

REDUTASE E EMPREGO DE RESAZURIN NOS EXAMES DE LEITE (*)

THEODÓSIO M. P. DA SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

A prova da redutase nos leites, é empregada com o fim de se obter aproximadamente o teor de germes vivos no produto em exame.

Foi estudada e posta em prática por Barthel e Orla Jensen. Atualmente é empregada principalmente nas análises bacteriológicas de leite. Com o auxílio desta prova é possível a obtenção de valiosos esclarecimentos sobre a riqueza em germes vivos presentes no produto em análise.

Essa prova consiste no descoramento, mais ou menos rápido, experimentado por uma solução de azul de metileno a 0,005 %. O descoramento mantém íntima interdependência com o número de germes vivos contidos no leite, ou no produto em análise. Quanto maior o número de bactérias e células vivas, menor o tempo gasto para o descoramento do reativo, isso porque um número maior de microorganismos vivos consome maior quantidade de oxigênio, à custa da redução do corante.

Como a prova da redutase é muito demorada, sendo necessário aguardar além de sete horas afim de comprovar as condições higiênicas do leite, procurou-se substituir o azul de metileno na prova da redutase, empregando o Resazurin por fornecer resultados muito mais rápidos. Os dados fornecidos com o emprego do Resazurin esclarecem a qualidade do leite em exame, tão bem quanto a prova com o azul metileno, sendo que, na Inglaterra, essa prova recebeu aprovação oficial. A redutase feita com o Resazurin, como foi verificado por nós, tem a vantagem de fornecer ao analista, em prazo de 60 minutos, os mesmos informes que se obtém com a solução de azul de metileno em 7 horas.

O Resazurin é sinônimo do Diazoresorcinol e tem como fórmula bruta $C_{12}H_7O_4N$.

(*) Trabalho aprovado pela Primeira Jornada Brasileira de Bromatologia, que recomendou a sua publicação.

Os vários autôres abaixo discriminados estudaram o valor da prova do Resazurin e pela leitura das conclusões dêstes trabalhos, é possível formar uma idéia do valor dessa prova, na classificação rápida da qualidade do leite em análise.

Assim, A. Ramsdell, Johnson¹, chegaram às seguintes conclusões: 1.º — É necessária sòmente 1 hora para completar a prova do Resazurin, enquanto a prova do azul de metileno requer um período de tempo acima de 5 horas. 2.º — Os leites podem ser classificados em 4 grupos, conforme a sua condição sanitária. 3.º — Leites de úberes doentes (mastites) e leites de vacas fisiològicamente anormais, tem efeito significativo na redução do Resazurin, e assim essa prova é de valor para esta verificação. 4.º — É possível obter consideráveis esclarecimentos sôbre a flora presente, observando as variações cromáticas que ocorrem durante o período de incubação na mistura leite-Resazurin.

Barret, Rutan e Keenan² observaram que: 1.º — Podem ser obtidos esclarecimentos sôbre a qualidade sanitária do leite, no período de 1 hora, com a prova do Resazurin, os quais são comparaveis aos obtidos em 7 horas, usando a prova do azul de metileno. 2.º — A prova do Resazurin tem grande valor, quando associada ao diagnóstico microscópico, diminuindo o tempo dispendido na determinação dos leites bons e permitindo desta maneira que se possam descobrir mais prontamente as causas de dúvida ou de dificuldade com relação aos leites ruins. 3.º — A prova do Resazurin é superior a do azul de metileno, porque é extremamente sensível nos leites anormais fisiològicamente ou patològicamente.

Warner³ verificou que a prova do Resazurin não oferece vantagens sôbre a prova azul do metileno, quando se toma como fim da reação o ponto branco, isto é, a redução completa.

Johns⁴ assim termina: quando a incubação a 37°C no leite resazurinado continúa até a côr rosa, a exatidão da prova compara-se muito favoravelmente à da prova feita com o azul de metileno.

Johns e Howson⁵ são de opinião que: o Resazurin é mais útil que o azul de metileno na determinação de leites contendo grande número de microorganismos, fracamente redutores.

Shacht e Nichols⁶, em seu relatório preliminar sôbre a prova do Resazurin, acham que: na rejeição dos rebanhos, em condições impróprias nas fazendas, a exatidão da prova Resazurin + coalho foi muito maior do que a obtida com as outras 4 provas usadas.

Golding e Jorgensen⁷ demonstraram que: 1.^o — Há estreita correlação entre os resultados do método *Standard* de contagem microbiana em placas e a prova do Resazurin. 2.^o — Os resultados obtidos com leites de várias procedências, são perfeitamente concordantes. 3.^o — Sob as condições citadas, a leitura em 60 minutos é a mais aconselhável e provavelmente a que fornece melhores resultados. 4.^o — Conhecendo a classe do leite, o produtor pode, por meio da prova do Resazurin, evidenciar a qualidade do mesmo.

E assim poderiam, ser ainda citados outros autôres, todos êles favoráveis à prova do Resazurin.

Baseados nas pesquisas citadas, resolvemos repetir essas verificações empregando a prova do Resazurin na Secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz, sob a orientação do Dr. Bruno Rangel Pestana, chefe da Subdivisão de Bromatologia e Química. Foram empregadas as técnicas seguintes:

TÉCNICAS

Para a prova da redutase com o azul de metileno, seguimos a técnica indicada pelo *Standard Methods for Milk Analysis* e para a do Resazurin, a que abaixo descrevemos:

Preparo da Solução de Resazurin. — 1.^o — Solução stock. — Pesar exatamente 0,05 g de Resazurin (Eastman Kodak Company) e transferir com os cuidados necessários, para um balão aferido de 100 ml, e completar com água destilada êsse volume. Depois de dissolvido o Resazurin, passar para outro balão de 150 ml e autoclavar a 120°C, 20 minutos. A solução empregada na prova é obtida fazendo a diluição de 1 ml dêsse soluto stock, em 9 ml de água destilada. Obtém-se assim um teor de 0,005% de Resazurin. Esta solução conserva-se muito bem.

Aparelhamento. — O material empregado consiste em um banho-maria regulável a 37°C, com estantes para os tubos de prova. Êstes tubos são calibrados e de 10 ml ou de 16 x 160 e tais tubos deverão ser previamente esterilizados e providos com rôlhas de borracha, afim de se fazer a inversão periódica cada 5 minutos.

Técnica. — Medir exatamente por meio de uma pipeta calibrada, 10 ml de leite e colocar no tubo calibrado ou tubo de 16 x 160; juntar, com os cuidados de assepsia, 1ml da solução de

Resazurin, colocando os tubos no banho-maria regulado a 37°C e anotar a hora. Fazer a inversão dos tubos de 5 em 5 minutos. A leitura da prova consiste nas mudanças de coloração do Resazurin em mistura com o leite, a medida que os microorganismos reduzem o corante, passando pelos seguintes tons:

1.º — Tom azul que significa ausência de alteração ou melhor, nenhuma redução sofrida pelo Resazurin.

2.º — Tom arroxeadado no início da redução, que em seguida passa ao roxo.

3.º — Tom rosa, que indica franca redução.

4.º — Tom branco, que significa o final da reação.

Essa mudança de tonalidade de côres é a principal característica informativa, pois é baseada nela que se avalia e se conclue sobre o valor e a qualidade do leite em exame.

O principal objetivo do nosso trabalho foi comparar a prova de 60 minutos de Resazurin com o tempo gasto na redutase pelo azul de metileno e depois confrontar as divergências observadas no resultado final.

Em 100 amostras por nós examinadas, empregamos as duas provas comparativamente, tendo verificado que a mudança de coloração dos leites resazurizados se processava em quase todos, num espaço de tempo que regulava em uma quarta parte do tempo necessário para a redução do azul de metileno. Em todos êsses leites foram feitos exames de contagem em placas, índice colimétrico e contagem pelo método de Breed, sendo anotados os leites em que a prova do azul de metileno se completou em menos de 4 horas. Assim, na verificação da qualidade do leite, pela prova do Resazurin, tomando-se como base o tempo de 1 hora para a conclusão, podemos classificá-lo da seguinte forma:

Nenhuma mudança de côr na solução de Resazurin	=	leite bom
Alteração da côr azul para roxa na solução do Resazurin	=	leite regular
Alteração da côr azul para rosa na solução do Resazurin	=	leite ruim
Alteração da côr azul para branca na solução do Resazurin	=	leite péssimo

Para fazer a classificação dos leites de pior qualidade, lêr as variações cromáticas dos tubos com leite resazurinado em espaço de tempo de 30 minutos, isto é, na metade da duração da prova, como acima foi dito, obedecendo-se ao mesmo critério, quanto à tonalidade das côres.

Segundo Schacht e Nichols, o critério a ser usado para a conclusão da prova e a classificação dos leites, poderá ser o seguinte:

1.º — Nenhuma mudança da côr azul original, depois de 1 hora de incubação = bom.

2.º — Nenhuma mudança da côr azul original, em 1/2 hora, porém mudança entre 1/2 e 1 hora = indiferente.

3.º — Mudança em menos de 1/2 hora da côr azul original para roxo, rosa ou branco — máu.

Essa conclusão, embora dê resultados satisfatórios, tem o inconveniente de necessitar o máximo da atenção do analista durante o período de incubação a 37°C. Segundo êsses autôres, a prova do Resazurin pôde ser feita com a adição de coalho à solução do corante, na proporção de 0,1 a 0,2 ml por 100, porém não notamos nos leites examinados, grandes vantagens na conclusão da prova, mesmo porque a solução do Resazurin + coalho, não se conserva por mais de uma hora. Julgamos pois, por economia de material, ser melhor para a análise a solução de Resazurin em água destilada, sem o coalho. A solução de Resazurin + coalho parece encurtar ligeiramente o tempo para a conclusão das provas.

RESULTADOS

As 100 amostras analisadas revelaram o seguinte:

Azul de metileno: 29 amostras reduziram em 30 minutos; 16 em 60 minutos; 8 em 90 minutos; 3 em 120; 4 em 150 minutos; 5 em 180; 5 em 210 minutos e 30 amostras reduziram acima de 4 horas de incubação.

Resazurin: Prova com 60 minutos de incubação: 38 amostras apresentaram o tom branco; 23 o tom rosa; 9 o tom roxo e 30 amostras a tonalidade azul original da solução do Resazurin.

Foram considerados péssimos, pela prova do azul de metileno, 56 leites, e pela prova do Resazurin 61. Com o azul de metileno, 14

leites foram considerados regulares, e 9 pelo Resazurin; 30 leites foram considerados bons por ambas as provas.

A avaliação revelou: 1.º — Com a prova do azul de metileno: que 56% dos leites eram ruins, que 14% eram regulares e que 30% eram bons; 2.º — Com a prova do Resazurin em 60 minutos: que 61% dos leites eram ruins, que 9% eram regulares e que 30% eram bons.

Por êsses resultados vemos que a prova do Resazurin fornece elementos para a classificação dos leites, pois nas 100 amostras analisadas, não houve sequer um resultado que não combinasse, muito aproximadamente com os resultados obtidos com o azul de metileno, considerando que para esta prova, foram regeitados como ruins 56 leites e tendo-se como base o tempo de redução inferior a 2 horas.

Quanto à prova do Resazurin, tomando-se como base a côr rosa para o tempo de 60 minutos, foram considerados péssimos ou ruins 61 leites. Trata-se de uma prova de fácil execução e largamente experimentada na Inglaterra e Estados Unidos e que têm sobretudo a grande vantagem de economizar tempo, pois a prova da redutase com o azul de metileno, embora seja uma prova de real valor, exige do analista observação por periodo dilatado, o que nem sempre é possível. Além do fator tempo, e o que é importante, o Resazurin é mais sensível nos leites oriundos de vacas anormais e possui maior sensibilidade frente aos microorganismos pouco redutores.

CONCLUSÕES E RESUMO

1.º) Empregando comparativamente o Resazurin e o azul de metileno na prova da redutase, foram examinadas 100 amostras de leite.

2.º) Com o emprêgo do Resazurin, foram encontrados os seguintes resultados: 61% de leites ruins, 9% regulares e 30% bons.

3.º) Com o emprêgo do azul de metileno os resultados foram os seguintes: 56% de leites ruins, 14% regulares e 30% bons.

4.º) O emprêgo do Resazurin como reativo na prova da redutase, torna-a muito mais rápida do que com o emprêgo do azul de metileno.

5.º) A prova do Resazurin é uma prova de fácil execução

6.º) O Resazurin é mais sensível aos microorganismos pouco redutores.

7.º) O emprêgo do Resazurin oferece maior facilidade na verificação do resultado, pois a mudança de coloração do Resazurin é mais evidente do que o limite do descoramento completo do azul de metileno.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — RAMSDELL, G. A. e JOHNSON, W. M. T. — 1935 — Investigations of Resazurin as an Indicator of the Sanitary Condition of Milk. *Journ. Dairy Sc.*, 18: 705.
- 2 — BARRET, W. D., RUTAN, H. e KEENAN, J. A. — 1937 — *Journ. Dairy Sc.*, 20:
- 3 — WARNER, J. N. — 1936 — The Use of Resazurin in Determining the Bacterial Quality of Milk and Cream. *Journ. Dairy Sc.* 21: 186.
- 4 — JOHNS, K. C. — 1939 — Place of the Methylene Blue and Resazurin Reduction Tests in a Milk Control Program. *A. Journ. Publ. Health.*, 3: 239.
- 5 — JOHNS, C. K. e HOWSON, R. K. — 1940 — Potentiometric, Studies with Resazurin and Methylene Blue in Milk. *Journ. Dairy Sc.*, 23: 295.
- 6 — SCHACHT, E. L. e NICHOLS, R. E. — 1941 — Studies of the Resazurin-Rennet Test — *Journ. Milk Technology*, 4: 281.
- 7 — GOLDING, N. S. e JORGENSEN, J. — 1945 — A Correlation of the Resazurin Grade with the Standard Plate Count of Raw Milk. *Journ. Milk Technology*, 8: 189.