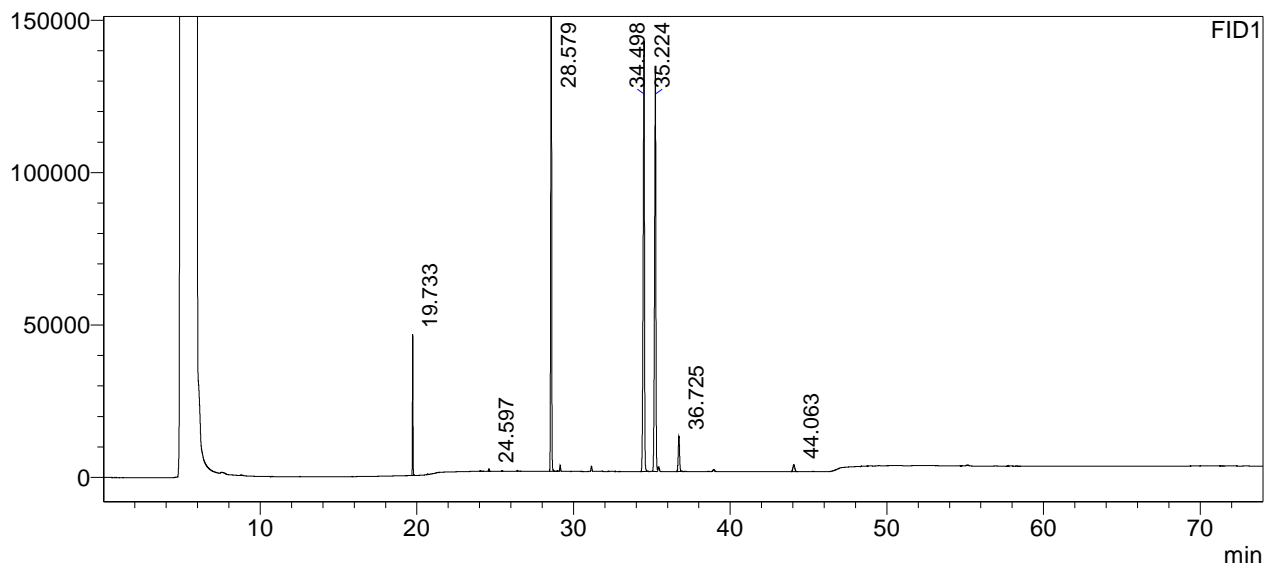
# Analysis Report

## <Sample Information>

Sample Name : beurre de cacao  
 Sample ID :  
 Data Filename : beurre de cacao\_002.gcd  
 Method Filename : Acides gras optima60 190704.gcm  
 Batch Filename : 2019 09 23.gcb  
 Vial # : 3  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 23/09/2019 14:48:35  
 Date Processed : 30/09/2019 12:10:02  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

uV



## <Peak Table>

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	19.733	110036	46330	0.000	ppm		C11:0
2	24.597	2126	815	0.000	ppm	M	C14:0
3	28.579	803400	217087	0.000	ppm		C16:0
4	34.498	823843	141262	0.000	ppm		C18:0
5	35.224	753306	132837	0.000	ppm	V	C18:1cis
6	36.725	67901	11653	0.000	ppm		C18:2n6cis
7	44.063	18529	2264	0.000	ppm		C20:0
Total		2579142	552248				



SHIMADZU  
LabSolutions

# Analysis Report

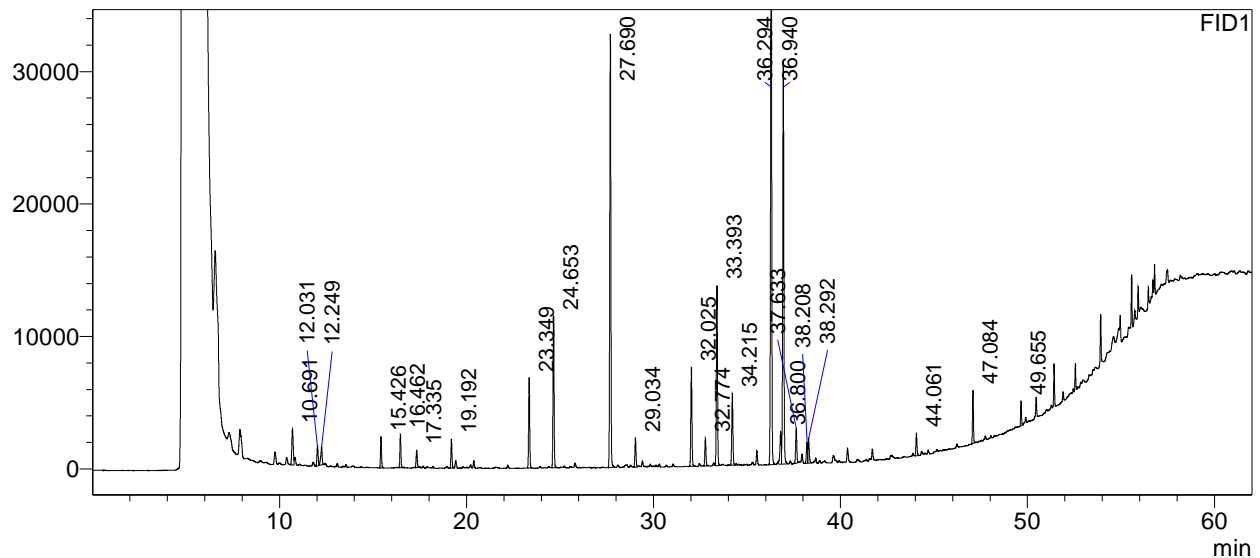
## <Sample Information>

Sample Name : beurre de cacao 30 kGy  
 Sample ID :  
 Data Filename : beurre de cacao 30 kGy\_004.gcd  
 Method Filename : HCOptima60 190704.gcm  
 Batch Filename : 2019 09 25.gcb  
 Vial # : 3  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 26/09/2019 12:15:45  
 Date Processed : 26/09/2019 13:17:48

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

uV



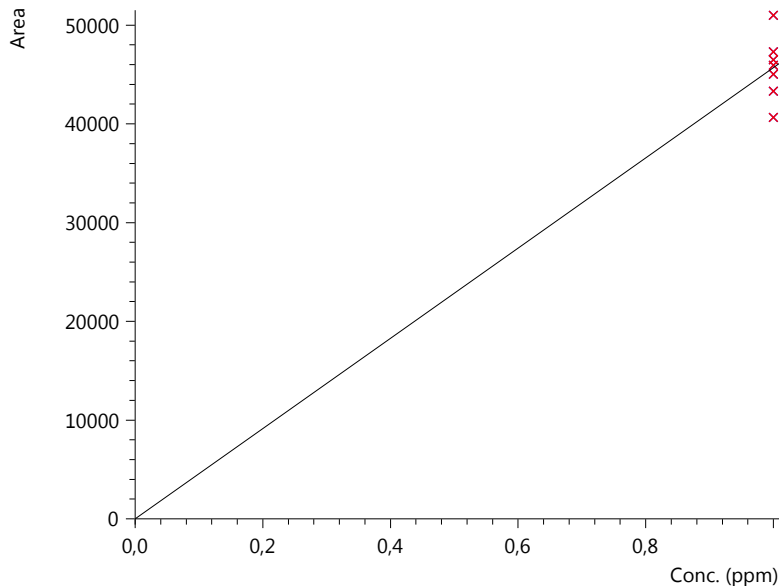
## <Peak Table>

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	10.691	14158	2714	0.000			
2	12.031	6673	1512	0.000			
3	12.249	6963	1341	0.000		V	
4	15.426	8626	2346	0.000			
5	16.462	9361	2533	0.000	ppm		1-C12:1
6	17.335	5657	1302	0.000			
7	19.192	8560	2192	0.000	ppm		C13:0
8	23.349	26814	6811	0.000			
9	24.653	45188	11481	0.000	ppm		1-C14:1
10	27.690	134125	32717	0.000	ppm		C15:0
11	29.034	9060	2206	0.000			
12	32.025	31060	7461	0.000		S	
13	32.774	8502	2093	0.000			
14	33.393	55856	13592	0.000	ppm	V	1-C16:1
15	34.215	23029	5411	0.000	ppm		1,7-C16:2
16	36.294	184933	43716	0.000	ppm		C17:0
17	36.800	12377	2461	0.000		V	
18	36.940	132176	30415	0.000	ppm	V	8-C17:1
19	37.633	11226	2663	0.000	ppm	V	6,9-C17:2
20	38.208	6765	1572	0.000			
21	38.292	8511	1861	0.000		V	
22	44.061	6788	1706	0.000		S	
23	47.084	13618	4021	0.000	ppm		n-eicosane
24	49.655	6139	1865	0.000			
Total		776162	185993				

### ID1: 2-cyclohexylcyclohexanone

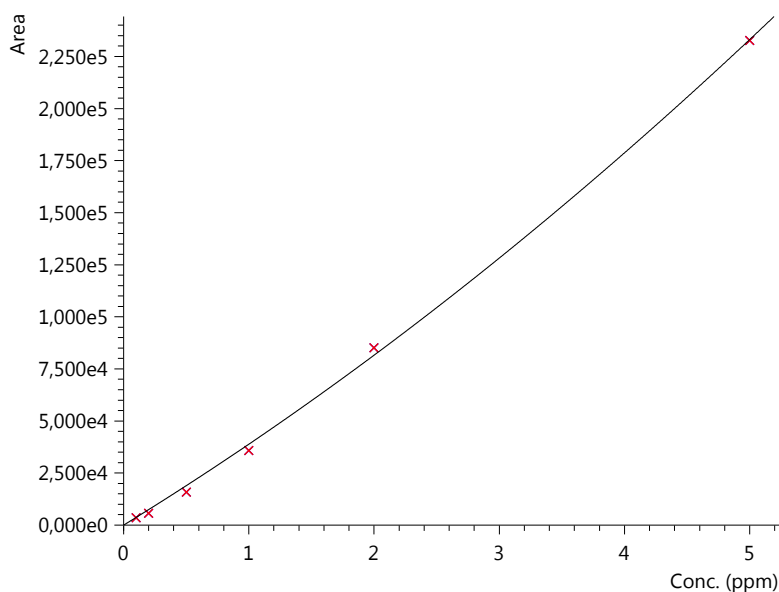
Correlation coefficient: ---- Quant Method: External Standard  
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Force Through | Weighting: None | Equation:  $y = 45678,29x + 0,0000000$



Data Filename	Sam ple Na me	Cal Point	Area	Area Ratio	Conc.	Accur acy(%)
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----

### ID2: 2-dodecylcyclobutanone

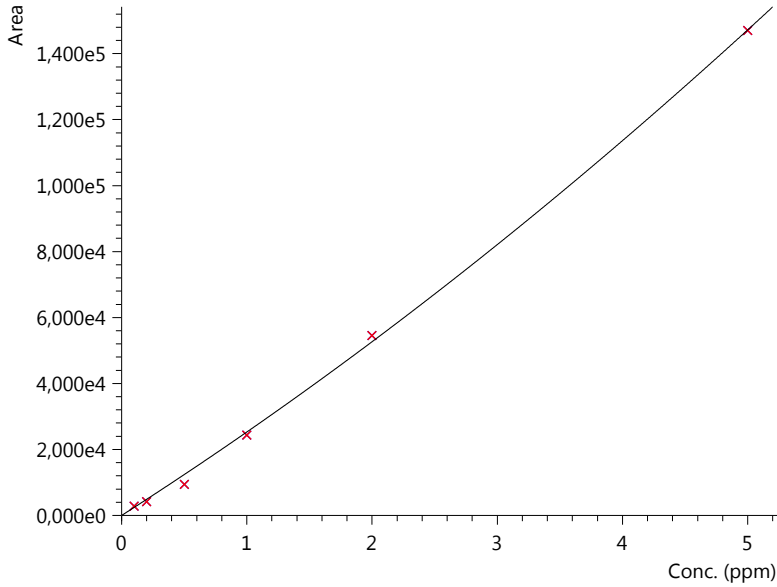
Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9992772$   $R = 0.9996385$  Quant Method: External Standard  
Calibration curve: Curve type: Quadratic | Zero: Force Through | Weighting: None | Equation:  $y = 1944,183x^2 + 36905,33x + 0,0000000$



Data Filename	Sam ple Na me	Cal Point	Area	Area Ratio	Conc.	Accur acy(%)
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----

### ID3: 2-tetradecylcyclobutanone

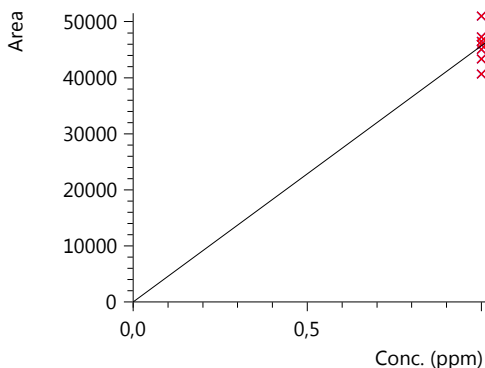
Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9992312$   $R = 0.9996155$  Quant Method: External Standard  
 Calibration curve: Curve type: Quadratic | Zero: Force Through | Weighting: None | Equation:  $y = 1036,357x^2 + 24262,41x + 0,0000000$



Data Filename	Sam ple Na me	Cal Point	Area	Area Ratio	Conc.	Accur acy(%)
ETALONS 005 PPM SI 1 PPM_6 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 01 PPM SI 1 PPM_7 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 02 PPM SI 1 PPM_8 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 05 PPM SI 1 PPM_9 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 1 PPM SI 1 PPM_10 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 2 PPM SI 1 PPM_11 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
ETALONS 5 PPM SI 1 PPM_12 (Not Available)		<input type="checkbox"/>	----	----	----	----

### ID1: 2-cyclohexylcyclohexanone

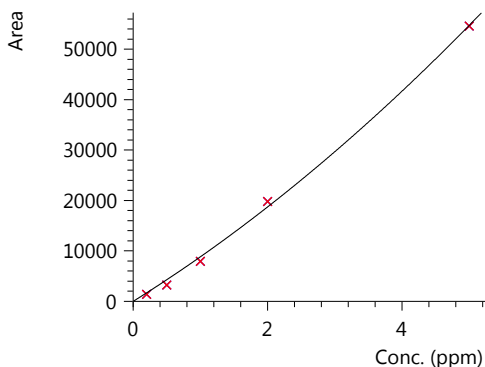
Correlation coefficient: ---- Quant Method: External Standard  
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Force Through | Weighting: None | Equation:  $y = 45678,29x + 0,0000000$



Data Filename	Sample Name	Cal Point	Area	Area Ratio	Conc.	Accur acy(%)
Etalons 005 ppm SI 1 ppm_6	Etalons 005 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	46501	----	1,018	101,80
Etalons 01 ppm SI 1 ppm_7	Etalons 01 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	50996	----	1,116	111,64
Etalons 02 ppm SI 1 ppm_8	Etalons 02 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	40656	----	0,890	89,01
Etalons 05 ppm SI 1 ppm_9	Etalons 05 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	45936	----	1,006	100,56
Etalons 1 ppm SI 1 ppm_10	Etalons 1 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	43319	----	0,948	94,83
Etalons 2 ppm SI 1 ppm_11	Etalons 2 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	47296	----	1,035	103,54
Etalons 5 ppm SI 1 ppm_12	Etalons 5 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	45044	----	0,986	98,61

### ID2: 2-dodecylcyclobutanone

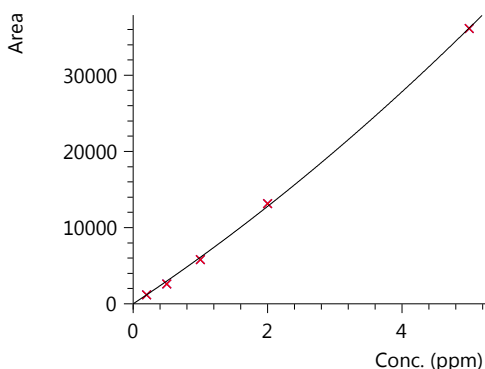
Correlation coefficient:  $R^2 = 0,9986894$   $R = 0,9993445$  Quant Method: External Standard  
Calibration curve: Curve type: Quadratic | Zero: Force Through | Weighting: None | Equation:  $y = 527,6440x^2 + 8306,300x + 0,0000000$



Data Filename	Sample Name	Cal Point	Area	Area Ratio	Conc.	Accur acy(%)
Etalons 005 ppm SI 1 ppm_6	Etalons 005 ppm SI 1 ppm	<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
Etalons 01 ppm SI 1 ppm_7	Etalons 01 ppm SI 1 ppm	<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
Etalons 02 ppm SI 1 ppm_8	Etalons 02 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	1424	----	0,170	84,80
Etalons 05 ppm SI 1 ppm_9	Etalons 05 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	3233	----	0,380	76,01
Etalons 1 ppm SI 1 ppm_10	Etalons 1 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	7907	----	0,900	90,04
Etalons 2 ppm SI 1 ppm_11	Etalons 2 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	19777	----	2,101	105,03
Etalons 5 ppm SI 1 ppm_12	Etalons 5 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	54602	----	4,991	99,82

### ID3: 2-tetradecylcyclobutanone

Correlation coefficient:  $R^2 = 0,9996110$   $R = 0,9998055$  Quant Method: External Standard  
Calibration curve: Curve type: Quadratic | Zero: Force Through | Weighting: None | Equation:  $y = 281,9132x^2 + 5827,192x + 0,0000000$



Data Filename	Sample Name	Cal Point	Area	Area Ratio	Conc.	Accur acy(%)
Etalons 005 ppm SI 1 ppm_6	Etalons 005 ppm SI 1 ppm	<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
Etalons 01 ppm SI 1 ppm_7	Etalons 01 ppm SI 1 ppm	<input type="checkbox"/>	----	----	----	----
Etalons 02 ppm SI 1 ppm_8	Etalons 02 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	1195	----	0,203	101,54
Etalons 05 ppm SI 1 ppm_9	Etalons 05 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	2597	----	0,436	87,29
Etalons 1 ppm SI 1 ppm_10	Etalons 1 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	5796	----	0,951	95,09
Etalons 2 ppm SI 1 ppm_11	Etalons 2 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	13133	----	2,050	102,52
Etalons 5 ppm SI 1 ppm_12	Etalons 5 ppm SI 1 ppm	<input checked="" type="checkbox"/>	36144	----	4,995	99,91



---

---

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000  
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908  
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil  
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.

---

---

---