

Eclética Química

Print version ISSN 0100-4670 On-line version ISSN 1678-4618

Eclet. Quím. vol.27 São Paulo 2002

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702002000100005>

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA POR INJEÇÃO EM FLUXO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS EMPREGANDO PEROXIDASE DE ABOBRINHA (*Cucurbita pepo*)

Orlando FATIBELLO FILHO*

Micheli Guarento de SOUZA*

Iolanda da Cruz VIEIRA**

RESUMO: Empregou-se nesse trabalho alguns vegetais como fonte de *peroxidase*. Após a determinação de proteína total, atividade e atividade específica, selecionou-se o extrato bruto da abobrinha (*Cucurbita pepo*) como fonte dessa enzima para ser empregado em um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de diversos compostos fenólicos (e.g. fenol, catecol, 2,4-diclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 4-acetamidofenol, 4-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol e hidroquinona). Após a otimização desse sistema em fluxo, o mesmo foi empregado na determinação de compostos fenólicos em águas residuárias de indústrias da região de São Carlos-SP, no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com LD de $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e frequência analítica de 58 h⁻¹. A recuperação de fenol em 3 amostras variou de 98,3 a 106, 2% e o RSD foi menor que 1,2% para soluções de fenol nas concentrações de $6,0 \times 10^{-4}$ e $8,0 \times 10^{-4}$ mol l⁻¹ (n=10).

PALAVRAS-CHAVE: Extrato bruto; peroxidase; enzima; compostos fenólicos; água residuária.

Introdução

A poluição do meio ambiente tornou-se assunto mundial de interesse público. Nos efluentes de diversas indústrias e esgotos domésticos (papel e celulose, tintas, uso de germicidas e desinfetantes) estão presentes os compostos fenólicos, que mesmo em baixas concentrações são tóxicos, causando dano à fauna e à flora e prejudicando a saúde^{8,9,13}.

Há um grande interesse no desenvolvimento de métodos enzimáticos empregando-se tecidos e/ou extratos brutos de vegetais no lugar de enzimas purificadas na confecção de biossensores^{1,6,11-13} e/ou procedimentos enzimáticos de análise^{5,14-17}. A utilização desses métodos enzimáticos oferece grandes vantagens. Entre elas, podem-se destacar a grande disponibilidade de material biológico vegetal no Brasil, baixo custo, alta concentração enzimática e boa estabilidade.

A *peroxidase* (E.C.:1.11.1.7)^{3,18} é uma enzima óxido-redutase presente em vários vegetais como pêssigo, abobrinha, tomate, soja, rabanete, nabo e batata doce^{1,5,6,11-17} e pode ser usada nos mais diversos procedimentos analíticos para a determinação de espécies químicas de interesse. Essa enzima, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação de alguns substratos como monofenóis, difenóis, polifenóis, entre outros. Procedimentos enzimáticos para a quantificação de compostos fenólicos são de grande interesse devido principalmente a alta toxicidade desses compostos.

O método padrão recomendado pela CETESB (Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico)² e pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater⁴ para determinação de compostos fenólicos em águas naturais, de abastecimento, residuárias e águas do mar usam o reagente 4-aminoantipirina.. Esse método foi adaptado em análise por injeção em fluxo para determinação de fenóis por Möller & Martin¹⁰. Nesse método há a condensação do fenol com 4-aminoantipirina com subsequente oxidação alcalina e detecção espectrofotométrica do produto formado. Obteve-se linearidade de 1-15 mg L⁻¹ de fenol e limite de detecção de 0,04 mg L⁻¹. Uma frequência analítica de 105 determinações h⁻¹ e um desvio padrão relativo menor ou igual a 1,5% foram também obtidos.

Outro método espectrofotométrico manual e em fluxo para a quantificação de fenóis foi desenvolvido por Khalaf et al⁷. Baseado na reação com o p-aminofenol, utilizou-se como reagente o metaperiodato de potássio em meio alcalino e oxigênio dissolvido como oxidantes. O limite de detecção deste método foi de 64 ng mL⁻¹ de fenol.

Nesse trabalho foram selecionados os vegetais abobrinha (*Cucurbita pepo*), inhame (*Alocasia macrorrhiza*), pêssigo (*Prunus persica*) e rabanete (*Armoracia rusticana*) como fonte de *peroxidase*. Após a determinação de proteína total, atividade e atividade específica, selecionou-se o extrato bruto da abobrinha (*Cucurbita pepo*) como fonte dessa enzima para ser empregado em um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de compostos fenólicos em águas residuárias de indústrias da região de São Carlos/SP.

Experimental

Equipamentos

O extrato bruto da abobrinha (*Cucurbita pepo*) foi homogeneizado em um liquidificador Firenze da Walita, mod. RI6755 e o homogenato foi centrifugado em uma centrifuga Du Pont Instruments Sorval, mod. RC-5B, provida de rotor, mod. SS-34 com diâmetro de 23 cm.

As medidas espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro Femto, mod. 435 com um

célula de quartzo (caminho óptico 1,0 cm) conectado a um registrador Cole Parmer (Niles, IL, USA, modelo 12020000 de dois canais). O efeito da temperatura na reação enzimática foi feito usando-se um banho termostático Tecnal, mod. TE 184. Para propulsão das soluções de referência, reagentes e amostras utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec (Zurich, Switzerland, modelo 7618-40) e tubos de bombeamento de Tygon de vários diâmetros internos. As soluções das amostras e de referência foram introduzidas no sistema de análise por injeção em fluxo, utilizando-se um comutador automático Micronal, mod. B352 e tubos de extensão de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno e conectores de acrílico foram utilizados na montagem de todo o sistema de injeção em fluxo (Figura 1). As medidas espectrofotométricas do método comparativo⁴, foram feitas com um espectrofotômetro Hewlett Packard (USA, modelo 8452 A).

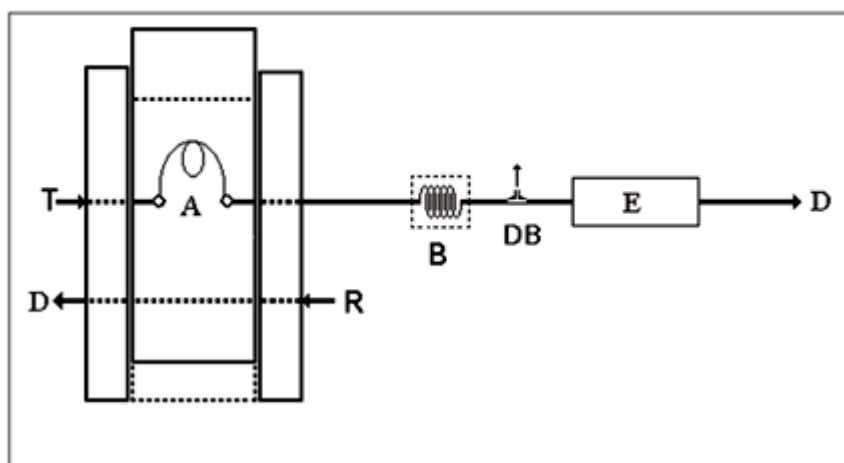


FIGURA 1- Diagrama do sistema por injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos em águas residuárias: T= Solução transportadora (solução de fenol $8,0 \times 10^{-4}$ e peróxido de hidrogênio $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0)); A=Alça do reagente de 50 cm (250 µL); R= Extrato bruto de abobrinha contendo 500 unidades de *peroxidase* por mL em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) com vazão de 1,7 mL min⁻¹; B=Reator helicoidal de 50cm; DB=Desburbulhador em forma de T com vazão de 0,2 mL min⁻¹; E=Célula espectrofotométrica ($\lambda=420$ nm) e D=Descarte.

Para as medidas de pH das soluções, empregou-se um pHmetro Orion, mod. EA 940, com precisão de 0,1 mV (ou 0,001 unidades de pH) contendo um eletrodo de vidro Ingold, modelo 10/402/3092.

Reagentes e soluções

Fenol, catecol, 2,4-diclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 4-acetamidofenol, 4-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol e hidroquinona de grau analítico foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) e, utilizados para preparação das soluções de referência. A água empregada na preparação das soluções foi proveniente de um sistema Milli-Q Millipore (Redford, MA, USA, modelo UV Plus Ultra-baixo teor de compostos orgânicos dissolvidos).

Para a construção da curva analítica e determinação da atividade enzimática da *peroxidase*, uma solução estoque de fenol $0,05$ mol L⁻¹ foi preparada recentemente pela dissolução de 0,2353 g desse

reagente (Sigma) em um balão volumétrico de 50 mL com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0). Após padronização, as soluções de referência nas concentrações de 2,0x10⁻⁴ a 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ foram preparadas diariamente, por diluições da solução estoque.

A solução de peróxido de hidrogênio 1,03x10⁻² mol L⁻¹ foi preparada diariamente pela diluição de 1,0 mL desse reagente (Sigma) em tampão fosfato (pH 6,0) em balão volumétrico de 10 mL.

Obtenção do extrato bruto e determinação da atividade enzimática

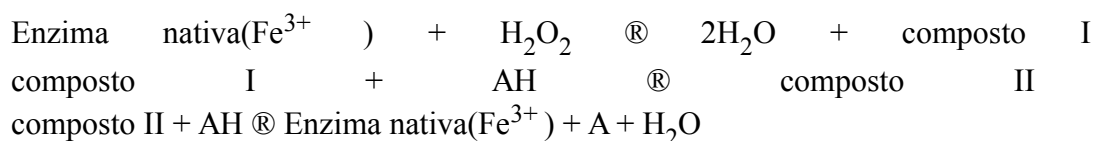
Após lavagem e secagem da abobrinha, pesou-se 25 g deste vegetal descascado e homogeneizou-se em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), contendo 2,5 g de agente protetor (Polyclar SB-100). O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gazes e centrifugado à 25.000xg (18.000 r.p.m.), durante 10 min a 4°C^{1,5,6,11-17}. Em seguida, o sobrenadante foi dividido em diversas alíquotas de 10 mL, armazenadas em refrigerador a 4°C e usados como fonte da enzima *peroxidase*¹⁷.

A atividade da *peroxidase*¹⁷ presente na abobrinha foi determinada pela medida de absorbância (420 nm) da o-quinona formada na reação entre 0,2 mL da solução sobrenadante enzimática, 2,7 mL da solução de fenol 0,05 mol L⁻¹ e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 1,03x10⁻² mol L⁻¹, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) a 25°C, durante 3 min.

Sistema de análises por injeção em fluxo

A [Figura 1](#) mostra o esquema do sistema de análise por injeção em fluxo com amostragem contínua de fluxo não segmentado. Nesse sistema, a solução de fenol (soluções de referência ou amostra) e peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) é continuamente bombeada em uma vazão de 1,7 mL min⁻¹. O reagente (*peroxidase* 500 unidades/mL em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,0) preenche uma alça A (50 cm; 250 mL) e após comutação (posição mostrada na figura) reage com o composto fenólico na bobina reacional B (50 cm), e a quinona correspondente formada (composto A) no ciclo catalítico envolvendo a peroxidase nativa, enzima nativa (Fe³⁺) (ver esquema), é detectada na célula espectrofotométrica E (λ=420 nm). Após a detecção do cromóforo (composto A), a solução é descartada em D. Entre as amostragens, há entrada de ar no sistema. Objetivando remover as bolhas de ar da zona de amostra, foi adaptado um desborbulhador de vidro em forma de "T" (DB) em uma vazão de 0,2 mL min⁻¹. As soluções de fenóis do descarte D são tratadas posteriormente, antes de serem descartadas no ambiente.

O esquema catalítico envolvendo a peroxidase nativa (enzima nativa (Fe³⁺)), peróxido de hidrogênio e um composto fenólico (AH) pode ser dado pelas três reações seguintes¹⁹:



Procedimento espectrofotométrico padrão

O procedimento espectrofotométrico padrão utilizado para a determinação de compostos fenólicos

em águas residuárias (método comparativo) foi aquele recomendado pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater⁴.

Resultados e discussão

Obtenção do extrato bruto enzimático

A atividade enzimática varia de acordo com o procedimento de extração e também do vegetal empregado. A [Tabela 1](#) apresenta os resultados obtidos de proteína total (mg mL^{-1}), atividade (unidades mL^{-1}) e atividade específica (unidades mg^{-1}) dos extratos brutos de abobrinha (*Cucurbita pepo*), inhame (*Alocasia macrorrhiza*), pêsego (*Prunus persica*) e rabanete (*Armoracia rusticana*). Os vegetais utilizados nesse estudo foram previamente selecionados levando-se em consideração os resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa¹⁷. A abobrinha I possui extremidades alongadas, enquanto que a abobrinha II tem uma das extremidades arredondadas com superfície rajada (variedade diferente).

Tabela 1 - Proteína total, atividade e atividade específica da *peroxidase* do extrato bruto de diferentes tecidos vegetais.

Vegetal	Proteína Total (mg mL^{-1})	Atividade (U mL^{-1})	Atividade Específica (U mg^{-1} de proteína)
Pêssego	2,45	180,2	73,6
Inhame	5,84	540,2	92,5
Abobrinha I	0,20	330,3	1651,5
Rabanete	0,33	2732,7	8280,9
Abobrinha II	0,30	2762,8	9209,3

Otimização dos parâmetros do sistema de análise por injeção em fluxo

O extrato bruto obtido da abobrinha (*Cucurbita pepo*), fonte da enzima *peroxidase*, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação dos compostos fenólicos (doadores de prótons e elétrons) produzindo a o-quinona correspondente que absorve em 420 nm (reação 1). Com base nessa reação enzimática, inicialmente foram investigados o efeito do volume alça de reagente, comprimento da bobina reacional e vazão das soluções de referência ou de amostra.

Estudou-se o comprimento da alça de reagente de 25,0 a 100,0 cm (volumes de 125,0 a 500,0 mL) para solução de fenol $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) e como reagente 500 unidades da enzima *peroxidase* por mL de solução. Foi observado que o sinal analítico (absorbância) aumentou até a alça de reagente 50,0 cm (250,0 mL), permanecendo constante para as alças com volumes superiores. Assim, selecionou-se essa alça de reagente para o desenvolvimento desse trabalho.

Em seguida, estudou-se o efeito do comprimento da bobina reacional de 40 a 80 cm sobre o sinal

analítico. A maior sensibilidade foi alcançada usando-se a bobina de 50 cm, sendo essa então selecionada para os trabalhos posteriores.

Finalmente, estudou-se o efeito da vazão de 0,3 a 2,8 mL min⁻¹ da solução de referência de fenol 8,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0). O sinal analítico aumentou até a vazão de 1,7 mL min⁻¹, permanecendo constante nas vazões superiores. Sendo assim, escolheu-se essa vazão para a execução desse procedimento.

Efeito do pH

O efeito do pH de 5,0 a 7,5 sobre a reação enzimática empregando-se solução de fenol 8,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ foi também investigado. O sinal analítico aumentou até pH 6,0, diminuindo em valores de pH superiores, como mostra a [Figura 2](#). Foi selecionado assim esse pH para o desenvolvimento das etapas posteriores deste trabalho.

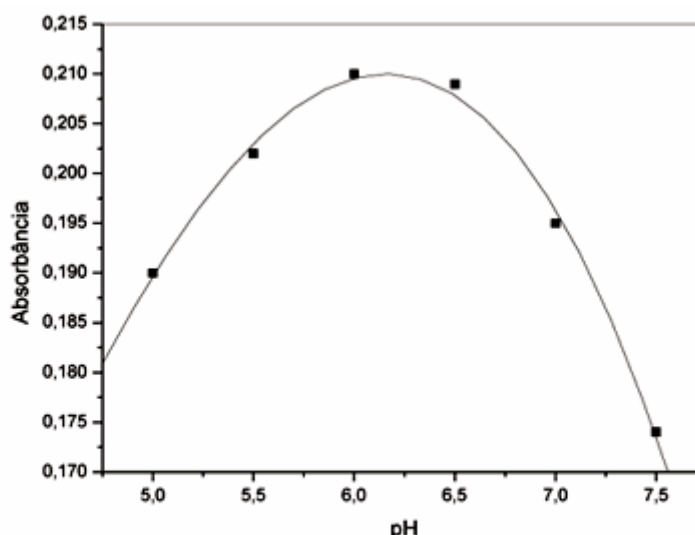


FIGURA 2 – Estudo do efeito do pH de 5,0 a 7,5, sobre a reação enzimática da *peroxidase* em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da figura 1.

Efeito da concentração da *peroxidase*

Estudou-se o efeito da concentração da enzima *peroxidase* de 59,0 a 587,0 unidades mL⁻¹, para soluções de fenol 8,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), sobre a resposta espectrofotométrica do sistema em fluxo proposto. Como pode ser observado na [Figura 3](#), a absorbância aumentou com o aumento da concentração da enzima no intervalo estudado. Uma concentração de 500,0 unidades mL⁻¹ foi selecionada para o desenvolvimento desse trabalho, pois apresentou mesma sensibilidade que aquela obtida empregando-se 600 unidades mL⁻¹.

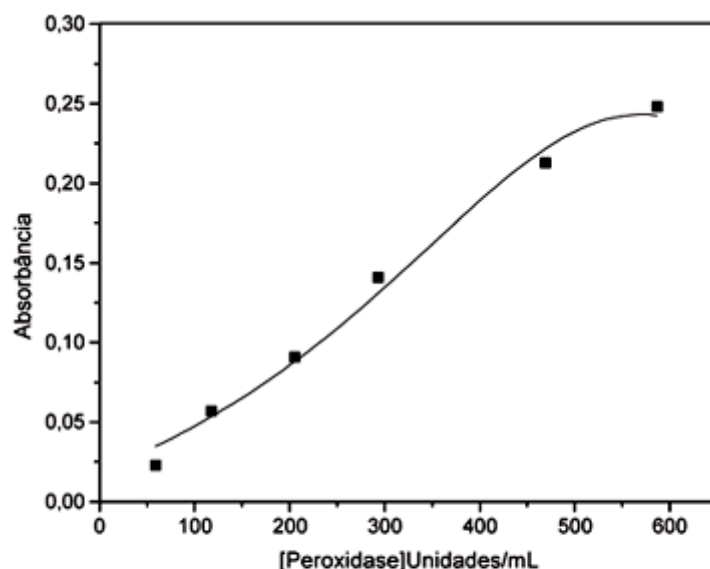


FIGURA 3 – Estudo do efeito da concentração da enzima *peroxidase* de 59,0 a 586,7 unidades mL⁻¹, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) sobre a resposta analítica do sistema FIA proposto. As demais condições experimentais estão descritas na legenda da figura 1.

Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio

A [Figura 4](#) apresenta os resultados obtidos no estudo do efeito da concentração do peróxido de hidrogênio de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, usando-se fenol $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e 500 unidades mL⁻¹ de *peroxidase*, nas condições experimentais descritas na legenda da [Figura 1](#), sobre a resposta analítica. As melhores sensibilidade e estabilidade da linha base foram obtidas no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de H₂O₂. Como as soluções de peróxido de hidrogênio apresentam baixas estabilidades, uma concentração de $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi selecionada nesse trabalho, garantindo assim maior sensibilidade do procedimento proposto.

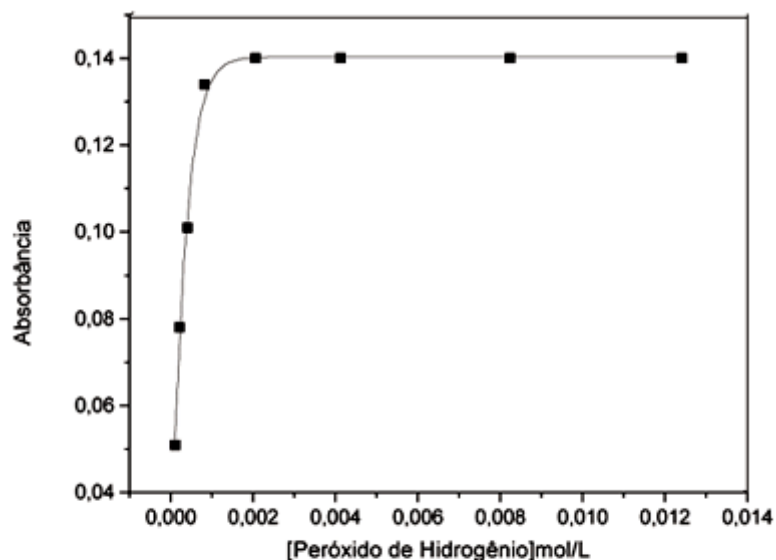


FIGURA 4 – Estudo do efeito da concentração de peróxido de hidrogênio de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ sobre a reação enzimática do fenol $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com *peroxidase* 500 unidades mL⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), a 25°C. As demais condições experimentais estão descritas na legenda da figura 1.

Resposta a vários substratos fenólicos

Investigou-se a resposta espectrofotométrica do sistema em fluxo para diferentes substratos fenólicos, como fenol, catecol, hidroquinona, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 4-cloro-3-metilfenol, 4-clorofenol, 4-acetamidofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol e pentaclorofenol, na concentração de 0,0125 mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, *peroxidase* 500 unidades mL⁻¹, sobre o sinal analítico.

A [Tabela 2](#) apresenta os valores de absorbância e respostas relativas para estes substratos obtidos. Os valores de respostas relativas (%) foram calculados em relação a resposta do fenol, que foi considerada 100%. Sendo assim, escolheu-se fenol como substrato para a obtenção da curva analítica, sendo portanto os teores de composto fenólicos encontrados nas águas residuárias expressos em relação a esse substrato.

Tabela 2 - Absorbâncias e respostas relativas de alguns substratos fenólicos obtidos usando-se extrato bruto de abobrinha contendo peroxidase 500 unidades mL⁻¹ e peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0)

Substrato	Absorbância	Resposta Relativa (%)
Fenol	0,383	100,0
Catecol	0,230	60,0
2,4-diclorofenol	0,131	34,2
m-cresol	0,056	14,6
4-cloro-3-metilfenol	0,037	9,7
4-acetamidofenol	0,024	6,3
4-clorofenol	0,006	1,6
o-cresol	0,003	0,8
p-cresol	0,003	0,8
2,4,6-triclorofenol	0,000	0
Hidroquinona	0,000	0

Efeito da temperatura

Em geral, as enzimas catalisam as reações enzimáticas muito lentamente em baixas temperaturas e sua atividade aumenta com o aumento da temperatura, até atingir uma atividade ótima, em temperaturas no intervalo de 20-50°C, além das quais começa a sua inativação^{3,18}.

Foi estudado o efeito da temperatura de 5,0; 15,0; 25,0; 35,0; 45,0 e 55 °C sobre a reação enzimática da *peroxidase*. Como pode ser observado na [Figura 5](#), a resposta analítica do sistema de análise por injeção em fluxo aumentou com o aumento da temperatura de 5 a 45°C, decrescendo em temperaturas superiores. Entretanto, como o aumento da resposta analítica entre as temperaturas 25-45°C não foi tão significativa, optou-se em trabalhar na temperatura de 25°C, devido as facilidades operacionais e também maior estabilidade do extrato enzimático contendo a enzima *peroxidase*.

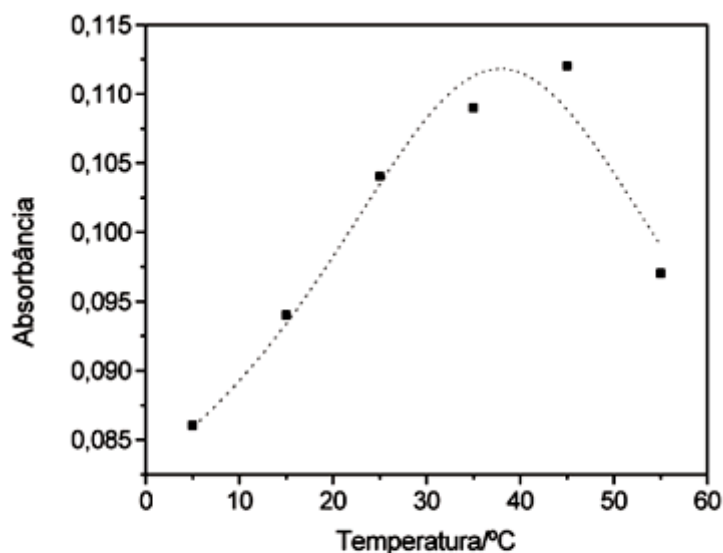


FIGURA 5 - Efeito da temperatura de 5 a 55°C sobre o sinal analítico utilizando fenol $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato $0,01$ mol L⁻¹ (pH 6,0) e 500 unidades de *peroxidase*. As demais condições experimentais estão descritas na legenda da figura 1.

Estudo da repetibilidade

Os sinais transientes obtidos para 10 injeções sucessivas de soluções de 500 unidades da enzima *peroxidase* em tampão fosfato $0,1$ mol/L (pH 6,0) foram investigados. Nesse estudo, foram selecionadas as concentrações $6,0 \times 10^{-4}$ e $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de fenol em peróxido de hidrogênio $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O sistema de análise por injeção em fluxo proposto apresentou uma boa repetibilidade, linha de base estável e um desvio padrão relativo de 1,2% e 0,5%, respectivamente.

Estudo da adição e recuperação de fenol em águas residuárias

Os dados obtidos no estudo de adição e recuperação de fenol em águas residuárias de indústrias de couro e tintas são apresentados na [Tabela 3](#). Adicionaram-se $6,0 \times 10^{-4}$ e $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de fenol nessas amostras, obtendo-se uma percentagem de recuperação variando de 98,3% a 106,2%, indicando portanto ausência de interferência da matriz sobre o procedimento em fluxo proposto.

Tabela 3 – Estudo de adição e recuperação de fenol em águas residuárias.

Amostras	Fenol (mol L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
A	6,0x10 ⁻⁴	6,2x10 ⁻⁴	103,3
	8,0x10 ⁻⁴	8,5x10 ⁻⁴	106,2
B	6,0x10 ⁻⁴	6,0x10 ⁻⁴	100,0
	8,0x10 ⁻⁴	8,3x10 ⁻⁴	103,8
C	6,0x10 ⁻⁴	5,9x10 ⁻⁴	98,3
	8,0x10 ⁻⁴	8,1x10 ⁻⁴	101,2

Curva analítica e análise de amostras de águas residuárias industriais

Empregando-se as melhores condições experimentais selecionadas como solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), extrato bruto de abobrinha contendo *peroxidase* 500 unidades mL⁻¹, concentração de peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ e parâmetros do sistema em fluxo especificados na legenda da [Figura 1](#), construiu-se uma curva analítica para o fenol. A curva analítica foi obtida por aspiração contínua de soluções de fenol nas concentrações de 2,0x10⁻⁴; 4,0x10⁻⁴; 6,0x10⁻⁴; 8,0x10⁻⁴; 2,0x10⁻³ e 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ em peróxido de hidrogênio 4,0x10⁻³ mol L⁻¹ e inserção em triplicata do reagente (R). O sistema apresentou linearidade nesse intervalo de concentração (2,0x10⁻⁴ a 4,0x10⁻³ mol L⁻¹) ($A = -0,0136 + 60,310 \text{ mol L}^{-1}[B]$, onde A é a absorbância e [B] e a concentração molar de fenol) com um limite de detecção de 8,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica). A [Figura 6](#) apresenta os sinais transientes obtidos em triplicata para as soluções de referência de fenol no intervalo de concentração supramencionado, sinais transientes em quintuplicata para amostras de águas residuárias não tratadas (A e B) e tratada (C) de indústria de couro e águas residuárias tratada (D) e não tratada (E) de indústria de tintas e novamente sinais transientes em triplicata das soluções de referência de fenol em concentrações decrescentes. A [Tabela 4](#) apresenta os teores de compostos fenólicos encontrados nas águas residuárias de indústrias da região de São Carlos empregando-se os métodos em fluxo proposto e o espectrofotométrico oficial⁴. Assim, os teores de compostos fenólicos encontrados são expressos em mg mL⁻¹ de fenol (composto tomado como padrão ou referência). Aplicando-se o test t pareado nos resultados obtidos empregando-se esses procedimentos, encontrou-se que os mesmos são concordantes a um nível de confiança de 95% , dentro de um intervalo de erro relativo aceitável mostrando assim bom desempenho do procedimento em fluxo proposto.

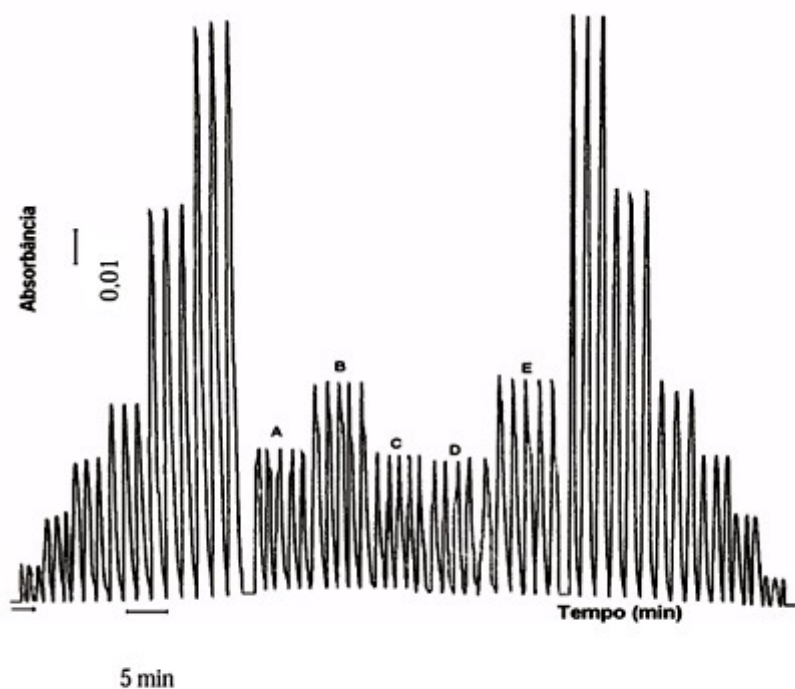


FIGURA 6 – Sinais transientes obtidos com soluções de fenol de $2,0 \times 10^{-4}$, $4,0 \times 10^{-4}$, $6,0 \times 10^{-4}$, $8,0 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e amostras de águas residuárias não tratadas, de indústrias de couro e tinta (A, B e E) e amostras de águas residuárias tratadas de indústrias de couro e tinta (C e D).

Tabela 4 – Determinação de compostos fenólicos em águas residuárias de indústrias da região de São Carlos pelos métodos oficial¹⁶ e o enzimático em fluxo.

Amostras	Fenol (mg mL^{-1})		Erro relativo (%)	Coeficiente de Variação
	Método oficial	Enzimático-FIA		
A	$0,063 \pm 0,002$	$0,067 \pm 0,003$	+6,3	4,0
B	$0,094 \pm 0,001$	$0,092 \pm 0,001$	-2,1	1,4
C	$0,062 \pm 0,002$	$0,065 \pm 0,001$	+4,8	2,0
D	$0,060 \pm 0,007$	$0,065 \pm 0,001$	+8,3	2,3
E	$0,108 \pm 0,002$	$0,111 \pm 0,003$	+2,8	3,0

A=água não tratada (Indústria de couro); B=água não tratada (Indústria de couro);
 C= água tratada (Indústria de couro); D=água não tratada (Indústria de tintas);
 E = água tratada (Indústria de tintas)

Conclusões

O tecido vegetal da abobrinha (*Cucurbita pepo*) possui uma alta atividade da enzima *peroxidase*. Essa enzima pode ser usada nos mais diversos procedimentos analíticos para determinação de analitos de interesse.

O sistema FIA proposto apresentou uma boa precisão, exatidão e uma frequência analítica de 58 h⁻¹, podendo assim ser usado como método alternativo aos métodos espectrofotométricos usuais, além disso esse procedimento é simples e de baixo custo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP, CNPq e PADCT/CNPq o apoio financeiro obtido, bem como a bolsa de iniciação científica da FAPESP da aluna MGS.

FATIBELLO FILHO, O., SOUZA, M. G., VIEIRA, I. C. Flow injection spectrophotometric determination of phenolic compounds in wastewaters using peroxidase of zucchini (*Cucurbita pepo*). *Ecl. Quím. (São Paulo)*, v.27, p. , 2002.

ABSTRACT: *In this work some vegetables were used as peroxidase source. After the determination of total protein, activity and specific activity, the crude extract of zucchini (Cucurbita pepo) was selected as peroxidase source and used in a flow injection spectrophotometric procedure for the determination of several phenolic compounds such as phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol, 4-chloro-3-methylphenol, 4-acetamidophenol, 4-chlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol and hydroquinone. After the optimization of the flow injection system, it was used in the determination of phenolic compounds in local industries wastewaters in the concentration range from 2.0x10⁻⁴ to 4.0x10⁻³ mol L⁻¹, with detection limit of 8.0x10⁻⁵ mol L⁻¹ and analytical frequency of 58 h⁻¹. The recovery of phenol from three samples ranged from 98.3 to 106.2% and RDS were less than 1.2 % for solutions containing 6.0x10⁻⁴ and 8.0x10⁻⁴ mol L⁻¹ phenol (n=10).*

KEYWORDS: *Crude extract; peroxidase; enzyme; phenolic compounds; wastewater.*

Referências bibliográficas

- 1 CARUSO, C. S.; VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Dioscorea bulbifera*). *Anal. Lett.*, v.32, p.39-50, 1999. [[Links](#)]
- 2 Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico (CETESB). *Determinação de fenóis em águas – método colorimétrico da 4-aminoantipirina*. São Paulo: 1990. 125p. [[Links](#)]
- 3 DIXON, M.; WEBB, E.C. *Enzymes*. New York: Academic Press. p. 3-44, 1979. [[Links](#)]
- 4 EATON, A. D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A. E. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19.ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. p. 5-36, 1995. [[Links](#)]
- 5 FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Construction and analytical application of a biosensor based os stearic acid-graphite powder modified with sweet potato tissue in organic solvents. *Fres. J.*

Anal. Chem., v.368, p.338-342, 2000. [[Links](#)]

6 FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase. *Anal. Chim. Acta*, v.354, p.51-55, 1997. [[Links](#)]

7 FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). *J. Braz. Chem. Soc.*, v.11, p.412-418, 2000. [[Links](#)]

8 KHALAF, K.D.; HASAN, B.A.; MORALES-RUBIO, A.; LA-GUARDIA, M. Spectrophotometric determination of phenols with sodium metaperiodate and aminophenols, *Talanta*, v.29, p.917-920, 1982. [[Links](#)]

9 MANAHAN, S.E. *Fundamentals of environmental chemistry*. Tokyo: Lewis Publishers. 1993. 756p. [[Links](#)]

10 MOHLER, E. F.; JACOB, L.N. Determination of phenolic-type compounds in water and industrial wastewater: comparison of analytical methods. *Anal. Chem.*, v.29, p.1369-1371, 1957. [[Links](#)]

11 MÖLLER, J.; MARTIN, M. Determination of phenol in water by flow injection analysis. *Fres. Z. Anal. Chem.*, v.329, p.728-731, 1988. [[Links](#)]

12 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Amperometric biosensor for the determination of phenols using a crude extract of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Anal. Lett.*, v.30, p.895-907, 1997. [[Links](#)]

13 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*, v.52, p.681-689, 2000. [[Links](#)]

14 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. *Anal. Chim. Acta*, v.366, p.111-118, 1998. [[Links](#)]

15 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. L-Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. *Anal. Chim. Acta*, v.366, p.287-293, 1998. [[Links](#)]

16 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Spectrophotometric determination of methyl dopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. *Talanta*, v.46, p.559-564, 1998. [[Links](#)]

17 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; ANGNES, L. Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. *Anal. Chim. Acta*, v.398, p.145-151, 1999. [[Links](#)]

18 VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxidase using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. *Analyst*, v.123, p.1809-1812, 1998. [[Links](#)]

19 WHITAKER, J.R. *Principles of enzymology for the food science*. New York: Marcel Dekker.

p.45-59, 1972. [[Links](#)]

Recebido em 27.08.2001.

Aceito em 05.11.2001.

*-Departamento de Química – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar – 13560-970 – São Carlos – SP – Brasil.

**-Faculdade de Farmácia/Bioquímica e Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Cuiabá – UNIC – 78015-480 – Cuiabá – MT – Brasil.