

PESQUISA RÁPIDA, PRÁTICA E ESPECÍFICA DA PRESENÇA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO, NO LEITE "IN NATURA", PELA UTILIZAÇÃO DE TIRAS E FITAS REAGENTES ⁽¹⁾

QUICK, PRACTICAL AND SPECIFIC TEST TO DETECT HYDROGEN PEROXIDE IN MILK "IN NATURA" WITH THE USE OF REAGENT STRIPS AND TEST-TAPE

ALEXANDRE MELLO FILHO ⁽²⁾
LUÍS CELSO DE CASTRO ⁽³⁾

S U M M A R Y

During the investigation concerning new detection method for hydrogen peroxide, the authors attention was called by the possible use of reagent strips in the dairy field, — strips of the "dip and read" type, commonly used in clinical analysis: blood and urine chemistry.

Among these, the Ames Clinistix reagent strips, used to determine glucose in urine, has a reactive area with two enzymes. The gluco-oxidase that catalyzes the oxidation of the glucose realising the hydrogen peroxide wich is decomposed by the second enzyme — peroxidase, releases the oxygen that changes the color of this reactive area.

If the oxidation of the glucose in urina, caused by the gluco-oxidase, releases the hydrogen peroxide, as long as this substance has been added to milk, the chromogen reaction will occur immediately on the reactive area of the Clinistix reagent strip.

The authors obtained the expected result.

Knowing about Lilly test-tape, "Glico-fita", also used to detect glucose in urine, they thought that this one could be employd in the same way. And this really happened. Indeed it determined the presence of hydrogen peroxide added to the milk sample, also by chromogen raction.

Considering the possibility of reagent strips to replace classical methods, which emplov guaiac solutions or vanadium acid, pipettes, samplers and vials, the authors performed comparative researches of these methods in order to determine the sensitivity of the new methods in relation to the old ones.

INTRODUÇÃO

Nesta última década, marcada por grandes progressos científicos no campo da miniaturização, controle remoto e cibernética, a automatização e a eletrônica vêm invadindo os laboratórios de análises e pesquisas em todos os campos de atividade humana.

É natural, pois, que em laticínios surgissem as unidades auto-técnicas, capazes de realizar com perfeição, rapidez e alta precisão

um grande número de dosagens como a verificação em série do ponto de congelamento ou do teor graxo do leite, afastando a sempre presente possibilidade do erro de apreciação individual.

Entretanto, a par desses avanços, defronta-se o técnico em laticínios com o emprego de processos clássicos, como o da pesquisa da presença do peróxido de hidrogênio no leite pelo emprego da solução alcoólica de guaiacol a 1%,^{4,9} baseada no tradicional mé-

- (1) Trabalho realizado na Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Apresentado em caráter de nota preliminar na "22.ª Semana do Laticinista", realizada no Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, Minas Gerais, de 12 a 16 de julho de 1971.
- (2) Da Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Da Clínica Dermato-sifilográfica do Hospital Municipal de São Paulo.
- (3) Da Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

todo de DUPOY⁹, que põe em evidência a oxidação do guaiaicol que, em presença do sistema peróxido-peroxidase, se transforma em guaiacoquinona, comunicando ao leite uma nítida coloração vermelho-salmão.

Tais processos, como muitos outros utilizados em laticínios^{1, 10}, não prescindem do uso de pipetas, tubos de ensaio, etc. -

É, pois, compreensível que, investigando novos métodos de pesquisa, nos Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, nossa atenção se voltasse para a possível utilização em laticínios do valioso recurso representado pelo emprêgo, em análises clínicas, em medicina, das tiras reagentes do tipo conhecido como *mergulhe e lêia*, utilizadas principalmente na verificação das alterações físico-químicas do sangue e urina.

Dessas tiras, chamou-nos a atenção em especial a Clinistix (Anes Company), destinada à verificação rápida (10 seg.) da presença da glicose na urina e baseada em duas enzimáticas.

A tira reagente Clinistix consiste em tira de matéria plástica transparente com área reagente rósea em uma das extremidades. Essa área reagente contém duas enzimas, a *glico-oxidase* que, na presença da glicose na urina, catalisa a oxidação desse açúcar para formar ácido glicônico e o peróxido de hidrogênio e a *peroxidase* que, na presença de peróxido de hidrogênio recém-formado, determina a liberação do oxigênio nascente o qual, produzindo mudança de coloração da área reagente, faz passar a cor rosada para a violeta ou azul escuro.

Se a oxidação da glicose contida na urina forma o peróxido de hidrogênio é evidente que, se o mesmo já estiver presente, como no caso da sua colocação no leite, a reação cromogênica se estabelecerá imediatamente.

Aplicando tal dedução, adicionamos o peróxido de hidrogênio ao leite líquido e, mergulhando nele a parte reagente da tira Clinistix, obtivemos de fato a sua rápida e nítida mudança de coloração.

Nessas circunstâncias, sabendo da existência de fita diagnóstica elaborada pela Lilly Company, Glico-fita, também destinada à verificação rápida da presença de glicose na urina, suspeitamos de que a mesma funcionasse por mecanismo semelhante. E, ex-

perimentando-a, obtivemos, no caso da presença do peróxido de hidrogênio adicionado ao leite, resultado positivo pela mudança da coloração da referida fita que, do amarelo, passou a verde claro.

MATERIAL E MÉTODOS

Tiras reagentes Clinistix

No caso da verificação da presença do peróxido de hidrogênio no leite, mergulhamos a área de teste da tira reagente na amostra do leite em questão. A mudança rápida da coloração rósea, que passou à violeta ou azul-escuro, foi indicio da presença positiva do peróxido (Fig. 1, 2, 3).

Nas plataformas de recepção do leite, este exame pode ser feito seriado, mergulhando a parte reagente da tira no leite contido no próprio latão, (num máximo, 10 verificações por tira), pois a mesma é atóxica.

Por media de economia, embora tal fato venha dificultar bastante a leitura colorimétrica do resultado, a tira poderá ser dividida longitudinalmente em duas metades iguais, desde que seja para uso imediato.

Fitas diagnósticas Glico-fita

No momento do exame, na verificação da eventual presença do peróxido de hidrogênio no leite, destacamos cerca de 3 cm de fita e mergulhamos no leite problema. Após 10 a 20 segundos, em caso positivo, a coloração da fita passou do amarelo para a tonalidade nitidamente esverdeada (Fig. 4).

Levando em conta a possibilidade de serem as tiras ou fitas a substituir os métodos correntes que empregam soluções de guaiaicol ou ácido vanádico, tornou-se necessário saber qual a sensibilidade do novo processo em relação àqueles.

Para isso resolvemos adicionar ao leite padrão quantidades conhecidas de peróxido de hidrogênio e estudar o comportamento diagnóstico da tira e da fita reagente em relação ao emprêgo da solução alcoólica de guaiaicol a 1%^{4, 9} e do método de Arnold e Mentzel^{1, 10}.

A duas amostras do mesmo leite, em estado de cru, considerado padrão, veiculando flora bacteriana avaliada em 18 milhões de

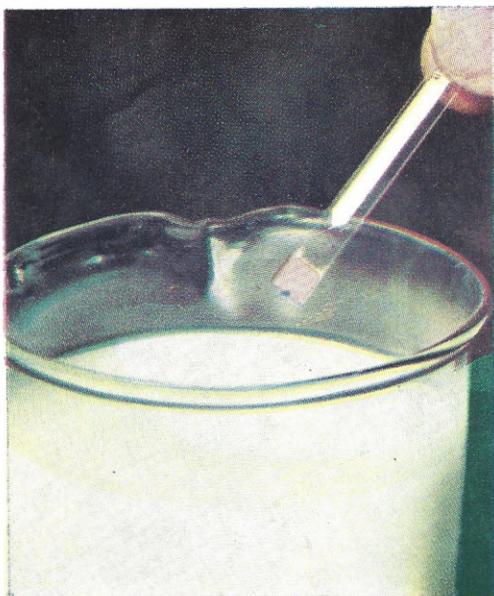


Fig. 1 — Tira "Clinistix" mostrando área reagente rósea, índice da ausência do peróxido de hidrogênio no leite testado.

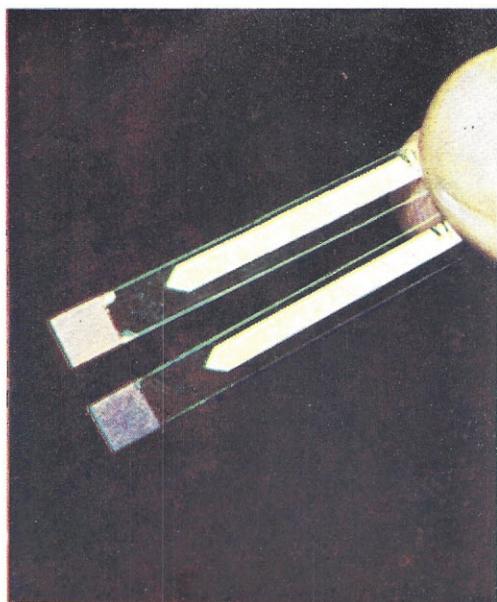


Fig. 3 — Aspecto comparativo das tiras "Clinistix", com área reagente rósea e azul, índices respectivamente, da ausência e presença do peróxido de hiprogênio acrescentado ao leite.

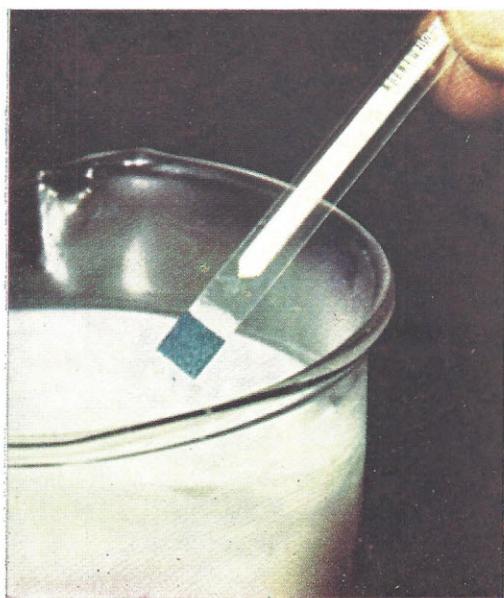


Fig. 2 — Tira "Clinistix" mostrando área reagente azul, índice específico positivo para a presença do peróxido de hidrogênio na amostra de leite examinada.

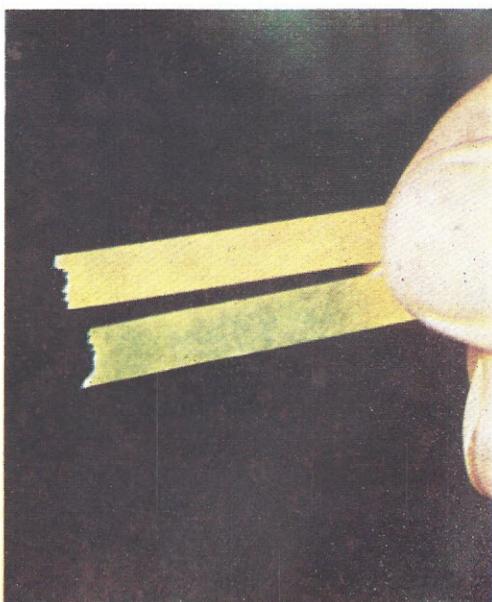


Fig. 4 — Aspecto comparativo entre a fita "Glico-fita", com coloração amarela inicial, inalterada, indicio da ausência do peróxido no leite e com a coloração esverdeada, indicando no presente caso, especificamente, a presença positiva daquele antisséptico conservador.

germes por ml, acrescentamos o peróxido de hidrogênio (30%, 120 vol., U.S.A. Baker), na razão respectivamente de 1 e 2/1.000, sendo as mesmas a seguir divididas em duas porções que foram conservadas frigorificadas (+ 5°C), ou mantidas em meio ambiente.

A cada hora era testada a presença do peróxido de hidrogênio pelos métodos que utilizavam a solução de guaiacol ou ácido vanádico e pelo processo que emprega a tira reagente ou a fita diagnóstica.

Estas verificações foram levadas a efeito até a obtenção de resultados negativos nos dois grupos de amostras, quer para frigorificadas (+ 5°C), como para as conservadas em meio ambiente.

A seguir, fomos ao interior de S. Paulo e, nas plataformas de recepção do leite, passamos ao exame seriado, em grande escala e rápida verificação do produto acondicionado em latões, à medida que os mesmos iam chegando, transportados em grande ou pequeno número, pela mais diversa modalidade, desde os grandes caminhões até as pequenas viaturas de tração animal.

RESULTADOS

Na amostra do leite conservado em ambiente e ao qual se acrescentou 1‰ de peróxido de hidrogênio, foi o referido conservador antisséptico passível de determinação até 4 horas da sua colocação, quer pelos métodos que empregaram as soluções de guaiacol e ácido vanádico, quer pelos que se utilizaram da tira e da fita.

Para a mesma amostra frigorificada (+ 5°C), a presença determinável do peróxido foi um pouco mais longa, alcançando até 5 horas da sua colocação e acusada igualmente pelos dois grupos de processos analíticos postos em confronto.

Com o leite padrão veiculando 2‰ de peróxido de hidrogênio, o resultado foi semelhante, apenas o tempo de permanência determinável do peróxido aumentou, passando respectivamente para 5 horas na amostra em ambiente e 6 horas na frigorificada.

Ainda neste caso houve identidade na capacidade determinadora das soluções e da tira e fita reagentes, isto é, após o período de positividade máxima de 5 e 6 horas, tanto os métodos clássicos como os propostos fa-

lharam na evidenciação da presença decrescente do peróxido de hidrogênio que passou a ser sub-determinável incógnita.

No interior de São Paulo, nas plataformas de recepção dos entrepostos-usinas, em dias diversos e em regiões diferentes, foram submetidos a testes da eventual presença do peróxido de hidrogênio 600 amostras de leite coletadas em tubos de ensaio para a realização das provas que se utilizaram da solução de guaiacol ou ácido vanádico, ou examinadas diretamente nos latões, à medida que chegavam, quando da utilização das tiras ou fitas diagnósticas.

Tôdas essas amostras apresentam negatividade para a presença do peróxido de hidrogênio, para ambos os tipos de exames executados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As pesquisas comparativas efetuadas no laboratório, visando estabelecer a sensibilidade da tira reagente e da fita diagnóstica em relação às provas que empregam o guaiacol e o ácido vanádico, na determinação da presença do peróxido de hidrogênio colocado no leite, vieram demonstrar que êsses métodos se equivaleram.

A tira e a fita, por possuírem a enzima peroxidase, foram capazes, em igualdade de condições com o reativo de Arnold e Mentzel^{1,10}, de evidenciar a presença do peróxido de hidrogênio quando adicionado ao leite fervido, o que obviamente não aconteceu com o método do guaiacol^{3,9}, por se basear a sua reação na presença da peroxidase do leite.

Conforme ficou demonstrado, as tiras reagentes e as fitas foram capazes de, com boa especificidade, substituir aqueles métodos de uso tradicional, com a vantagem de serem portáteis, utilizáveis para exame do produto no próprio latão e no caso da tira em especial, reutilizável quando do emprêgo imediato seriado, por ser uma haste rígida, o que constitui considerável economia do material empregado.

Nessas condições, tivemos a oportunidade de apresentar o achado, que acreditamos seja pela primeira vez de âmbito mundial.

E como consideração final, queremos acentuar que o fato de, no interior, nas plata-

formas de recepção do leite, em 600 verificações não termos, quer pelos métodos clássicos ou pelos propostos, evidenciado a presença do peróxido de hidrogênio, o sucedido não indica a real ausência do peróxido e apenas que essa substância não foi passível de determinação caso estivesse presente e colocada há mais de 5 ou 6 horas da chegada do leite àquêles entrepostos-usinas.

Após êsse período de tempo, o peróxido de hidrogênio só pode ser evidenciado por processos especiais de investigação^{4, 5}.

RESUMO

Investigando novos métodos de pesquisa, a atenção dos autores se voltou para a possível utilização, em laticínios, das tiras reagentes do tipo *mergulhe e lêia*, utilizadas, em análises clínicas, para as verificações das alterações físico-químicas do sangue e urina.

Dessas, a tira reagente Clinistix, utilizada na determinação da presença de glicose na urina, mostrou ter área reagente contendo dois enzimas. A glico-oxidase que catalisa a oxidação da glicose com liberação do peróxido de hidrogênio que, descomposto pela segunda enzima, a peroxidase, libera o oxigênio que faz mudar a cor dessa área reagente, dando noção colorimétrica do processo.

Se a oxidação da glicose na urina, produzida pela glico-oxidase, libera o peróxido de hidrogênio, no caso de o mesmo ter sido adicionado ao leite, a reação cromógena da área reativa da fita poderá se processar imediatamente.

E foi o que aconteceu.

Sabendo da existência da Glico-fita, também para a pesquisa da glicose na urina, julgamos que a mesma pudesse funcionar em base semelhante ao já visto, e de fato a mesma acusou a presença do peróxido de hidrogênio acrescentando ao leite de prova, também por mudança colorimétrica.

Levando em conta a possibilidade de viem as tiras reagentes e as fitas diagnósticas a substituir os métodos clássicos que empregam soluções de guaiacol ou ácido vanádico, e além disso pipetas, tubos de ensaio e frascos acondicionadores, fizeram os autores pesquisas comparativas entre esses métodos, para

saber a sensibilidade dos novos processos em relação àquêles.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Standard methods for the examination of dairy products*. 12 ed. New York, A.P.A.H., 1967.
2. BRASIL. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. (Aprovado pelo Decreto 30.691 de março de 1952). Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1952.
3. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — *Normas de qualidade para alimentos*. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1967. v. 1. (Mimlogr.).
4. MELLO FILHO, A.; CASTRO, L. C. — Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e bioquímicos. Peróxido de hidrogênio como conservador. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:85-103, 1969/70.
5. MELLO FILHO, A. — Utilização da água oxigenada no tratamento do leite cru destinado ao consumo. [Apresentada à 22.ª Semana do Laticinista, Juiz de Fora, jul. 1970.]
6. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Inibidores bacterianos no leite em consumo da Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 25/27:69-94, 1965/67.
7. ORGANISATION MONDIALE DE LA SALUD — Higiene de la leche. Higiene de la producción, la elaboración de la leche. FAO/OMS, Ginebra, 1966. Sér. monogr. 48.
8. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE — Comité mixte FAO/OMS d'ex perts de l'hygiène du lait. Premier rapport. Genève, O.M.S., 196). Sér. Rapp. Techn. 197.
9. PIEN, J.; DESIRENT, J. & LAFONTAINE, D. — Le recherche de l'eau oxygenée dans le lait. *Le lait*, 34:133-45, 1954.
10. ROSSEL, J. M.; SANTOS, I. — *Métodos analíticos de laboratorio lactológico y microbiológico de las industrias lacteas*. Barcelona, Labor, 1952. v. 1.
11. SELTZER, H. S. & LOVEALL, M. J. — Improved accuracy of test-tape in estimating concentrations of urinary glucose. *J. Amer. Med. Ass.*, 167(15):1826-30, 1958.

