

DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE DOPAMINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM EXTRATO BRUTO DE ABACATE (*Persea americana*)

Karina Omuro Lupetti, Luiz Antônio Ramos e Orlando Fatibello-Filho*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos - SP

Recebido em 16/4/02; aceite em 4/9/02

ENZYMATIC DETERMINATION OF DOPAMINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS USING A FLOW INJECTION ANALYSIS SYSTEM WITH AVOCADO (*Persea americana*) CRUDE EXTRACT. In this work, a spectrophotometric flow injection analysis system using a crude extract of avocado (*Persea americana*) as a source of polyphenol oxidase to dopamine determination was developed. The substrates and enzyme concentrations from 2.4×10^{-7} to 5.3×10^{-4} mol L⁻¹ and 28 to 332 units mL⁻¹ were evaluated, respectively. In addition, the FIA parameters such as sample loop (50 to 500 μ L), flow rate (1.4 to 4.3 mL min⁻¹) and reactor length (100 to 500 cm) were also evaluated in a 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0). Dopamine solution concentrations were determined using 277 units mL⁻¹ enzyme solution, 400 mL enzyme loop, 375 μ L sample loop, 2.2 mL min⁻¹ flow rate and a reactor of 350 cm. The analytical curve showed a linearity from 5.3×10^{-5} to 5.3×10^{-4} mol L⁻¹ dopamine with a detection limit of 1.3×10^{-5} mol L⁻¹. The analytical frequency was 46 h⁻¹ and the RSD lower than 0.5% for 5.3×10^{-4} mol L⁻¹ dopamine solution (n=10). A paired t-test showed that all results obtained for dopamine in commercial formulations using the proposed flow injection procedure and a spectrophotometric procedure agree at the 95% confidence level.

Keywords: dopamine; flow injection analysis; crude extract.

INTRODUÇÃO

As enzimas são, em sua grande maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações metabólicas sob diversas condições de pH, temperatura, meio iônico, entre outros¹⁻⁵.

Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinado substrato. Este centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e de um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima¹⁻⁵.

Algumas enzimas dependem somente de sua estrutura protéica para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas coenzimas. Algumas enzimas dependem de ambos. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado haloenzima¹⁻⁵.

A enzima polifenol oxidase (PFO: E.C. 1.14.18.1) presente em grande quantidade em cogumelos, que na presença de oxigênio molecular causa oxidação de certos compostos, foi descoberta em 1895 por Bourquelot e Bertrand¹. Ela é também chamada tirosinase, catecolase ou catecol oxidase e catalisa a oxidação tanto de monofenóis (e.g. tirosina, fenol, etc.) como difenóis (e.g. catecol, L-dopa, dopamina, adrenalina, etc.).

A PFO está presente em algumas bactérias e fungos, na maioria das plantas, em alguns artrópodes e mamíferos. Em todos estes casos, a enzima está associada com a pigmentação escura do organismo. Ela está presente, em concentrações altas, em cogumelo, batata, pêssigo, maçã, banana, manga, abacate, folhas de chá e café⁶.

A massa molar para as diferentes PFOs varia de 57 a 62 kDa, com exceção da PFO do cogumelo que apresenta 128 kDa, possuindo duas cadeias maiores com 43-45 kDa cada uma, onde estão os

sítios catalíticos, e duas menores com 13 kDa cada uma⁶. A enzima apresenta-se como um complexo binuclear com dois átomos de Cu(II) no seu centro ativo, como apresentado no mecanismo proposto de oxidação de dopamina da Figura 1. A formação da dopaminaquinona depende tanto da concentração do oxigênio como da concentração da enzima⁷. Uma vez formada, a dopaminaquinona pode sofrer polimerização, levando à formação de melaninas.

A dopamina é um neurotransmissor central, precursor metabólico da noradrenalina e da adrenalina, que atua em receptores especí-

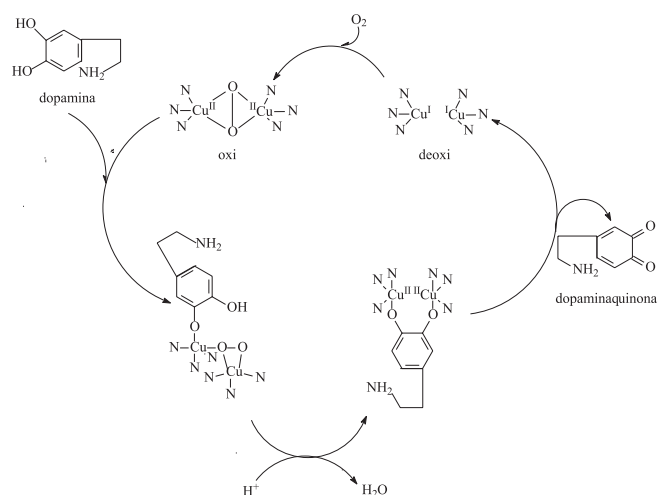


Figura 1. Mecanismo proposto de oxidação de dopamina pela enzima polifenol oxidase na presença de O₂, adaptado da ref. 7. O sítio ativo da PFO apresenta Cu (I) na forma deoxi. Na presença de O₂, ocorre a formação da espécie oxi, que catalisa a oxidação da dopamina, gerando a dopaminaquinona e regenerando a forma deoxi da PFO

*e-mail: bello@dq.ufscar.br

ficos, presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos, renais e nas coronárias. É utilizada para o tratamento de diversos tipos de choque e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos renais e aumentando dessa forma o fluxo de sangue⁸. No Brasil, a dopamina é comercializada em forma de ampolas de 5 mg mL⁻¹.

Diversas metodologias podem ser encontradas na literatura para determinação desse analito, dentre estas destacam-se os procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica⁹⁻¹¹, amperométrica¹²⁻¹⁷ e por quimiluminescência¹⁸⁻²⁰. Ortega e Dominguez⁹ empregaram tirosinase imobilizada em reatores para determinação de dopamina por análise em fluxo com detecção espectrofotométrica e eletroquímica, apresentando limites de detecção de 3,5x10⁻⁶ mol L⁻¹ e 8,4x10⁻⁶ mol L⁻¹, respectivamente. Nevado e colaboradores¹⁰ empregaram solução de metaperiodato em fluxo para detecção espectrofotométrica dessa catecolamina. O sistema apresentou um limite de detecção de 2,5x10⁻⁶ mol L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 130 determinações por hora. Uchiyama e Suzuki¹² utilizaram extrato de folhas de espinafre como fonte de polifenol oxidase para a determinação amperométrica de dopamina. No entanto, 5 min de espera eram necessários para o retorno à linha base e início de nova injeção da solução de amostra. A linearidade do sistema em fluxo foi de 1,0x10⁻⁴ a 6,0x10⁻³ mol L⁻¹. Montenegro e Sales¹⁵ empregaram um eletrodo seletivo a IO₄⁻ para a determinação potenciométrica de dopamina, obtendo-se uma linearidade no intervalo de concentração desse analito de 8,0x10⁻³ a 2,7x10⁻¹ g L⁻¹ (4,2x10⁻⁵ a 1,4x10⁻³ mol L⁻¹). Lima *et al.*¹⁶ desenvolveram eletrodos de carbono vítreo e pasta de carbono modificados com tecido vegetal de palmeira (*Latania sp.*), como fonte enzimática para a determinação eletroquímica dessa catecolamina. O sistema em fluxo apresentou linearidade entre 5,0x10⁻⁶ a 7,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ de dopamina. Wang e Walcarius¹⁷ construíram eletrodos de pasta de carbono modificados com zeólitas para a determinação amperométrica desse fármaco. O sistema apresentou linearidade entre 2,0x10⁻⁵ a 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ com um tempo de residência de 45 s para pré-concentração em fluxo. Nozaki e colaboradores¹⁸ determinaram dopamina por meio da geração de peróxido de hidrogênio durante 30 min e detecção quimiluminescente do mesmo, na reação com peroxidase e luminol. O limite de detecção obtido foi de 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, com um desvio padrão relativo de 4,7% (n=5). Huang e colaboradores¹⁹ empregaram a inibição pela dopamina da propriedade quimiluminescente do sistema luminol-hipoclorito, obtendo um limite de detecção de 0,6 µg L⁻¹ (3,2x10⁻⁹ mol L⁻¹).

Desenvolveu-se nesse trabalho um sistema de análise por injeção em fluxo por zonas coalescentes para a determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas. Nesse procedimento, a enzima polifenol oxidase obtida do extrato bruto de abacate oxidou a dopamina à dopaminaquinona, que foi monitorada espectrofotometricamente em 466 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos

O abacate, fonte da enzima polifenol oxidase, foi homogeneizado em um liquidificador Walita, modelo Firenze RI6755. Usou-se na centrifugação desse material biológico, uma centrífuga Du Pont Instrumentos Sorvall, modelo RC-5B, provida de um rotor modelo SS-34 com diâmetro de 23 cm.

As medidas espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro Femto, modelo 434 com uma célula de fluxo de vidro (caminho óptico de 1,00 cm) conectada a um registrador Cole Parmer (Niles, IL, USA), modelo 12020000 de dois canais. Para propulsão das soluções de referência, reagentes e amostras utilizou-se uma

bomba peristáltica Ismatec (Zurich, Switzerland), modelo 7618-40 e tubos de extensão de Tygon de 0,8 mm de diâmetro interno. As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema FIA, utilizando-se um injetor-comutador manual desenvolvido no CENA-USP, Piracicaba.

Reagentes e soluções

Para a determinação de dopamina em fluxo, preparou-se uma solução estoque de dopamina (Sigma) dissolvendo-se 0,0102 g desse reagente em um balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Obtenção do extrato bruto de abacate

Para obtenção do extrato bruto de abacate (*Persea americana*), fonte de polifenol oxidase, o seguinte procedimento foi adotado: uma massa de 25,0 g de polpa de abacate foi homogeneizada com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e 2,5 g de agente protetor Polyclar Super R, em um liquidificador, durante 3 min. O homogenato foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a 15000 rpm durante 30 min, a 4 °C. A solução sobrenadante foi dividida em diversas alíquotas, armazenadas em refrigerador a 4 °C e usadas como fonte enzimática^{20,21}.

Determinação de proteína total e atividade enzimática da PFO

O teor de proteína total da solução sobrenadante foi determinado pelo método do biureto, empregando-se albumina de soro bovino como padrão²².

A atividade da polifenol oxidase foi determinada medindo-se a variação de absorbância ($\lambda = 410$ nm) da quinona formada na reação enzimática. Nessa determinação foram usados 2,8 mL de solução de catecol 0,05 mol L⁻¹ e 0,2 mL da solução sobrenadante (homogenato), a 25 °C. Uma unidade de atividade (unidades mL⁻¹) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas.

Uma solução estoque de enzima PFO de 553 unidades mL⁻¹ foi obtida a partir do extrato bruto enzimático concentrado de abacate.

Métodos comparativos para determinação de dopamina

Como métodos comparativos para a determinação de dopamina, foram utilizados o método proposto por Vieira e Fatibello^{20,21} e o método padrão da Farmacopéia Brasileira²³. Dissolveu-se 5 mL da solução injetável Eurofarma em um balão volumétrico de 25 mL com solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Construiu-se uma curva analítica a partir de uma solução padrão de dopamina (5 mg mL⁻¹) variando-se a concentração das soluções de referência de 0,1 a 3,0 mg mL⁻¹, adicionando-se as alíquotas da solução padrão diretamente na cubeta de quartzo com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, completou-se o volume para 2,8 mL com solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e por fim adicionaram-se 0,2 mL da solução de extrato bruto de batata doce (128 unidades mL⁻¹) como fonte de polifenol oxidase. Foi cronometrado um tempo de 5 min e mediram-se as absorbâncias do cromóforo (dopaminaquinona) formado em 470 nm. O método da Farmacopéia consistiu em realizar as medidas de absorbância de dopamina diretamente em 280 nm.

Sistema de análise por injeção em fluxo

O diagrama do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de dopamina é apresentado na Figura 2.

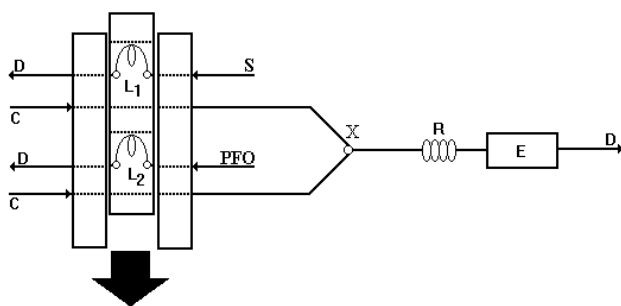


Figura 2. Diagrama de fluxos utilizado para a determinação espectrofotométrica de dopamina. C, representa a solução transportadora (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0)) com vazão de $2,2 \text{ mL min}^{-1}$; L_1 , alça de amostragem da solução de referência ou de amostra de 75 cm ($375 \mu\text{L}$); L_2 , alça de amostragem da enzima de 80 cm ($400 \mu\text{L}$); S, soluções de referência ou de amostra; PFO, solução enzimática; R, reator helicoidal de 350 cm ; E, espectrofômetro ($\lambda = 466 \text{ nm}$) e D, descarte

Conforme pode ser observado no diagrama, as soluções de referência ou amostra, S, contidas na alça de amostragem L_1 , de 75 cm ($375 \mu\text{L}$) e a solução enzimática contida na alça L_2 , de 80 cm ($400 \mu\text{L}$) são inseridas no transportador, C (tampão fosfato, pH 7,0) e após passarem pelo ponto de confluência X, dirigem-se ao reator R, de 350 cm de comprimento. O produto formado (dopaminaquinona) na reação enzimática foi então monitorado espectrofotometricamente em 466 nm .

Foram estudadas várias concentrações de substrato ($2,4 \times 10^{-7}$ a $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e de enzima (28; 42; 55; 83; 111; 138; 165; 208; 221; 277 e $332 \text{ unidades mL}^{-1}$), variando-se o comprimento das alças L_1 e L_2 (50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 375, 400 e $500 \mu\text{L}$). Estudou-se a vazão do carregador (1,4; 1,8; 2,2; 2,7; 3,1; 3,5 e $4,3 \text{ mL min}^{-1}$) variando-se a velocidade de propulsão da bomba peristáltica. E por fim, variou-se o comprimento do reator de $0,8 \text{ mm}$ de d.i. (100, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 cm). Construiu-se uma curva analítica para dopamina no intervalo de concentração de $5,3 \times 10^{-5}$ a $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e determinou-se então, a concentração de dopamina em ampolas Eurofarma®, após diluição de 10 vezes em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a determinação espectrofotométrica de dopamina usando a enzima PFO em fluxo com zonas coalescentes, foram otimizados alguns parâmetros do sistema em fluxo como concentração enzimática, comprimentos das alças de amostragem e da solução de PFO, vazão do sistema em fluxo e comprimento da bobina reacional.

Efeito da concentração enzimática

A atividade específica da PFO no abacate depende do grau de maturação dessa fruta, bem como da espécie estudada. Como estudado anteriormente por Lupetti²⁴, a atividade específica aumenta com o grau de maturação até o estágio entre verde e maduro, diminuindo para os estágios avançados de maturação devido à degradação parcial da atividade dessa enzima.

A Figura 3 ilustra o efeito da concentração enzimática de PFO sobre o sinal analítico (absorbância) do sistema FIA. Estudou-se um intervalo de concentrações de 28 a $332 \text{ unidades mL}^{-1}$, sendo então selecionado $277 \text{ unidades mL}^{-1}$. Além da melhor resposta obtida nessa concentração enzimática, as medidas de absorbância apresentaram o

menor desvio padrão relativo (RSD) e melhor relação sinal/ruído. Ademais, empregando-se esse extrato bruto, foi possível trabalhar-se durante um período de 6-7 h, sem perda da atividade enzimática.

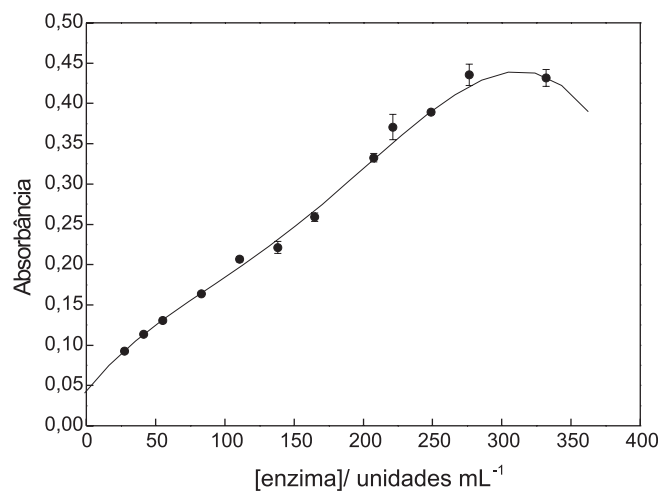


Figura 3. Efeito da concentração enzimática de 28 a $332 \text{ unidades mL}^{-1}$ sobre a resposta espectrofotométrica do sistema FIA, utilizando tampão fosfato pH 7,0 como transportador e dopamina $2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda = 466 \text{ nm}$)

Efeito dos volumes das alças de amostragem e da solução de PFO

O efeito dos volumes das alças de amostragem e da solução de PFO de 50 a $500 \mu\text{L}$ sobre o sinal analítico foram investigados. O sinal analítico aumentou com o aumento do volume da alça de amostragem (L_1) até o volume de $375 \mu\text{L}$, mantendo-se praticamente constante em volumes superiores. Sendo assim, trabalhou-se com esse volume de alça de amostragem, pois essa também proporcionou maior frequência analítica, como previsto. O efeito do volume da alça da solução de PFO $277 \text{ unidades mL}^{-1}$, no intervalo de 50 a $500 \mu\text{L}$ sobre o sinal analítico também foi investigado. A maior relação sinal/ruído foi obtida com $400 \mu\text{L}$ de solução de PFO $277 \text{ unidades mL}^{-1}$, para a alça de amostragem de $375 \mu\text{L}$, mostrando ser esse volume suficiente para garantir maior eficiência da reação da enzima com o substrato. Sendo assim, selecionou-se esse volume de L_2 para os estudos posteriores.

Efeito da vazão do sistema FIA

O efeito da vazão do carregador, variando de $1,4$ a $4,3 \text{ mL min}^{-1}$, sobre o sinal analítico foi também estudado, sendo que este aumentou da vazão de $4,3$ a $1,4 \text{ mL min}^{-1}$. Nesse trabalho foi selecionada a vazão de $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, uma vez que nessa vazão o sistema em fluxo apresentou maior repetibilidade e estabilidade da linha base.

Estudo da bobina reacional

Diferentes comprimentos de bobinas de reação variando de 100 a 500 cm foram também estudados. Como pode ser visto na Figura 4, o reator de 350 cm possibilitou a obtenção de maior sinal analítico, sendo assim selecionado para estudos posteriores. Reatores de comprimentos inferiores a 350 cm , provavelmente, não foram suficientes para o processamento da reação enzimática e os de comprimentos superiores devem ter causado maior dispersão da zona de amostra, diminuindo significativamente a magnitude do sinal analítico. No entanto, a queda acentuada do sinal analítico merece futuras investigações, pois o efeito da dispersão ao passar do reator (bobina

reacional) de 350 para o de 400 cm, não deveria levar a uma queda brusca de magnitude da absorbância.

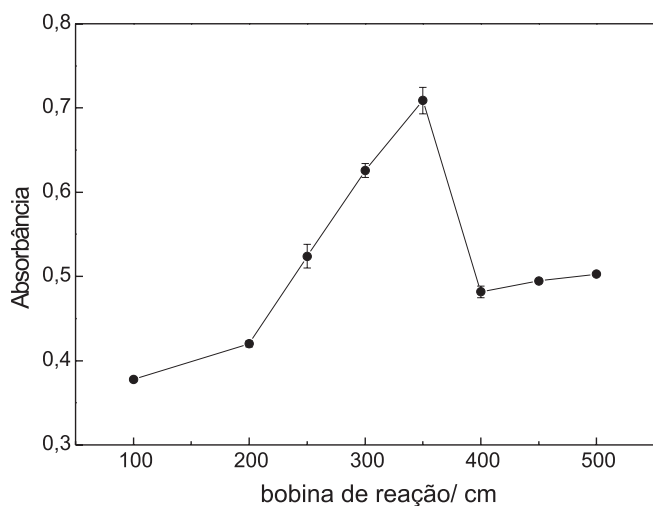


Figura 4. Estudo do comprimento da bobina de reação para determinação de dopamina utilizando 277 unidades mL⁻¹ de enzima e 2,7x10⁻⁴ mol L⁻¹ de solução de referência

Estudo da repetibilidade

O sistema apresentou uma boa repetibilidade com RSD inferior a 0,5%, após 10 injeções sucessivas de padrão de dopamina 5,3x10⁻⁴ mol L⁻¹.

Determinação em fluxo de dopamina

Empregando-se as melhores condições experimentais encontradas, *i.e.* bobina reacional de 350 cm, concentração de PFO 277 unidades mL⁻¹, alça de amostragem de 375 µL, alça da solução de PFO de 400 µL, vazão de 2,2 mL min⁻¹, obteve-se a curva analítica para o procedimento FIA proposto. A Figura 5 apresenta os sinais transientes em triplicata para as soluções de referência de dopamina de 5,3x10⁻⁵ a 5,3x10⁻⁴ mol L⁻¹, seguidos dos sinais transientes em triplicata das amostras A, B e C e, finalmente, sinais transientes das soluções de referência em concentrações decrescentes de 5,3x10⁻⁴ a 5,3x10⁻⁵ mol L⁻¹.

A curva analítica apresentou uma linearidade de 5,3x10⁻⁵ a 5,3x10⁻⁴ mol L⁻¹ de dopamina, com um limite de detecção de 1,3x10⁻⁵ mol L⁻¹ e pode ser descrita pela Equação 1:

$$A = 0,06455 + 114,27 C \quad (1)$$

onde, A é a absorbância do composto formado, dopaminaquinona, C, a concentração de dopamina em mol L⁻¹ e r = 0,9980.

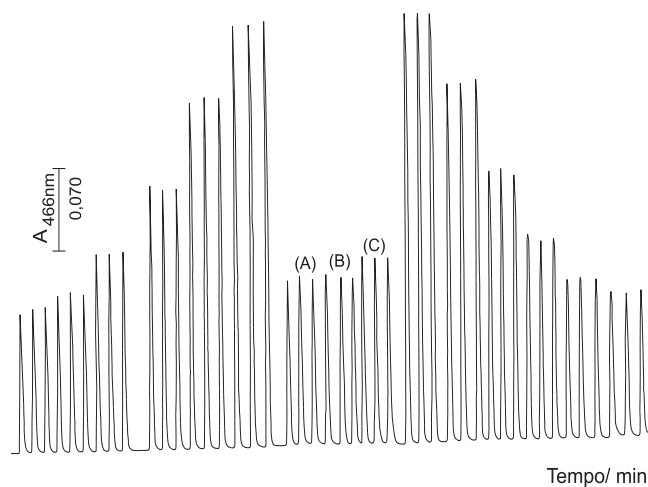


Figura 5. Sinais transientes obtidos na determinação de dopamina, utilizando um sistema de zonas coalescentes com a enzima PFO. Da esquerda para direita, os sinais correspondem a triplicatas das soluções de referência de dopamina de concentrações 5,3x10⁻⁵, 1,0x10⁻⁴, 1,6x10⁻⁴, 2,6x10⁻⁴, 4,2x10⁻⁴ e 5,3x10⁻⁴ mol L⁻¹ seguidos de sinais transientes em triplicata das soluções das amostras de dopamina Eurofarma® (A), (B) e (C) e das soluções de referência novamente em concentrações decrescentes

A frequência analítica foi de 46 h⁻¹. A Tabela 1 apresenta os teores de dopamina em três produtos comerciais obtidos com um método enzimático em batelada²¹, o método padrão da Farmacopéia Brasileira²³, com o procedimento FIA proposto e também os teores rotulados. Aplicando-se o teste t-pareado aos resultados obtidos empregando os métodos padrão e da literatura e o método proposto, verificou-se que esses resultados são concordantes a um nível de 95%. Comparando-se os dados referentes a limite de detecção, linearidade e principalmente versatilidade, o método em fluxo proposto apresentou maior linearidade, menor LD e menor RSD que aquele trabalho anteriormente desenvolvido pelo grupo²¹ e maior frequência analítica à metodologia padrão da Farmacopéia²³, podendo ser utilizado na determinação de dopamina em formulações farmacêuticas.

CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do método espectrofotométrico enzimático em fluxo para a determinação de dopamina em amostras farmacêuticas. A frequência analítica foi de 46 h⁻¹, sendo utilizados apenas 400 µL de solução enzimática 277 unidades de enzima mL⁻¹ do extrato bruto de abacate e 375 µL de amostra. Este procedimento apresentou boa repetibilidade (RSD < 0,5%) para 10 injeções sucessivas de dopamina 5,3x10⁻⁴ mol L⁻¹, com um limite de detecção de 1,3x10⁻⁵ mol L⁻¹.

Tabela 1. Determinação de dopamina em ampolas farmacêuticas usando o método espectrofotométrico²¹, o método padrão²³ e o procedimento em fluxo proposto

Amostra	Dopamina (mg mL ⁻¹)				Erros Relativos (%)		
	Rotulado	Espectr.	Padrão	Proposto	E ₁	E ₂	E ₃
A	5,0	4,7±0,1	4,8±0,1	4,8±0,1	-4,2	+2,1	0,0
B	5,0	5,0±0,2	5,0±0,1	4,8±0,3	-4,2	-4,2	-4,2
C	5,0	4,9±0,1	5,0±0,1	5,1±0,3	+2,0	+3,9	+2,0

n = 3, nível de confiança 95%; E₁ = proposto vs rotulado; E₂ = proposto vs espectrofotométrico; E₃ = proposto vs padrão

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsa concedida à K. O. Lupetti (Proc. nº 98/01252-1).

REFERÊNCIAS

1. Whitaker, J. R.; *Principles of Enzymology for Food Sciences*, Marcel Dekker: New York, 1972.
2. Palmer, T.; *Understanding Enzymes*, John Wiley & Sons: New York, 1985.
3. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1995, p. 332.
4. Stryer, L. W. H.; *Biochemistry*, 4th ed., Freeman and Company: New York, 1995, p. 181.
5. Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, 2nd ed., Savier: São Paulo, 1986, p. 154.
6. Araújo, M. A.; *Química de Alimentos. Teoria e Prática*, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1995, p. 247.
7. Ksower, E. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4015.
8. Silva, P.; *Farmacologia*, 3^a ed., Guanabara: Rio de Janeiro, 1989, p. 241.
9. Ortega, F.; Dominguez, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1157.
10. Nevado, J. J. B.; Gallego, J. M. L.; Laguna, P. B.; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1995**, *353*, 221.
11. Nevado, J. J. B.; Gallego, J. M. L.; Laguna, P. B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 571.
12. Uchiyama, S.; Suzuki, S.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *261*, 261.
13. Zimmerman, J. B.; Wightman, R. M.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 24.
14. Hasebe, Y.; Takamori, K.; Uchiyama, S.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *282*, 363.
15. Montenegro, M. C. B. S. M.; Sales, M. G. F.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 876.
16. Lima, A. W. O.; Vidsiunas, E. K.; Nascimento, V. B.; Angnes, L.; *Analyst* **1998**, *123*, 2377.
17. Wang, J.; Walcarius, A.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *407*, 183.
18. Nozaki, O.; Kawamoto, H.; Moriyama, H.; *Luminescence* **1999**, *14*, 369.
19. Huang, J. C.; Zhang, C. X.; Zhang, Z. J.; *Chin. Chem. Lett.* **1998**, *9*, 843.
20. Vieira, I. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 1997.
21. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O.; *Talanta* **1998**, *46*, 559.
22. Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M.; *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751.
23. *Farmacopéia Brasileira*, 3^a ed., Organização Andrei Editora: São Paulo, 1977, p. 656-658.
24. Lupetti, K. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2000.