

## 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  $2.4 \times 10^{-7}$  to  $5.3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> and 28 to 332 units mL<sup>-1</sup> were evaluated, respectively. In addition, the FIA parameters such as sample loop (50 to 500  $\mu$ L), flow rate (1.4 to 4.3 mL min<sup>-1</sup>) and reactor length (100 to 500 cm) were also evaluated in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH 7.0). Dopamine solution concentrations were determined using 277 units mL<sup>-1</sup> enzyme solution, 400  $\mu$ L enzyme loop, 375  $\mu$ L sample loop, 2.2 mL min<sup>-1</sup> flow rate and a reactor of 350 cm. The analytical curve showed a linearity from  $5.3 \times 10^{-5}$  to  $5.3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> dopamine with a detection limit of  $1.3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. The analytical frequency was 46 h<sup>-1</sup> and the RSD lower than 0.5% for  $5.3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> 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 outros<sup>1-5</sup>.

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 enzima<sup>1-5</sup>.

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 haloenzima<sup>1-5</sup>.

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 Bertrand<sup>1</sup>. 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 café<sup>6</sup>.

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 uma<sup>6</sup>. 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 enzima<sup>7</sup>. 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-

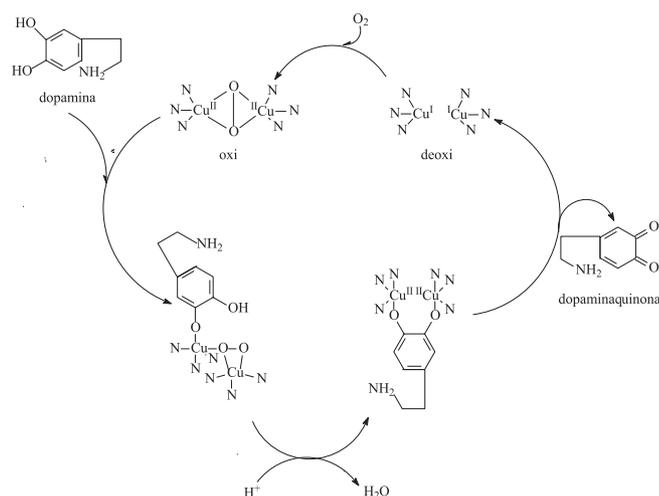


Figura 1. Mecanismo proposto de oxidação de dopamina pela enzima polifenol oxidase na presença de O<sub>2</sub>, adaptado da ref. 7. O sítio ativo da PFO apresenta Cu (I) na forma deoxi. Na presença de O<sub>2</sub>, ocorre a formação da espécie oxi, que catalisa a oxidação da dopamina, gerando a dopaminaquinona e regenerando a forma deoxi da PFO

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 sangue<sup>8</sup>. No Brasil, a dopamina é comercializada em forma de ampolas de 5 mg mL<sup>-1</sup>.

Diversas metodologias podem ser encontradas na literatura para determinação desse analito, dentre estas destacam-se os procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica<sup>9-11</sup>, amperométrica<sup>12-17</sup> e por quimiluminescência<sup>18-20</sup>. Ortega e Dominguez<sup>9</sup> 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<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e 8,4x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Nevado e colaboradores<sup>10</sup> empregaram solução de metaperiodato em fluxo para detecção espectrofotométrica dessa catecolamina. O sistema apresentou um limite de detecção de 2,5x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e uma frequência de amostragem de 130 determinações por hora. Uchiyama e Suzuki<sup>12</sup> 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<sup>-4</sup> a 6,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>. Montenegro e Sales<sup>15</sup> empregaram um eletrodo seletivo a IO<sub>4</sub><sup>-</sup> para a determinação potenciométrica de dopamina, obtendo-se uma linearidade no intervalo de concentração desse analito de 8,0x10<sup>-3</sup> a 2,7x10<sup>-1</sup> g L<sup>-1</sup> (4,2x10<sup>-5</sup> a 1,4x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>). Lima *et al.*<sup>16</sup> 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<sup>-6</sup> a 7,0x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de dopamina. Wang e Walcarius<sup>17</sup> construíram eletrodos de pasta de carbono modificados com zeólitas para a determinação amperométrica desse fármaco. O sistema apresentou linearidade entre 2,0x10<sup>-5</sup> a 1,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> com um tempo de residência de 45 s para pré-concentração em fluxo. Nozaki e colaboradores<sup>18</sup> 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<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, com um desvio padrão relativo de 4,7% (n=5). Huang e colaboradores<sup>19</sup> empregaram a inibição pela dopamina da propriedade quimiluminescente do sistema luminol-hipoclorito, obtendo um limite de detecção de 0,6 µg L<sup>-1</sup> (3,2x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>).

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<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup> (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<sup>20,21</sup>.

### 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 padrão<sup>22</sup>.

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<sup>-1</sup> e 0,2 mL da solução sobrenadante (homogenato), a 25 °C. Uma unidade de atividade (unidades mL<sup>-1</sup>) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto nas condições mencionadas.

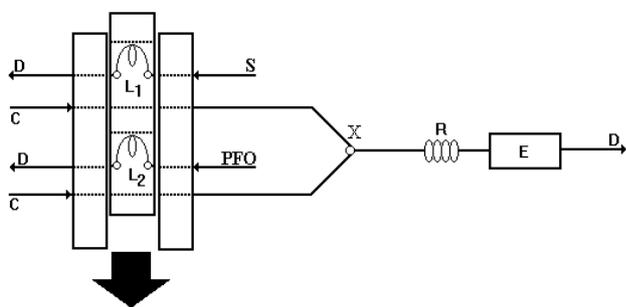
Uma solução estoque de enzima PFO de 553 unidades mL<sup>-1</sup> foi obtida a partir do extrato bruto enzimático concentrado de abacate.

### Métodos comparativos para determinação de dopamina

Como métodos comparativos para a determinação de dopamina, foram utilizados o método proposto por Vieira e Fatibello<sup>20,21</sup> e o método padrão da Farmacopéia Brasileira<sup>23</sup>. Dissolveu-se 5 mL da solução injetável Eurofarma em um balão volumétrico de 25 mL com solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). Construiu-se uma curva analítica a partir de uma solução padrão de dopamina (5 mg mL<sup>-1</sup>) variando-se a concentração das soluções de referência de 0,1 a 3,0 mg mL<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> (pH 7,0) e por fim adicionaram-se 0,2 mL da solução de extrato bruto de batata doce (128 unidades mL<sup>-1</sup>) 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  $75 \text{ cm}$  ( $375 \mu\text{L}$ );  $L_2$ , alça de amostragem da enzima de  $80 \text{ cm}$  ( $400 \mu\text{L}$ ); S, soluções de referência ou de amostra; PFO, solução enzimática; R, reator helicoidal de  $350 \text{ cm}$ ; E, espectrofotômetro ( $\lambda = 466 \text{ nm}$ ) e D, descarte

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

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  $500 \text{ cm}$ ). 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

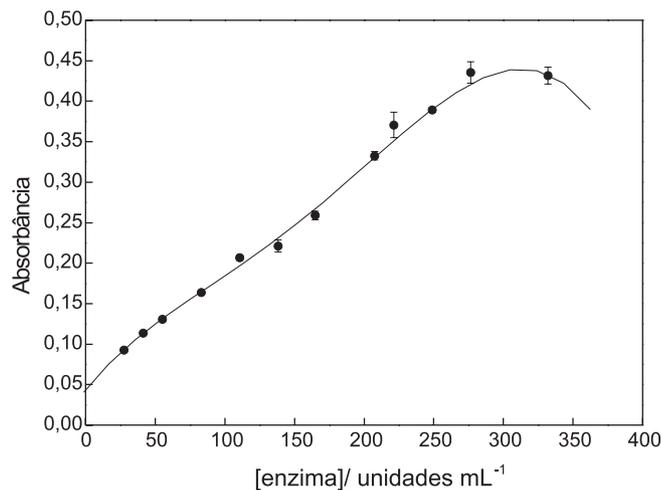
Para a determinação espectrofotométrica de dopamina usando a enzima PFO em fluxo com zonas coalescentes, foram otimizados alguns parâmetros do sistema em fluxo como concentração enzimática, comprimentos das alças de amostragem e da solução de PFO, vazão do sistema em fluxo e comprimento da bobina reacional.

### 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 Lupetti<sup>24</sup>, 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.

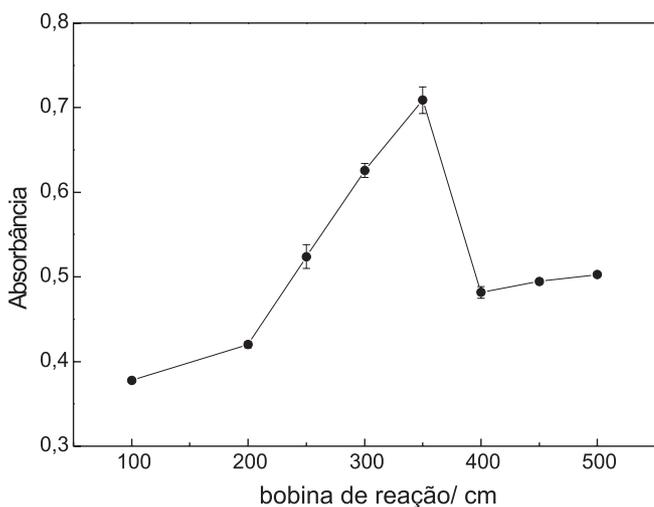
### Efeito da vazão do sistema FIA

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  $500 \text{ cm}$  foram também estudados. Como pode ser visto na Figura 4, o reator de  $350 \text{ cm}$  possibilitou a obtenção de maior sinal analítico, sendo assim selecionado para estudos posteriores. Reatores de comprimentos inferiores a  $350 \text{ cm}$ , 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<sup>-1</sup> de enzima e 2,7x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> 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<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

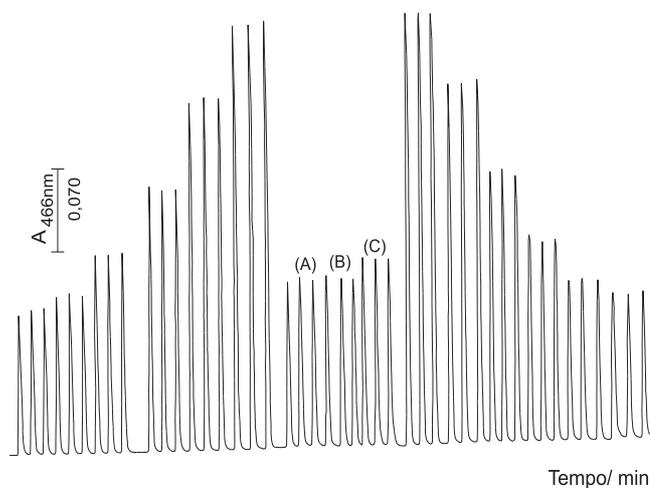
#### Determinação em fluxo de dopamina

Empregando-se as melhores condições experimentais encontradas, *i.e.* bobina reacional de 350 cm, concentração de PFO 277 unidades mL<sup>-1</sup>, alça de amostragem de 375 µL, alça da solução de PFO de 400 µL, vazão de 2,2 mL min<sup>-1</sup>, 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<sup>-5</sup> a 5,3x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, 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<sup>-4</sup> a 5,3x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

A curva analítica apresentou uma linearidade de 5,3x10<sup>-5</sup> a 5,3x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de dopamina, com um limite de detecção de 1,3x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-5</sup>, 1,0x10<sup>-4</sup>, 1,6x10<sup>-4</sup>, 2,6x10<sup>-4</sup>, 4,2x10<sup>-4</sup> e 5,3x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>. A Tabela 1 apresenta os teores de dopamina em três produtos comerciais obtidos com um método enzimático em batelada<sup>21</sup>, o método padrão da Farmacopéia Brasileira<sup>23</sup>, 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 grupo<sup>21</sup> e maior frequência analítica à metodologia padrão da Farmacopéia<sup>23</sup>, 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<sup>-1</sup>, sendo utilizados apenas 400 µL de solução enzimática 277 unidades de enzima mL<sup>-1</sup> 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<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 1,3x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Determinação de dopamina em ampolas farmacêuticas usando o método espectrofotométrico<sup>21</sup>, o método padrão<sup>23</sup> e o procedimento em fluxo proposto

Amostra	Dopamina (mg mL <sup>-1</sup> )				Erros Relativos (%)		
	Rotulado	Espectr.	Padrão	Proposto	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
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%; E<sub>1</sub> = proposto vs rotulado; E<sub>2</sub> = proposto vs espectrofotométrico; E<sub>3</sub> = 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*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons: New York, 1995, p. 332.
4. Stryer, L. W. H.; *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> ed., Freeman and Company: New York, 1995, p. 181.
5. Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, 2<sup>nd</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> ed., Organização Andrei Editora: São Paulo, 1977, p. 656-658.
24. Lupetti, K. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2000.