

NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM LEITE EMPREGANDO BIOCSENSOR ELETROQUÍMICO

Vitor Paulo Andrade da SILVA, Universidade Estadual do Ceará. Departamento de Química. Aluno de Iniciação Científica. E-mail: vitorvolt@hotmail.com, Rianne Santos de OLIVEIRA, Universidade Estadual do Ceará. Departamento de Química. Aluno de Iniciação Científica. Roselayne Ferro FURTADO, Embrapa Agroindústria Tropical. Pesquisadora da área de nanotecnologia de alimentos. E-mail: roselayne@cnpat.embrapa.br, Carlucio Roberto Alves, Maria do Socorro Rocha BASTOS, Embrapa Agroindústria Tropical. Pesquisadora da área de alimentos. E-mail: sbastos@cnpat.embrapa.br

RESUMO

A ingestão de peróxido de hidrogênio provoca problemas a saúde humana sendo essa a razão para a legislação vigente proibir o uso dessa substância como conservante em leite. Este trabalho teve o objetivo de desenvolver um novo método para detecção de peróxido de hidrogênio em leite utilizando eletrodos impressos e técnica eletroquímica. Os eletrodos impressos foram elaborados a partir de tinta de carbono Eletrodag® depositadas sobre lâminas de acetato pelo método de "casting". Enzima peroxidase de horseradish foi imobilizada sobre os eletrodos descartáveis utilizando solução de glutaraldeído a 2,5%. As medidas eletroquímicas foram realizadas em Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT302N. Amostras de leite longa vida integral comercial foram empregadas no presente experimento. No intuito de estudar o comportamento do sistema eletroquímico na presença de peróxido de hidrogênio foram preparadas diluições, a partir solução estoque, de 5, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120 e 140 μM em solução tampão fosfato pH 6,5 e em amostras de leite sem diluição e com diluição de 1:10 e 1:1000. Considerando a menor diluição do leite avaliada, o limite de detecção do biossensor foi de 14 ppb e o de quantificação foi de 46 ppb. Os resultados alcançados são promissores quando comparados a outros métodos indicados na análise do leite, mostrando ser o biossensor uma alternativa sensível e de baixo custo na detecção de peróxido de hidrogênio em amostras adulteradas de leite longa vida integral.

PALAVRAS CHAVE: biossensor, peróxido de hidrogênio, leite.

METODOLOGIA

Elaboração dos eletrodos

Os eletrodos impressos (EI's) foram elaborados depositando-se a tinta condutora de carbono Eletrodag® sobre a superfície de folha de acetato pelo método de "casting". A secagem da tinta foi realizada em estufa com circulação de ar a 80°C durante uma hora (SILVA et al., 2009).

Após secagem, os EI's foram submetidos a uma série de dez ciclos em voltametria cíclica com potenciais de inversão de -600 mV e +600 mV a 100 mV s^{-1} em tampão fosfato pH 6,5 para a limpeza da superfície eletródica.

Preparação do biossensor

Os EI's foram imersos durante uma hora em solução de glutaraldeído 2,5% e posteriormente, imersos por uma hora em solução de enzima peroxidase de horseradish (HRP) 1 mg mL^{-1} . Ao final de cada procedimento os EI's foram lavados com água deionizada (Figura 1).

Estudos eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT302N em célula de vidro de 10 mL. Foram utilizados eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl saturado com KCl 3 M. As soluções foram purgadas com

nitrogênio por 15 minutos antes de cada ensaio de cronoamperometria ($E_{apl} = -250$ mV e $t = 120$ s).

Validação do biossensor

Amostras de leite longa vida integral comercial foram empregadas no presente experimento. Adicionaram-se diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio: 5, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120 e 140 μ M em solução tampão fosfato pH 6,5, e em amostras de leite sem diluição e com diluição de 1:10 e 1:1000. Após a realização das leituras, os dados foram analisados para determinação da curva analítica do biossensor. Cada curva analítica foi elaborada considerando três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ingestão de peróxido de hidrogênio provoca problemas a saúde humana, sendo essa a razão para a legislação vigente proibir o uso desta substância como conservante. A ingestão de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio em solução a 3% resulta em moderado efeito gastrointestinal. A ingestão de soluções com concentração igual ou superior a 10% ou grandes quantidades de soluções a 3% tem sido associada com morbidade e mortalidade severa. Considerando ainda concentrações acima de 10%, podem ocorrer irritação do trato gastrointestinal com náusea, vômito, hematose, além de dano neurológico imediato e permanente em altas concentrações (WATT, et al., 2004). A adição de peróxido de hidrogênio ao leite se reporta ao seu efeito antibacteriano e sua função de dissimulação das más condições higiênico-sanitárias de obtenção, conservação e/ou transporte do leite. Em contato com o leite, a degradação do peróxido de hidrogênio promove a oxidação da espécie química tiocianato (componente natural do leite) em outra espécie denominada hipotiocianato que tem efeito antibacteriano, principalmente em bactérias gram-positivas (AUNE;THOMAS, 1977). Neste sentido, a adoção dessa prática por produtores objetiva o prolongamento da vida útil do leite por eliminar bactérias deterioradoras deste produto. No Brasil casos de adulteração do leite com peróxido de hidrogênio foram relatados na mídia após inspeções realizadas por órgãos competentes em cooperativas de produtores de leite, despertando a atenção da população para este problema de saúde pública. Atualmente, os métodos para determinação de peróxido de hidrogênio em leite adulterado são: método de quantificação de tetracloreto de titânio com limite de detecção de 200 ppm (SILVA, 2004) e o recomendado pela ANVISA método empregando o permanganato de potássio com limite de detecção até 300 ppm. Ainda, com o desenvolvimento de novos métodos de análise de contaminantes biológicos e químicos em alimentos, inclusive utilizando ferramentas da nanotecnologia, novos métodos para detecção de peróxido de hidrogênio em leite e derivados lácteos podem ser propostos visando aumentar a sensibilidade na detecção desta substância. Os biossensores são dispositivos que empregam moléculas biológicas como moléculas sensoras imobilizadas sobre plataformas eletrônicas na detecção de analitos específicos. Esses dispositivos têm ganhado destaque pela alta sensibilidade e especificidade demonstrada para fins alimentícios, ambientais e na área médica (HU, et al., 2009; LI et al., 2010; LOMILLO et al., 2010). No presente trabalho foi desenvolvido um biossensor para detecção de peróxido de hidrogênio em leite utilizando eletrodos descartáveis de baixo custo. O desempenho do biossensor foi avaliado em amostras de tampão contendo peróxido de hidrogênio e em amostras de leite adulterado previamente no laboratório com peróxido de hidrogênio, no intuito de melhor estabelecer comparações entre o funcionamento do mesmo em condições experimentais e práticas. A Figura 2 indica a resposta do biossensor para as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 6,5, amostras de leite diluídas na proporção de 1:10 e 1:1000, e em leite não diluído. Como observado, houve maiores variações de corrente catódica à medida que se diluiu as amostras de leite, ao ponto que a sensibilidade na diluição de 1:1000 assemelhou-se à obtida em tampão fosfato, onde os coeficientes angulares das curvas analíticas foram 0,0135 (Figura 3) e 0,0132 (Figura 4), respectivamente. Em amostras de leite diluídas 1:10 o biossensor apresentou curva analítica também bastante satisfatória (Figura 5). No entanto, em amostras de leite não diluídas em virtude da grande presença de analitos interferentes no leite (ácidos graxos, proteínas, vitaminas e outros) o biossensor não apresentou uma boa linearidade com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio não sendo possível quantificar a substância adicionada ao produto. Considerando a menor

diluição do leite avaliada o limite de detecção do biossensor foi de 14 ppb e o de quantificação 46 ppb. Este resultado é bastante promissor quando comparado a outros testes analíticos indicados para a detecção de peróxido de hidrogênio em leite que trabalham com sensibilidade de 300 ppm (ANVISA, 2010).

CONCLUSÃO

A sensibilidade do biossensor para detecção de peróxido de hidrogênio foi bastante satisfatória para detecção da substância quando comparada a outros métodos recomendados. Outros ensaios serão realizados no intuito de definir a melhor diluição do leite para análise.

Referências e Anexos (Tabelas e Figuras)

ANVISA. **Informe Técnico - nº 34 de 31 de outubro de 2007**. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/informes/34_311007.htm>. Acesso em 20 de janeiro de 2010.

AUNE, T.M.; THOMAS, E.L. Accumulation of hypothiocyanate ion during peroxidase catalysed , p.oxidation of thiocyanate ion. **European Journal of Biochemistry**. v.88, p.209-214.1977.

SILVA, P.H.F. Efeito do peróxido de hidrogênio adicionado ao leite nos postos de resfriamento. Parte I. avaliação físico-química. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, v.290, p.28-34. 1994.

WATT, B.E.; PROUDFOOT A.T ; VALE J. A. Hydrogen peroxide poisoning. **Toxicological reviews**, v.23, n.1, p.51-67. 2004.

LOMILLO, A.M.A.; RENEDO, O.D.; GONÇALVES, L.F.; MARTÍNEZ,J.A. Sensitive enzyme-biosensor based on screen printed electrodes for Ochratoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v.15, n.6, p.1333-1337. 2010.

LI, Y.S.; DU, Y.D.; CHEN, T.M.; GAO, X.F. Novel immobilization multienzyme glucose fluorescence capillary biosensor. **Biosensor and Bioelectronics**, v.25, n.6, p.1382-1388. 2010.

HU, C.; GAN, N.; CHEN, Y., BIC, L.; ZHANG, X.; SONG, L. Detection of microcystins in environmental samples using surface Plasmon resonance biosensor. **Talanta**, v.80, p.407-410. 2009.

① Elaboração dos EI's

Deposição da tinta de carbono Elettrodag[®] pelo método de "casting".



A = 0,785 cm²

Esquema do EI com sua área geométrica.

↓ Cura em estufa
80°C, 1h

② Imersão do EI em solução de glutaraldeído 2,5%

↓ 1h
Enxágue com H₂O dest.

③ Imersão em solução de peroxidase 1 mg mL⁻¹

Figura 1 – Esquema da elaboração do biossensor.

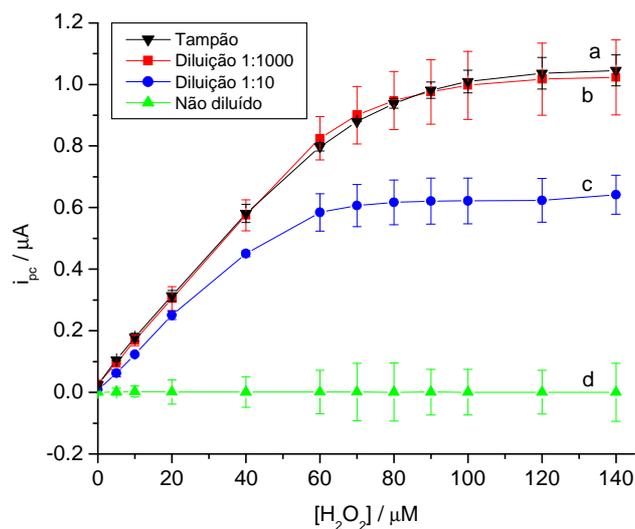


Figura 2- Resposta do biossensor para $[H_2O_2] = 0, 5, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120$ e $140 \mu M$ em tampão fosfato pH 6,5 (a), leite diluído 1:1000 (b), leite diluído 1:10 (c) e leite (d).

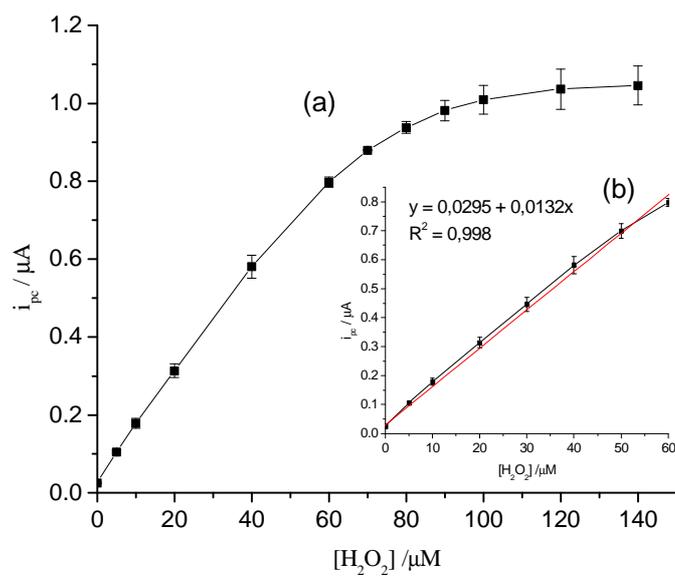


Figura 3- Curva de saturação (a) e curva analítica (b) do biossensor para peróxido de hidrogênio adicionado a solução de tampão fosfato pH 6,5.

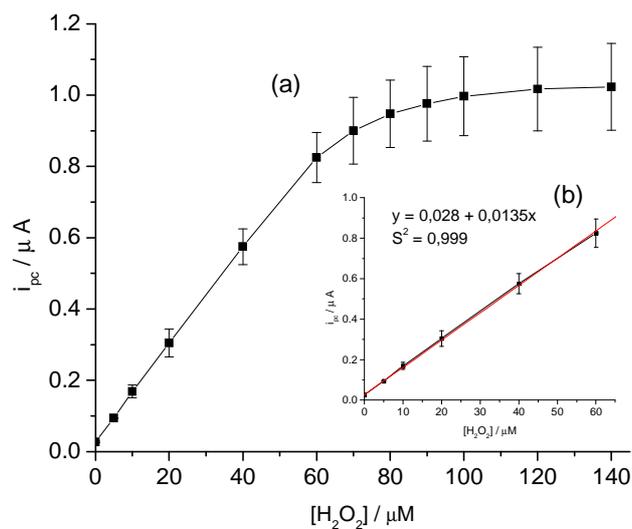


Figura 4 - Curva de saturação (a) e curva analítica (b) do biossensor para peróxido de hidrogênio adicionado a amostra de leite diluída 1:1000.

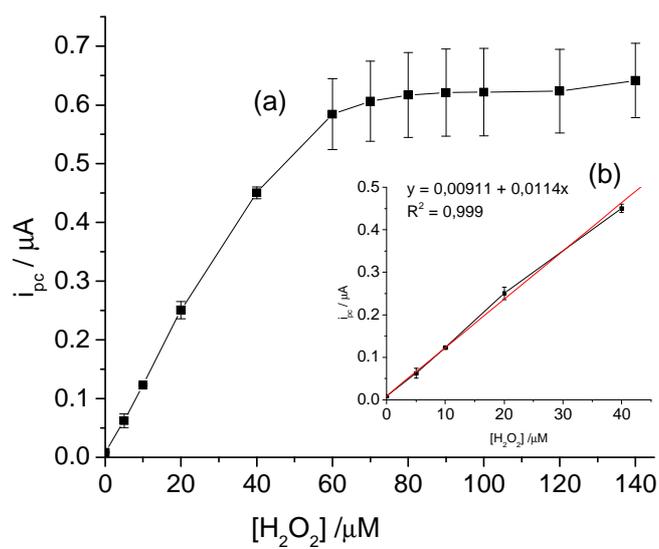


Figura 5- Curva de saturação (a) e curva analítica (b) do biossensor para peróxido de hidrogênio adicionado a amostra de leite diluída 1:10.