

Determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos em urina humana, usando extrato parcialmente purificado de banana nanica (*Musa acuminata*)

Spectrophotometric and amperometric determination of compounds phenolics in human urine, utilizing purified partial extract of banana nanica (Musa acuminata)

Cássia Aparecida Signori Perone*
Adriano Salvador Queiroz**
Viviane Martins Dalosso**
Marta Ester Maffei Moreira***

Resumo

Introdução – Extrato parcialmente purificado de banana nanica (*Musa acuminata*), melhor fonte de enzima *Polifenol oxidase (PFO)* [EC.1.14.18.1] (Bonfim *et al.*³, 2000), foi estudado como material biocatalítico para a oxidação aeróbica dos substratos fenólicos usando um biossensor amperométrico com PFO imobilizada. **Métodos** – Foi estudada a extração da PFO dessa fonte (Bonfim *et al.*³, 2000), a purificação parcial desse extrato bruto usando sulfato de amônio (40%), que precipita o excesso de enzimas presentes nesse extrato com posterior diálise (Perone¹⁵, 2004). A seguir foi determinada a atividade e proteína total nos dois extratos. Um biossensor amperométrico foi construído usando 50 U de PFO proveniente do extrato parcialmente purificado de banana nanica (Perone¹⁵, 2004), imobilizada sobre uma membrana de teflon (Celgard 2400) com o uso do reagente bifuncional glutaraldeído 2,5% m/V. Após secagem, essa membrana enzimática foi acoplada na extremidade de um eletrodo de oxigênio. Esse biossensor foi usado na determinação de compostos fenólicos em urina de indivíduos que consomem drogas metabolizando fenólicos, por amperometria e por espectrofotometria. **Resultados** – Nas amostras de urina observou-se que indivíduos que usam L-dopa apresentaram maior concentração de fenólicos que indivíduos que usam anfetaminas. **Conclusões** – A porcentagem de erro nas amostras estudadas foi menor que 3%, usando extrato bruto (Perone¹⁴, 2003) e parcialmente purificado, usando o método padrão espectrofotométrico (Folin-Denis), mostrando a eficiência do método amperométrico empregado, com ou sem purificação enzimática.

Palavras-chave: Levedopa – Fenol – Urina

Abstract

Introduction – Partial purified extract of stunded banana (*Musa acuminata*), the best source of enzyme *Poliphenol oxidase (PPO)* [EC.1.14.18.1] (Bonfim *et al.*³, 2000), was studied as biocatalytic material to the aerobic oxidation of phenolics substrates using an amperometry biosensor with PPO immobilized. **Methods** – The extraction of PPO was studied in the source (Bonfim *et al.*³, 2000), the partial purification of this crude extract using ammonium sulphate (40%), that precipitate the enzyme excess presents in this extract with posterior dialysis. After it was determined the total activity and proteins in the two extracts. An amperometric biosensor was builded using 50 U of PPO proceeding of purified partial extract of stunded banana; immobilized on a Teflon membrane (Celgard 2400), with the use of the reagent glutaraldehyde 2,5% m/V. After drying, this enzymatic membrane was copled in the extremity of an oxygen electrode. This biosensor was used in the determination of phenolics in urine samples of persons that use drugs, metabolizing phenols by amperometry and by spectrophotometry. **Results** – In the urine samples, was possible to notice that persons that use L- Dopa shows greather quantity of phenols than persons that use amphetamines. **Conclusions** – The percentage of error in the samples studied was minor that 3%, using the crude extract (Perone¹⁴, 2003) and purified partialment, using the spectrophotometric standard method (Folin-Denis), showing the efficiency of the amperometric method used with or without the enzymatic purification.

Key words: Levedopa – Phenol – Urine

* Professora Titular da Disciplina de Química Analítica Quantitativa do Curso de Farmácia e Bioquímica do Campus JK da Universidade Paulista, São José do Rio Preto (UNIP-SJRP). E-mail: cassiaperone@bol.com.br

** Acadêmicos do 4º ano do Curso de Farmácia e Bioquímica do Campus JK – UNIP – SJRP.

*** Auxiliar Técnico de Laboratório do Campus JK – UNIP – SJRP.

Introdução

Fenol, impropriamente chamado ácido fênico ou carbólico (Corbett⁴, 1977), pois em realidade, não é um ácido, possui importantes derivados como: guaiacol, resorcina, hexilresorcinol, hidroquinona (difenois), pirogalol (trifenois), pentaclorofenol e pentaclorofenolato (halogenados), dinitrofenol (ácido pícrico) – (nitrogenados); creosatos (alcoilados); timol, naftol, creolina (cresóis, hidrocarbonetos, sabão), lisol (cresóis, sabão, potassa, óleo de linhança), cloroxilenol etc., além de formas complexas como os hormônios sintéticos sexuais.

É um sólido incolor, cristalizado em forma de agulhas de odor pronunciado e característico, forte poder cáustico; ponto de fusão de 41°C e temperatura de ebulição de 182°C. Deve ser estocado em recipiente bem fechado (substância higroscópica), ao abrigo da luz e à temperatura entre 15 e 25°C (Deichmann e Keplinger⁶, 1967).

A dose letal para adultos varia de 3 a 10g, para crianças de 0,4 a 1,0g. O valor permitido para a exposição de pessoas que trabalham com compostos fenólicos é de 10 mg/l (dosagem na urina) (Bastos *et al.*¹, 1970).

A absorção ocorre pela pele e, mais freqüentemente, por via oral, tendo acentuada ação sobre o sistema nervoso central. No início da absorção ocorre uma excitação no indivíduo, que é seguida de depressão, resultando em insuficiência respiratória e morte.

Há diminuição da pressão arterial, em parte como resultado da ação vaso depressora central e, principalmente devido a sua ação sobre o miocárdio e vasos sanguíneos (Corbett⁴, 1977). Precipita as proteínas celulares e produz hemólise sobre os glóbulos vermelhos. No fígado e rins, provoca degeneração, paralisando os rins e causando hepatite crônica no fígado. Em solução, coagula as proteínas, porém, sem combinar-se com elas. Se inalado pode ocorrer alucinações, tremores, convulsões, fraqueza muscular, destruição do aparelho respiratório, além de causar edema pulmonar e até a morte (Corbett⁴, 1977).

É um poderoso anti-séptico, muito empregado nas práticas de desinfecção e certas enfermidades. Dissolvido em glicerina ou azeites, perde grande parte de seu poder cáustico e irritativo. Pode causar intoxicações também se usado como abortivo e como “peeling” químico (descamação da pele), sem orientações médicas (Crammer⁵, 1970).

Os fenóis são metabólitos intermediários de diversas drogas como anfetamina, codeína, papaverina. L-dopa etc. (Post *et al.*¹⁶, 1986).

A Tabela 1 mostra a análise de alguns dos mais importantes compostos fenólicos, usando a urina e o sangue humano, como meio analisador.

Tabela 1. Análise de compostos fenólicos usando como meio a urina

| Exposição aos compostos aromáticos | Análise | Meio |
|------------------------------------|-----------------|--------|
| Benzeno | Benzeno | Sangue |
| Benzeno | Fenol | Urina |
| Tolueno | o-cresol | Urina |
| Tolueno | Tolueno | Sangue |
| Tolueno | Tolueno-diamina | Urina |

Fonte: Tietz¹⁹ (1995).

Fenol e seus derivados são absorvidos rapidamente pelo trato gastrointestinal, transformando-se antes de ser eliminado. Parte dos fenóis conjuga-se com ácido glicurônico, formando fenilglicuronídeo e parte conjuga-se com ácido sulfúrico, formando fenilsulfato. Pode oxidar-se a quinona, tingindo a urina de verde (Bastos *et al.*¹, 1970).

A maior parte dos fenóis elimina-se pela urina, metabolizado como fenilsulfato e como fenilglicuronídeo, e também como hidrocatécol e hidroquinol, e ainda pode eliminar-se em diminuta quantidade como quinona (Bastos *et al.*¹, 1970).

Principalmente a hidroquinona ou hidroquinol e o pirogalol (derivados metabólitos da degradação do benzeno) são menos cáusticos que o fenol (Deichmann e Keplinger⁶, 1967) (Figura 1).

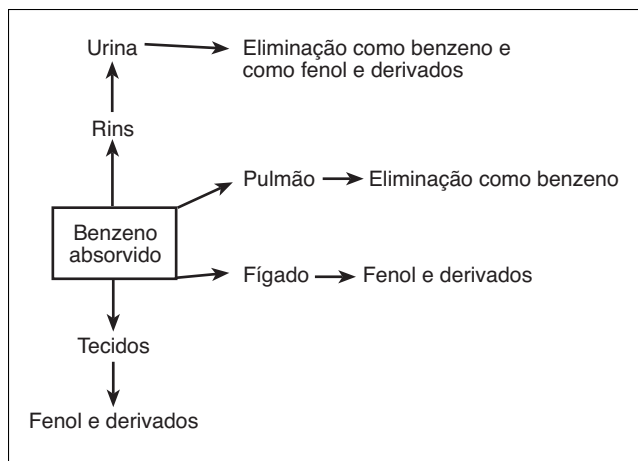


Figura 1. Distribuição e metabolização do benzeno (Post *et al.*¹⁶, 1986)

O fígado metaboliza o benzeno, formando derivados fenólicos, conjugados com sulfatos e ácidos glicurônico e, assim, eliminando por via renal (Post *et al.*¹⁶, 1986).

O uso de enzimas para propósitos analíticos tem sido limitado devido à certas desvantagens, tais como instabilidade e alto custo dessas enzimas. As soluções aquosas de enzimas freqüentemente perdem sua habilidade catalítica rapidamente e as enzimas não podem ser recuperadas da solução com sua capacidade regenerada. Entretanto, estas dificuldades têm sido superadas ou minimizadas pelo desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas. A enzima livre é imobilizada (através de ligação química ou física) em uma matriz a qual retém suas propriedades catalíticas por um tempo maior do que a da enzima livre e pode ser usada continuamente em muitas análises (Guilbaut¹⁰, 1984 e Fatibello-Filho e Capelato⁷, 1992).

O termo imobilização significa o confinamento físico de moléculas da enzima durante um processo catalítico.

O uso de enzimas como a PFO (extrato bruto ou parcialmente purificado) utilizada na forma solúvel ou imobilizada em membranas ou matrizes insolúveis facilitou as análises químicas em Laboratório de Química Analítica.

ca de importantes espécies de interesse biológico, farmacêutico e ambiental.

Para que as análises realizadas se tornassem mais rápidas (principalmente em caso de urgência, como intoxicação de fenóis por ingestão ou inalação), Neujahr¹¹ (1980) desenvolveu um biossensor usando a enzima catecol 1,2 oxigenase imobilizada sobre uma membrana de teflon de um eletrodo de oxigênio para determinar catecol em urina humana e fígado de galinha.

Macholán e Shánel¹¹ (1977) empregaram a *Polifenol oxidase* (sensível a polifenóis) de cogumelos e batatas (purificada), imobilizada sobre uma membrana de poliamida de um eletrodo de oxigênio, para determinar substratos fenólicos em águas residuais industriais.

Signori e Fatibello-Filho¹⁸ (1994) empregaram a *Polifenol oxidase* extraída do extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*), imobilizada sobre uma membrana de teflon, tendo como detector um eletrodo de oxigênio, para determinar substratos fenólicos em águas residuais industriais.

Perone¹³ (1996) desenvolveu um biossensor para fenóis usando a enzima *Polifenol oxidase* extraída do extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*), imobilizada em coluna de sílica com porosidade controlada, para a determinação de polifenóis em diversos tipos de chá.

Bonfim *et al.*³ (2000) e Perone¹⁴ (2003) desenvolveram biossensores para fenóis usando a enzima *Polifenol oxidase* extraída do extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*), imobilizada em membrana de teflon colocada no topo de um eletrodo de oxigênio, para a determinação de polifenóis em diversos tipos de chá e em urina humana de pessoas que utilizam drogas que metabolizam compostos fenólicos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico amperométrico para análise de fenóis e seus derivados, usando a enzima *Polifenol oxidase* parcialmente purificada de banana nanica insolubilizada, para determinação desses compostos em amostras de urina humana. Os valores obtidos foram comparados com a enzima bruta (Perone¹⁴, 2003).

Métodos

Equipamentos

A solução tampão fosfato 0,1 mol/L com pH 6,5, foi preparada utilizando-se um pH-metro da Analyser modelo 300, para o ajuste e/ou confirmação do pH desejado. Para a obtenção do extrato bruto enzimático foram utilizados um triturador (líqüidificador) e uma centrífuga da Du Pont Instruments Sorvael, modelo RC-5B Plus, provida de um rotor com diâmetro igual a 23 cm, modelo SS 34 que também foi utilizada para a purificação parcial do extrato bruto de banana nanica com sulfato de amônio (40%).

Utilizou-se um espectrofotômetro da Analyser Orion modelo VIS 7220, nas medidas de absorvância para a determinação da atividade enzimática e proteína total no extrato bruto de banana nanica e no extrato parcialmente purificado e dialisado com sulfato de amônio (40%). O

eletrodo amperométrico utilizado para as análises da melhor quantidade de enzima *PFO* (parcialmente purificada) imobilizada, para o pH ótimo de imobilização e para a determinação de polifenóis nas amostras de urina humana, foi um eletrodo de oxigênio da DIGIMED, modelo DM-CO1 (célula com termo acoplado), que consiste de um cátodo de Pt e um ânodo de Ag/AgCl com um potencial de polarização de -600 mV. Todas as medidas amperométricas com o biossensor foram feitas com um analisador de oxigênio da DIGIMED, modelo DM-4 V5 (São Paulo/S.P.) sob agitação constante, em célula de vidro de 100 ml termostatizada a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

O eletrodo de oxigênio foi previamente calibrado em 0% de oxigênio com uma solução saturada de bissulfito de sódio (Carlo Erba) e em 100% de oxigênio com uma solução saturada de ar.

Reagentes e soluções

Policlar SB-100 (Indústria ISP do Brasil Ltda) foi utilizado para remoção de compostos fenólicos naturais do extrato bruto de banana nanica, através de ligações de ponte de hidrogênio. Age como estabilizador em sucos, vinhos e cerveja, insolúvel em água, apresentando fácil remoção.

Reagentes de grau analítico foram usados para preparar tampão, soluções padrão de fenóis como catecol e fenol (Sigma Chemical Co-St. Louis, Mo, USA) e solução precipitante de proteínas na purificação da enzima *Polifenol oxidase* como sulfato de amônio (Merck).

A solução de albumina de soro bovino (1%) m/V (Sigma Chemical Co), foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol/L, (pH 7,0) e utilizada como padrão em análise de proteína. As soluções de glutaraldeído (2,5%) m/V (Reagen) e do substrato catecol [Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA)] foram preparadas diariamente em tampão fosfato 0,1 mol/L, (pH 7,0).

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada.

Membrana de Teflon (Celgard 2400) foi utilizada como suporte para a imobilização da enzima com glutaraldeído.

Solução de ácido tânico (Reagen) preparada diariamente foi utilizada como padrão para dosar polifenóis. O reagente de Folin-Denis foi preparado como descrito por estes autores (Folin-Denis⁹, 1912).

Amostras de urina de pessoas que consomem drogas que metabolizam fenóis, foram empregadas para análise.

Procedimento analítico

Material biológico

A banana nanica foi adquirida em supermercados da região.

Obtenção do extrato bruto

Cinquenta gramas da fruta, descascados e picados em pequenos pedaços, foram homogeneizados em líqüidifica-

dor com 100ml de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,5, contendo 5,0 g de policlar SB-100 e tempo de contato de 30 minutos (Bonfim *et al.*³, 2000). O polímero foi usado para remoção de compostos fenólicos naturais presentes nesse extrato, durante o processo. A seguir, o material foi filtrado em gaze e centrifugado a 14000 r.p.m (rotações por minuto) durante 20 minutos, a 5°C. A solução sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4°C e utilizada como fonte enzimática para medida de atividade, proteína total, purificação parcial da *PFO* com sulfato de amônio (40%) (Signori¹⁷, 1984); e posteriormente na construção do biossensor amperométrico (Signori e Fatibello-Filho¹⁸, 1994).

Determinação da atividade da *Polifenol oxidase* e proteína total

A atividade da *Polifenol oxidase* solúvel presente na banana nanica com e sem purificação foi determinada pela medida de absorvância em $\lambda=410$ nm, da melanina resultante da quinona formada após reação entre 0,2 ml da solução sobrenadante e 2,8 ml de solução 0,05 mol/L de catecol em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,5 a 25°C (Signori¹⁷, 1984 e Signori e Fatibello-Filho¹⁸, 1994). A reação foi monitorada durante 2 minutos (Bergmeyer *et al.*², 1974) tempo necessário para atingir $V_{\text{máx}}$.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto nas condições mencionadas acima.

$$a = \frac{\Delta A \times 60 \times 1000}{\Delta t \times d \times V_{\text{amostra}}}$$

onde: a= atividade (u/ml)

ΔA = variação de absorvância

Δt = variação de tempo (min.)

d= diâmetro da cubeta

V_{amostra} = volume da amostra (ml)

A proteína total das soluções sobrenadantes foi determinada pelo método do biureto (Gornaël *et al.*⁹, 1949). O procedimento experimental é simples e econômico; o sulfato de cobre dissolvido em solução alcalina é adicionado à proteína. Esta reação é caracterizada pela formação de íon complexo, no qual cada átomo de cobre está ligado a quatro nitrogênios peptídicos. Estes complexos de coordenação produzem uma cor azul que é medida espectrofotometricamente a 540 nm. A curva padrão foi construída empregando-se albumina de soro bovino.

Precipitação de proteínas do extrato bruto de banana nanica com sulfato de amônio (40%) e diálise

Nesta precipitação foi utilizado 50,0 ml de extrato bruto com sulfato de amônio 40% (Perone¹⁵, 2004). O sulfato de amônio foi adicionado lentamente, com agitação constante, e deixado em repouso por 30 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,01 mol/L pH 6,5, centrifugado a 14.000 r.p.m., a 5°C e dialisado (Perone¹⁵, 2004).

A seguir foi determinada a atividade (Bergmeyer *et*

*al.*², 1974) e o teor de proteína total (Gornaël *et al.*⁹, 1949) na solução.

Método de imobilização da enzima *PFO* com reagente bifuncional (glutaraldeído- $C_5H_8O_2$)

Um dos métodos mais empregados para a imobilização de enzimas é aquele que promove a ligação covalente desta proteína com um reagente bifuncional como glutaraldeído, levando assim, à insolubilização da enzima, sem a perda de sua atividade catalítica. O aldeído bifuncional é o reagente mais utilizado para este tipo de imobilização (Fatibello-Filho e Capelato⁷, 1992).

Preparação do biossensor de banana nanica (extrato parcialmente purificado)

Uma membrana de Teflon (Celgard 2400) foi utilizada como suporte para a imobilização da *PFO* presente no extrato parcialmente purificado de banana nanica.

A área circular da membrana foi coberta com 50 unidades de solução de *PFO* proveniente do extrato parcialmente purificado de banana nanica e glutaraldeído 2,5% m/V, na mesma proporção (Perone¹⁵, 2004).

A membrana foi seca em um dessecador a 4°C e estocada em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 [melhor pH de imobilização (Perone¹⁵, 2004)], na mesma temperatura.

Para efetuar as medidas amperométricas, a membrana foi colocada na extremidade do eletrodo de oxigênio e fixada com um anel de borracha. O biossensor foi utilizado para medidas amperométricas em "batelada".

Preparação das amostras de urina humana de indivíduos que consomem drogas como anfetaminas, L-dopa etc, que degradam formando metabólitos fenólicos

Foram coletados 25 ml de urina humana em frascos esterilizados, de indivíduos com a característica acima, para as análises amperométricas e espectrofotométricas. As análises foram realizadas em um período de 2 horas após a coleta, sendo que durante esse período de transporte e preparação foram conservadas a 4°C, até o momento da análise.

Métodos de determinação – Amperometria

Determinação da concentração de substratos fenólicos

O eletrodo de oxigênio com a membrana enzimática (biossensor) foi colocado em uma célula de vidro contendo 50 ml de solução tampão 0,1 mol/L, pH 7,0 (Perone¹⁵, 2004), a 25°C. Após a estabilização de corrente, adicionaram-se volumes crescentes de solução 10 mM (10-1000 μ l) do substrato fenólico catecol em intervalos de 1 minuto entre cada adição, com agitação constante. A adição do substrato causa uma diminuição na concentração de O_2 com conseqüente diminuição da corrente de redução desta espécie.

Após a adição total do substrato (curva padrão), foram adicionados 300 μ l de urina humana. Foi feita uma curva padrão única para cada amostra de urina coletada e

para cada amostra de chá utilizado. Após a análise amperométrica foi realizada a espectrofotométrica (padrão) usando Folin-Denis⁸ (1912) para cada amostra estudada.

Determinação de fenóis totais – Folin-Denis

O reagente de Folin-Denis foi preparado como descrito pelo autor (Folin-Denis⁸, 1912). A curva padrão é preparada utilizando-se alíquotas de 0-10 ml de ácido tânico (0,1 mg/L), 5 ml do reagente de Folin-Denis e 10 ml de bicarbonato de sódio (solução saturada), em balão de 100 ml. Após 30 minutos determina-se a absorbância a 760 nm.

A cor azul-esverdeada produzida neste método é resultado de uma reação colorimétrica, envolvendo a redução do ácido fosfomolibdico-fosfotungstíco por compostos fenólicos. A intensidade da cor produzida é dependente da quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra.

Resultados e Discussão

Determinação da atividade da Polifenol oxidase e proteína total no extrato bruto e parcialmente purificado de banana nanica

O extrato parcialmente purificado de banana nanica foi estudado como material biocatalítico para a oxidação do substrato fenólico (catecol).

A Tabela 2 mostra as atividades (unidades/ml), encontradas nesses extratos, a proteína total (mg/ml) e atividade específica (unidades de *PFO*/mg de proteína total).

A curva de calibração de proteína total usando albumina de soro bovino, encontra-se na Figura 2.

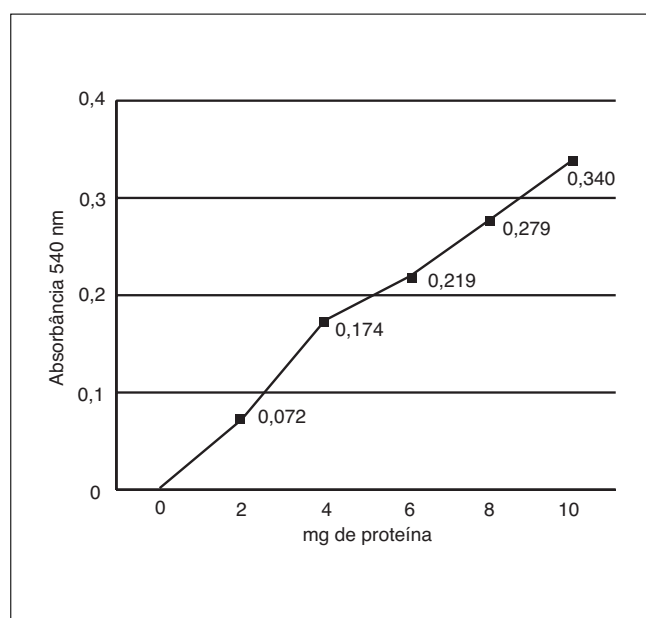


Figura 2. Curva de calibração para determinação de proteína total utilizando albumina de soro bovino como padrão

Análise de amostras de urina humana usando o biossensor de extrato parcialmente purificado de *PFO* proveniente de banana nanica

Imobilizando 50 unidades de enzima *PFO* parcialmente purificada (Perone¹⁵, 2004), determinou-se curvas amperométricas analíticas típicas para fenóis usando esse biossensor para cada amostra de urina humana coletada.

Para testar a validade do método desenvolvido utilizou-se um método espectrofotométrico de absorção molecular (Folin-Denis⁸, 1912). Os valores encontrados na determinação de alguns compostos fenólicos na urina, foram comparados com os determinados por (Tietz¹⁹, 1995).

Determinação de fenóis com biossensor amperométrico de extrato parcialmente purificado de *PFO* de banana nanica

Análise de fenóis em amostras de urina de indivíduos que consomem drogas que degradam formando metabólitos fenólicos

Usando 50 unidades de *PFO* imobilizada do extrato parcialmente purificado e pH de imobilização de 7,0 (Perone¹⁵, 2004); determinou-se curvas amperométricas analíticas típicas para fenóis usando esse biossensor, verificando uma resposta relativa maior para o substrato catecol comparado com outros fenóis (Perone¹⁵, 2004); fato observado também com o extrato bruto (Perone¹⁴, 2003). Os resultados obtidos com as amostras de urina, estão representados na Tabela 3. Os erros relativos (%) encontrados, apresentaram valores pequenos (< 3%), demonstrando a validade e eficiência do método amperométrico empregado.

O que se pode verificar no método amperométrico proposto é que indivíduos que não consomem drogas que metabolizam compostos fenólicos apresentaram resultado de análise de fenol na urina inferior ao resultado de indivíduos que consomem drogas que formam metabólitos fenólicos.

Pode-se verificar também que indivíduos que consomem L-dopa apresentaram resultado de fenol na urina superior aos resultados apresentados por indivíduos que consomem anfetaminas. Isso pode ser explicado no fato em que a dopamina deve formar maior quantidade de metabólitos fenólicos que a anfetamina. Os resultados obtidos com o biossensor de *PFO* parcialmente purificada de banana nanica, concordam com aqueles obtidos com o biossensor de extrato bruto de *PFO* (Perone^{14,15}, 2003, 2004) e também com a literatura (Tietz¹⁹, 1995 – Tabela 2) mostrando assim, a compatibilidade do método proposto usando os dois tipos de biossensores.

Conclusões

1. A aplicabilidade desse biossensor foi comprovada nas análises de amostras de urina de indivíduos que consomem drogas que metabolizam compostos fenólicos.
2. Os valores encontrados para fenóis nas amostras

Tabela 2. Atividade, proteína total e atividade específica da Polifenol oxidase encontrada no extrato bruto e parcialmente purificado de banana nanica

| Material | Atividade (u/ml) | Proteína total (mg/ml) | Atividade específica (u/mg de proteína) |
|--|------------------|------------------------|---|
| Extrato bruto de banana nanica | 9400 | 10,5 | 895 |
| Extrato parcialmente purificado de banana nanica com sulfato de amônio | 60000 | 7,20 | 8333 |
| Diálise | 50340 | 5,80 | 8679 |
| Enzima pura ♣ (cogumelo) | | | 2400 |
| Enzima purificada ♥ (cogumelo) | 1075 | 23,0 | 47 |

♣ Sigma; ♥ (Macholan e Shánel¹¹, 1977).

Tabela 3. Análise de fenóis em amostras de urina de indivíduos que consomem drogas que degradam formando metabólitos fenólicos; por espectrofotometria (Folin-Denis⁸, 1912) e pelo método amperométrico usando o biossensor de extrato parcialmente purificado de PFO de banana nanica, em “batelada”

| Amostras | Concentração de fenóis (mg/L) | | Erro relativo (%) |
|---------------|-------------------------------|---------------|-------------------|
| | Espectrofotométrico | Amperométrico | |
| Indivíduo A* | 1,20 ± 0,03** | 1,23 ± 0,03 | 2,5 |
| Indivíduo B* | 1,18 ± 0,02 | 1,20 ± 0,04 | 1,7 |
| Indivíduo C ♥ | 5,38 ± 0,03 | 5,51 ± 0,02 | 2,4 |
| Indivíduo D ♥ | 5,61 ± 0,03 | 5,75 ± 0,03 | 2,5 |
| Indivíduo E ♦ | 5,00 ± 0,04 | 5,13 ± 0,02 | 2,6 |
| Indivíduo F ♦ | 4,86 ± 0,02 | 4,98 ± 0,03 | 2,5 |

** desvio padrão da média com grau de confiança de 95%, para n = 3.

Onde: (*) pessoas que não consomem drogas que formam metabólitos fenólicos; (♥) pessoas que consomem L-dopa; (♦) pessoas que consomem anfetaminas

de urina humana concordam com os valores apresentados por Bonfim *et al.*³ 2000 e Perone^{14,15}, 2003, 2004, conseqüentemente mostram a eficiência do método amperométrico proposto, usando biossensor de extrato bruto e/ou de extrato parcialmente purificado de PFO. Os resultados obtidos também são compatíveis com aqueles apresentados por Tietz¹⁹ (1995) em urina humana.

3. Comparando-se o biossensor de extrato bruto de PFO com o de extrato parcialmente purificado de banana nanica observou-se um aumento nos valores de porcentagem de erro relativo (nas amostras de urina humana estudadas), para este último.

4. A vantagem de se usar o biossensor de extrato parcialmente purificado está na quantidade de enzima a ser imobilizada; 50 unidades a menos que o de extrato bruto (Bonfim *et al.*³, 2000, Perone¹⁵, 2004), entretanto o tempo de purificação é longo. Assim,

concluiu-se que para trabalhos futuros poderá ser utilizado o biossensor de extrato bruto para futuras determinações amperométricas ao invés do purificado pois, diminuí o tempo de análise, sem perda de detecção.

5. Esses métodos amperométricos desenvolvidos podem ser utilizados como métodos alternativos rápidos, práticos e de baixo custo para a análise e/ou monitoramento de fenóis em diversas amostras, quando comparados com métodos cromatográficos ou espectrofotométricos.

Agradecimentos

À Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UNIP – Universidade Paulista, pelo auxílio financeiro, ao INTEP pelo empréstimo do oxímetro e à FAPESP pelo auxílio para iniciação científica.

Referências

1. Bastos, ML, Baselt RC, Andrews LS. Detection of basic organic drugs and their metabolites in urine. *Clin Chem* 1970; 16: 53-8.
2. Bergmeyer HU, Berndt A, Grasse M, Michael G. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Verlag Chemie; 1974.
3. Bonfim EJ, Gomes GC, Araújo FH de, Migliorança LH, Perone CAS. Determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos usando extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). *Rev Inst Ciênc Saúde* 2000; 18 (2): 87-94.
4. Corbett CE. *Farmacodinâmica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977. 140 p.
5. Crammer MF. Determination of p-nitrofenol in human urine. *Bull Environ Contam Toxicol* 1970; 10: 73-80.
6. Deichmann, WB, Keplinger MC. *Phenols and phenolics compounds*. New York: Wiley; 1967. 235p.
7. Fatibello-Filho O, Capelato MD. Biossensores. *Quím Nova* 1992; 15(1): 28-39.
8. Folin O., Denis W. Determination of totals phenols. *J Biol Chem* 1912; 12: 239-48.
9. Gornael AG, Bardwill K, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-60.
10. Guilbault GG. *Analytical uses of immobilized enzymes*. New York: Marcel Dekker; 1984. 185 p.
11. Macholán L, Shánel L. Enzyme electrode with immobilized Polyphenol oxidase for determination of phenolic substrate. *Collect Czech Chem Commun* 1977; 42: 3667-75.
12. Neujahr HY. Bioprobe electrode for phenol. *Bio-technol Bioeng* 1980; 22: 913-8.
13. Perone CAS. *Determinação amperométrica e espectrofotométrica de fenóis usando extrato bruto de inhame (Alocasia macrorrhiza)*. [tese de doutorado] Araraquara: Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho; 1996.
14. Perone CAS. Determinação amperométrica de polifenóis em urina humana usando extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). *Rev Inst Ciênc Saúde* 2003; 21(1): 7-12.
15. Perone CAS. *Purificação parcial e caracterização cinética da enzima Polifenol oxidase de banana nanica (Musa acuminata) com determinação espectrofotométrica e amperométrica de compostos fenólicos presentes em amostras de chá e em urina humana*. Relatório Final de Pesquisa. São José do Rio Preto: Universidade Paulista, Campus JK; 2004.
16. Post G, Snyder R, Kalf GF. Metabolism of benzene and phenol in macro-phages *in vitro* and inhibition of RNA synthesis by benzene metabolites. *Cell Biol Toxicol* 1986; 2: 231-46.
17. Signori CA, *Purificação parcial da PFO extraída do Inhame*. [monografia] Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho; 1984.
18. Signori CA, Fatibello-Filho O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). *Quím Nova* 1994; 17(1): 38-42.
19. Tietz NW editor. *Clinical guide to laboratory tests*. 3ª ed. Philadelphia: Saunders; 1995. 478 p.

Recebido em 07/4/2005

Aceito em 10/6/2005

