



Paulina Viegas Festas Santos

Comportamento electroquímico das cianotoxinas
Microcistina-LR e Nodularina e dos seus
produtos de degradação

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2011



Paulina Viegas Festas Santos

**COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO DAS
CIANOTOXINAS MICROCISTINA-LR E NODULARINA
E DOS SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,
área de especialização em Química Forense**

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira Brett

Junho 2011

Universidade de Coimbra

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar à Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade concedida, pela orientação científica ao longo de todo o trabalho, e pela flexibilidade que me permitiu conciliar a frequência do Mestrado com o trabalho no laboratório.

Agradeço ao Instituto Pedro Nunes as bolsas concedidas no âmbito dos projectos PTDC/QUI/65255/2006 e PTDC/SAU-BEB/104643/2008 financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Ao Doutor Victor Constantin Diculescu e à Doutora Ana-Maria Chiorcea Paquim agradeço de modo especial a partilha da vasta experiência científica, a disponibilidade constante e o precioso auxílio e ensinamento ao longo destes dois anos.

A todos os meus colegas de laboratório no Instituto Pedro Nunes, agradeço o companheirismo e amizade constantes.

A todos os meus amigos agradeço o apoio constante e o ânimo no decorrer desta etapa.

A toda a minha família, de um modo especial aos meus pais e ao meu marido, José Miguel Perdigão, desejo agradecer todo o carinho, o incentivo permanente, o voto de confiança que em mim depositaram, a compreensão e o apoio constantes. São eles os pilares do que hoje sou.

ÍNDICE/TABLE OF CONTENTS

Abreviaturas/Abbreviations	i
Resumo	ii
Abstract	iii
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	1
1.1 Cianobactérias	2
1.2 Cianotoxinas	3
1.2.1 Microcistina-LR.....	4
1.2.2 Nodularina.....	5
1.2.3 Aminoácidos constituintes da MC-LR e da NOD	6
1.3 Hepatotoxicidade	8
1.4 Genotoxicidade e potencial carcinogénico.....	8
1.5 Métodos de detecção e degradação de cianotoxinas	9
1.6 Ácido Sórbico.....	10
1.7 Princípios de Electroquímica	12
1.7.1 Técnicas de voltametria.....	14
1.7.1.1 Voltametria Cíclica	14
<i>Transferência electrónica reversível</i>	<i>16</i>
<i>Transferência electrónica irreversível</i>	<i>17</i>
1.7.1.2 Técnicas de degrau e impulso	17
<i>Voltametria de Impulso Diferencial</i>	<i>18</i>
<i>Voltametria de Onda Quadrada</i>	<i>19</i>
1.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	20
CAPÍTULO 2	
EXPERIMENTAL	23
2.1 Reagentes e soluções.....	24
2.2 Instrumentação	26
2.2.1 Experiências electroquímicas	26
2.2.2 Espectrofotometria de UV-Vis.....	27
2.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27

CAPÍTULO 3

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO ÁCIDO SÓRBICO	29
3.1 Oxidação electroquímica do SA	30
3.1.1 Voltametria Cíclica.....	30
3.1.2 Voltametria de Impulso Diferencial.....	31
3.2 Comportamento electroquímico do SA quimicamente degradado	32
3.2.1 Voltametria de Impulso Diferencial e efeito do pH.....	33
3.2.2 Voltametria de Onda Quadrada	37
3.3 Espectrofotometria de UV-Vis	38
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	39
3.5 Mecanismo de oxidação e de degradação do SA.....	41

CAPÍTULO 4

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA MICROCISTINA-LR	43
4.1 Teste dos aminoácidos constituintes da MC-LR.....	44
4.1.1 Leu, Arg, Ala, Glu e Asp	44
4.1.2 <i>N</i> -metildesidroalanina (Mdha)	45
4.1.3 Adda.....	46
4.2 Comportamento electroquímico da MC-LR.....	46
4.2.1 Voltametria Cíclica.....	46
4.2.2 Voltametria de Onda Quadrada.....	47
4.2.3 Voltametria de Impulso Diferencial.....	48
4.3 Comportamento electroquímico da MC-LR quimicamente degradada.....	50
4.3.1 Voltametria Cíclica.....	50
4.3.2 Voltametria de Onda Quadrada.....	51
4.3.3 Voltametria de Impulso Diferencial.....	53
4.4 Espectrofotometria de UV-Vis	58
4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	58
4.6 Mecanismo de Oxidação da MC-LR.....	59

CAPÍTULO 5

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA NODULARINA.....	64
5.1 Comportamento electroquímico da NOD	65
5.1.1 Voltametria Cíclica.....	65
5.1.2 Voltametria de Onda Quadrada.....	66
5.1.3 Voltametria de Impulso Diferencial.....	67
5.2 Comportamento electroquímico da NOD quimicamente degradada	69
5.2.1 Voltametria Cíclica.....	69
5.2.2 Voltametria de Onda Quadrada.....	70
5.2.3 Voltametria de Impulso Diferencial.....	71
5.3 Espectrofotometria de UV-Vis	77
5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	77
5.5 Mecanismo de oxidação da NOD	78

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES	82
-------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	85
---------------------------	-----------

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS

2-AAA	Ácido 2-acetamidoacrílico
Adda	Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
a. u.	Unidades arbitrárias/ <i>Arbitrary units</i>
Ala	Alanina
cdMC-LR	Microcistina-LR quimicamente degradada
cdNOD	Nodularina quimicamente degradada
cdSA	Ácido sórbico quimicamente degradado
CE	Electroforese capilar/ <i>capillary electrophoresis</i>
CV	Voltametria cíclica/ <i>cyclic voltammetry</i>
D-MeAsp	Ácido D- <i>eritro</i> - β -metil aspártico
DPV	Voltametria de impulso diferencial/ <i>differential pulse voltammetry</i>
ELISA	Ensaio imuno-enzimático/ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GCE	Eléctrodo de carbono vítreo/ <i>glassy carbon electrode</i>
Glu	Glutamato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência/ <i>high performance liquid chromatography</i>
HPLC-RP	HPLC de fase reversa
HS-GC	Cromatografia gasosa de <i>headspace</i>
Leu	Leucina
LD₅₀	Dose letal média
MCs	Microcistinas
MC-LR	Microcistina-LR
Mdha	N-metildesidroalanina
Mdhb	N- metildesidrobutilina
MS	Espectrometria de massa/ <i>mass spectrometry</i>
NOD	Nodularina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	Detector de fotodíodos/ <i>photodiode-array detector</i>
PP1	Fosfatase de serina/treonina 1
PP2A	Fosfatase de serina/treonina 2A
RMN	Ressonância magnética nuclear/ <i>nuclear magnetic resonance</i>
SA	Ácido sórbico/ <i>sorbic acid</i>
SPE	Extracção em fase sólida/ <i>solid phase extraction</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada/ <i>square wave voltammetry</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

RESUMO

A microcistina-LR (MC-LR) e a nodularina (NOD) são duas potentes hepatotoxinas produzidas por várias estirpes de cianobactérias. O presente trabalho teve como objectivo investigar o comportamento electroquímico da MC-LR e da NOD na superfície de um eléctrodo de carbono vítreo (GCE), bem como dos produtos da sua degradação em meio aquoso.

A MC-LR e a NOD são oxidadas irreversivelmente numa reacção independente do pH que ocorre com a transferência de um electrão. Foi também investigado o comportamento electroquímico dos aminoácidos constituintes das hepatotoxinas. Os centros electroactivos da MC-LR e da NOD, responsáveis pela resposta electroquímica de cada uma das toxinas, foram determinados.

Após a incubação em diferentes electrólitos de suporte, a MC-LR e a NOD apresentaram alterações no seu perfil electroquímico, devido à degradação química destas toxinas em solução. Os produtos de degradação são electroactivos, sendo oxidados à superfície do GCE numa reacção de transferência de electrão irreversível, dependente do pH do electrólito de suporte e na qual são transferidos um electrão e um protão. Os produtos de oxidação resultantes são posteriormente oxidados reversivelmente com a transferência de dois electrões e de dois protões, dependente do pH.

A degradação das toxinas MC-LR e NOD foi confirmada por HPLC-UV e, após comparação com compostos análogos, foram propostos mecanismos para a oxidação e para a degradação da MC-LR e da NOD.

ABSTRACT

Microcystin-LR (MC-LR) and nodularin (NOD) are two potent hepatotoxins produced by several strains of cyanobacteria. The aim of this work was to investigate the electrochemical behaviour of MC-LR and NOD at a glassy carbon electrode (GCE) surface, as well as the products of their degradation in aqueous solutions.

MC-LR and NOD are irreversibly oxidized at the GCE surface with the transfer of one electron, independently from the pH of the supporting electrolyte solution. The electrochemical behaviour of the hepatotoxins constituent amino acids was investigated and the electroactive centres responsible for MC-LR and NOD electrochemical activities were determined.

Upon incubation in different buffer solutions, the chemical degradation of MC-LR and NOD was detected by the appearance of new oxidation peaks at a lower potential value. The degradation products are electroactive and they are oxidized at the GCE surface through an irreversible electron transfer reaction, which depends on the pH of the buffer solution and involves the transfer of one electron and one proton. Their oxidation products are reversibly oxidized in a pH-dependent reaction occurring with the transfer of two electrons and two protons.

MC-LR and NOD degradation was confirmed by HPLC-UV and, after comparison with analogue compounds, mechanisms for the oxidation and for the degradation of the toxins were proposed.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A Química Forense consiste na aplicação da química analítica ao serviço da justiça para o estabelecimento da verdade e para o cumprimento das leis em vigor, através de análises de cariz qualitativo e quantitativo [1]. Neste contexto, a química forense auxilia a toxicologia forense, colaborando na detecção e caracterização de substâncias tóxicas que provocam efeitos fisiológicos adversos.

As toxinas são compostos nocivos produzidos por uma grande variedade de organismos. Muitos destes organismos são microorganismos, como por exemplo as cianobactérias, que produzem várias cianotoxinas de elevada toxicidade. Os efeitos adversos resultantes da exposição a toxinas, que muitas vezes culminam na morte do organismo hospedeiro, tornam a detecção deste grupo de compostos numa finalidade central das ciências forenses.

Dada a elevada ocorrência de cianotoxinas em diversas matrizes naturais [2], e embora tenham sido já investigados diferentes métodos de isolamento, detecção e quantificação destes compostos [3], existe actualmente uma necessidade crescente de desenvolvimento de novas técnicas analíticas para a detecção destas substâncias de forma rápida, eficaz e pouco dispendiosa, não só para a monitorização e controlo da qualidade de produtos consumíveis, como também para a aplicação em análises forenses.

1.1 Cianobactérias

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, são organismos procarióticos Gram-negativos com capacidade fotossintética [4]. A sua existência na Terra data desde há cerca de 3,5 mil milhões de anos, e pensa-se que terão sido os organismos responsáveis pela oxigenação da atmosfera terrestre primitiva e pela existência dos plastídeos nas plantas [5].

Apesar de serem bactérias Gram-negativas, as cianobactérias não são vistas como organismos patogénicos, pois não há registos de que possam multiplicar-se nos organismos hospedeiros. No entanto, as cianobactérias podem viver em simbiose com algumas plantas e juntamente com os fungos nos líquenes. Neste caso, as cianobactérias são responsáveis pela fixação de nitrogénio atmosférico para a produção de compostos orgânicos nitrogenados, posteriormente utilizados pelo organismo hospedeiro [6].

As cianobactérias utilizam a energia luminosa através de vários pigmentos, como a clorofila *a*, as ficobiliproteínas e os carotenóides. É esta variedade de pigmentos que confere às cianobactérias a vasta gama de colorações que lhes está associada, desde o vermelho até ao preto; contudo, a coloração azul-esverdeada é a mais comum, da qual deriva a designação de algas azuis [4].

Actualmente, as cianobactérias encontram-se distribuídas por todo o planeta, extremamente bem adaptadas aos mais diversos ambientes, terrestres (solos, desertos e glaciares) e aquáticos (águas doces e salgadas, oceanos e águas termais) [7].

Nos ambientes aquáticos (naturais ou artificiais), em condições apropriadas, as cianobactérias multiplicam-se em larga escala – *floração* – dando origem a grandes populações, com a capacidade de formar vesículas gasosas que lhes permitem flutuar à superfície da água em que se encontram. As populações de bactérias podem acumular-se na periferia das águas utilizadas para fins recreativos (por ex.: lagos) ou em tanques de abastecimento de água para consumo, pelo que constituem um risco para a saúde humana e animal [4].

As investigações feitas sobre os casos de intoxicação levaram à identificação de compostos tóxicos produzidos pelas cianobactérias. Actualmente, este é um campo de investigação em largo desenvolvimento.

1.2 Cianotoxinas

Durante a fase de floração, as cianobactérias produzem metabolitos secundários designados por *cianotoxinas*.

De entre as cianobactérias produtoras de cianotoxinas, as mais relevantes pertencem aos géneros *Microcystis*, *Nodularia*, *Anabaena*, *Plankthorix* (anteriormente *Oscillatoria*), *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Phormidium*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*. No seu conjunto,

as cianobactérias pertencentes a estes géneros produzem uma vasta gama de cianotoxinas, que variam em estrutura, toxicidade e mecanismo de acção [8].

Em geral, as cianotoxinas são moléculas de baixo peso molecular que apresentam elevada toxicidade para alguns mecanismos bioquímicos existente nos organismos eucariotas [4].

De acordo com a sua estrutura química, as cianotoxinas podem ser divididas em três grupos: peptídeos cíclicos (*microcistina* e *nodularina*), alcalóides (anatoxina-a, saxitoxina, cilindrospermopsina, aplisiatoxina) e lipopolissacarídeos [9]. O mecanismo de acção de uma cianotoxina depende essencialmente da sua estrutura química. No entanto, também é possível estabelecer uma classificação de acordo com o mecanismo de toxicidade que apresentam: hepatotoxinas, neurotoxinas e toxinas irritantes [10].

1.2.1 Microcistina-LR

As microcistinas (MCs) são as cianotoxinas mais frequentemente encontradas nos reservatórios de água doce em todo o planeta. Foram isoladas pela primeira vez a partir de cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa*, o que deu origem à nomenclatura que hoje se aplica a estas toxinas, embora existam outras espécies de cianobactérias produtoras de MCs, tais como *Anabaena*, *Nostoc*, *Phormidium* e *Planktothrix*. Contudo, as cianobactérias pertencentes ao género *Microcystis* são as mais frequentemente encontradas e mais amplamente distribuídas geograficamente [7].

As MCs são heptapeptídeos cíclicos com a seguinte estrutura química: ciclo(D-alanina-R¹-D-MeAsp-R²-Adda-D-glutamato-Mdha), onde R¹ e R² representam os L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp representa o ácido D-eritro-β-metil aspártico, Mdha representa a N-metildesidroalanina, e Adda representa o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico, um aminoácido pouco comum na natureza [11].

De entre as mais de 80 variantes de MCs já identificadas [12], a *Microcistina-LR* (MC-LR) destaca-se pela elevada frequência com que é encontrada e pela sua elevada hepatotoxicidade [13]. Na MC-LR, a nomenclatura “LR” é devida à presença dos aminoácidos Leucina (L) e Arginina (R) nas posições 2 e 4 da estrutura cíclica, respectivamente, **Fig.1.1**.

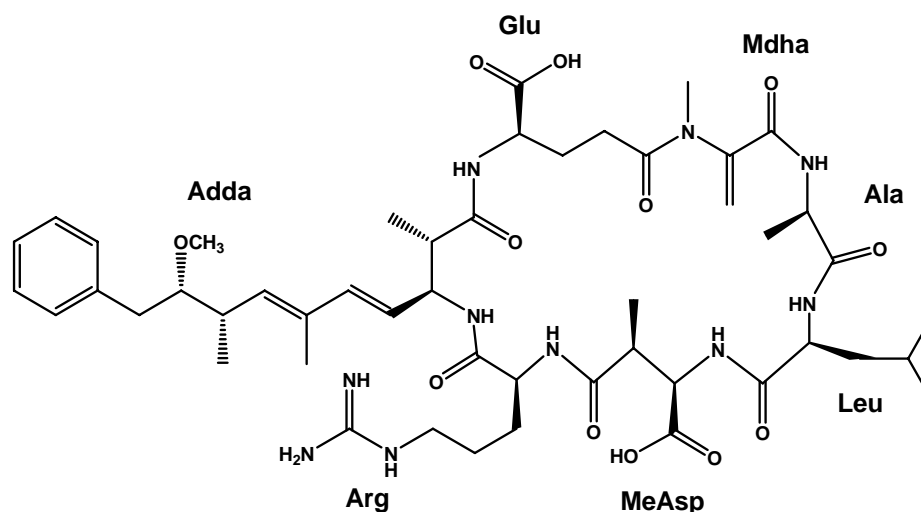


Figura 1.1. Estrutura química da MC-LR.

A toxicidade das MCs é conhecida por afectar tanto os animais como os seres humanos, nos quais desencadeiam mecanismos patológicos, podendo conduzir à morte [14-16].

Um dos casos mais conhecidos teve lugar no Brasil (Caruaru, Estado de Pernambuco), em 1996, em que 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise faleceram após receberem tratamento intravenoso com águas contaminadas com MCs, entre as quais estava presente a MC-LR [17, 18].

1.2.2 Nodularina

A nodularina (NOD) é uma hepatotoxina potente produzida por bactérias da espécie *Nodularia spumigena*, que se encontra em águas salgadas (por ex.: Mar Báltico), em lagos salinos e em estuários por todo o mundo [19-22].

A NOD é um pentapeptídeo cíclico com uma estrutura química semelhante à estrutura da MC-LR, **Fig.1.2**.

interpretação dos resultados. Os aminoácidos investigados e as respectivas fórmulas químicas constam da **Fig. 1.3**.

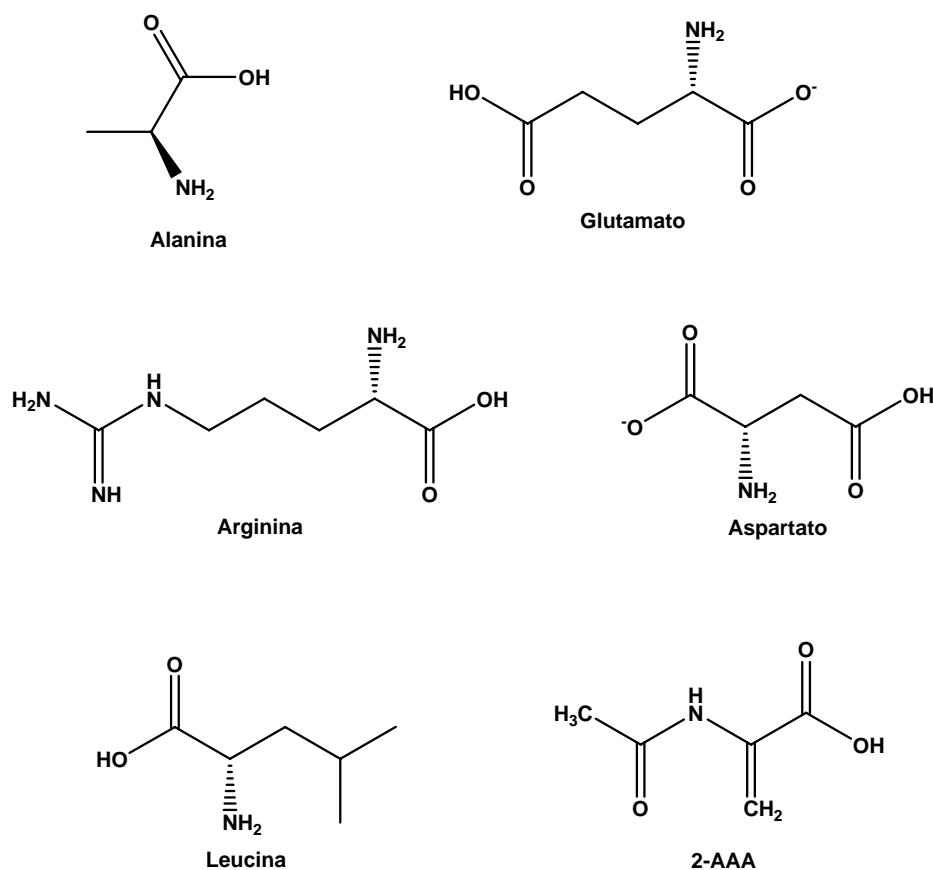


Figura 1.3. Estruturas químicas dos aminoácidos estudados. 2-AAA – ácido 2-acetamidoacrílico.

Uma vez que não foi possível adquirir os aminoácidos Mdha e Adda, foram seleccionados compostos análogos para os testes pretendidos: o ácido 2-acetamidoacrílico (2-AAA), **Fig. 1.3**, e o ácido sórbico (SA), respectivamente [32].

1.3 Hepatotoxicidade

A MC-LR e a NOD são hepatotoxinas potentes que provocam efeitos tóxicos graves nos organismos eucariotas.

Nos mamíferos, o principal alvo da MC-LR e da NOD é o fígado, de onde advém a designação de hepatotoxinas. A acumulação destas toxinas no fígado deve-se à existência de transportadores orgânicos aniônicos específicos à superfície dos hepatócitos [33, 34]. Embora estes transportadores sirvam de entrada para ambas as toxinas, pensa-se que a NOD terá maior facilidade de entrada nos hepatócitos do que a MC-LR [35].

Estas toxinas inibem as fosfatases de serina/treonina 1 e 2A (PP1 e PP2A) [36], acção que é principalmente promovida pelo aminoácido Adda [3, 37]. A inibição da PP1 e da PP2A desencadeia a hiperfosforilação de proteínas do citosqueleto, que leva à perda da estrutura celular dos hepatócitos, provocando hemorragia hepática e, por fim, a morte [38].

Doses baixas de MC-LR inibem parcialmente as fosfatases, levando à fosforilação da dineína, uma proteína mecano-química responsável pelo movimento vesicular ao longo dos microtúbulos no interior da célula. Como consequência, a actividade de ATPase da dineína é inibida e a endocitose mediada por receptores não ocorre [31].

Para além da toxicidade a nível hepático, a MC-LR foi já associada à indução de citotoxicidade renal [39], o que leva a crer que o fígado não é o único órgão alvo destas toxinas.

1.4 Genotoxicidade e potencial carcinogénico

A exposição a cianotoxinas constitui um perigo real para a saúde humana e animal.

Além dos efeitos tóxicos descritos anteriormente, a MC-LR e a NOD têm sido associadas a fenómenos de genotoxicidade e o seu potencial carcinogénico tem sido amplamente investigado.

A MC-LR e a NOD foram já associadas à promoção de tumores [40]. A MC-LR foi também relacionada com a indução de danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) [41, 42], com a diminuição dos níveis de glutatona hepática, com a peroxidação lipídica, e com alterações no perfil de actividade de algumas enzimas antioxidantes [43]. Por sua vez, a NOD tem sido referida como um composto carcinogénico (em experimentação animal), e não

apenas como promotora de tumores, como é o caso da MC-LR [44]. Com base nos estudos publicados sobre este assunto, pensa-se que a NOD apresenta genotoxicidade e potencial carcinogénico mais elevados do que a MC-LR [9].

1.5 Métodos de detecção e degradação de cianotoxinas

A elevada toxicidade que a MC-LR e a NOD (e as cianotoxinas em geral) apresentam impõe a adopção de métodos de detecção e degradação destas toxinas.

Para a MC-LR, a cianotoxina mais estudada, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu como limite 1 µg/L de água potável [45]. Para a NOD, contudo, ainda não há valores estabelecidos.

Em geral, a detecção e identificação de hepatotoxinas cianobacterianas é feita com recurso tanto a técnicas bioquímicas como a técnicas físico-químicas.

Entre as técnicas bioquímicas mais frequentemente utilizadas destacam-se os ensaios laboratoriais com ratos, os ensaios imuno-enzimáticos (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) e os ensaios com fosfatases. Por outro lado, as técnicas físico-químicas mais utilizadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*), a electroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*), a ressonância magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) e a espectrometria de massa (MS, *mass spectrometry*) [3]. Contudo, o método convencional para a análise e detecção de hepatotoxinas é a HPLC de fase reversa com detecção ultravioleta (UV) a 238 nm [46].

Ao longo dos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos e propostos vários métodos para o tratamento de águas contaminadas com MC-LR. Entre eles, destacam-se alguns como a degradação por fotocatalise com filmes de TiO₂ [47, 48], a degradação por radicais de sulfato [49], a degradação por microorganismos [50], os processos de oxidação avançada com O₃, H₂O₂, O₃/H₂O₂, O₃/Fe(II), o tratamento Fenton e a radiação com ultrassons, sendo a ozonação considerada um dos métodos mais eficazes no tratamento de águas [51, 52].

Nos estudos de degradação por microorganismos foi identificada uma bactéria (*Paucibacter toxinivorans*) capaz de degradar não só as MCs como também a NOD [53]. Num estudo idêntico, foi investigada a capacidade hidrolítica das enzimas produzidas por uma estirpe bacteriana (B-9, da espécie *Sphingosinicella*), no qual se verificou que essas enzimas

degradavam a NOD e as MCs [54]. Outros autores observaram que a biodegradação da NOD em águas doces ocorre nos lagos, mas não nos rios, o que sugere a existência de diferentes microorganismos com diferentes capacidades degradativas para com as hepatotoxinas [55].

A degradação da NOD por acção de radiação ultravioleta (UV) foi investigada num estudo que concluiu que as cianobactérias intactas são mais resistentes à radiação UV do que a toxina em solução; ainda neste estudo, concluiu-se que a degradação da NOD era mais eficaz com radiação UV-B do que UV-A [56].

No que respeita às técnicas electroquímicas, apesar de vários estudos terem sido já efectuados [57-59], não foram investigados os mecanismos de oxidação destas toxinas.

1.6 Ácido Sórbico

Todos os anos, as contaminações por fungos e bactérias afectam a qualidade de inúmeros produtos consumíveis, inviabilizando a sua comercialização e consumo. De modo a prevenir tais contaminações, têm vindo a ser desenvolvidos vários compostos que actuam como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes, comumente designados por conservantes.

O ácido sórbico (*sorbic acid*, SA), ou ácido trans, trans-2,4-hexanóico, **Fig. 1.4**, é um agente antimicótico que actua como conservante na prevenção da proliferação de fungos, leveduras e algumas bactérias.

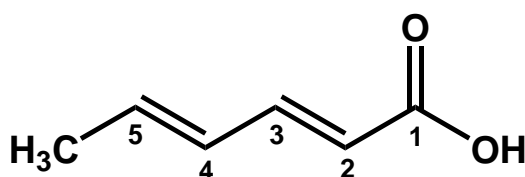


Figura 1.4. Estrutura química do ácido sórbico.

Nas últimas décadas, o SA e os seus sais de sódio, potássio e cálcio têm sido considerados como aditivos seguros, quer para as indústrias, quer para os consumidores em geral, tendo-se tornado no conservante mundialmente mais utilizado em produtos alimentares, farmacêuticos e cosméticos [60-62].

Apesar das vantagens que o SA apresenta enquanto agente conservante e apesar da sua elevada estabilidade no estado cristalino, está provado que o SA apresenta instabilidade em soluções aquosas, levando à formação de vários produtos de degradação [63]. No caso particular da indústria alimentar, os produtos resultantes da degradação do SA estão envolvidos em reacções químicas que alteram as propriedades organolépticas e nutricionais dos produtos alimentares [64], de onde advém não só o prejuízo a nível económico, como também um problema de saúde pública.

Dada a sua vasta utilização em produtos consumíveis, a degradação do SA tem sido alvo de muitos estudos efectuados por diversos autores ao longo dos últimos 50 anos [64-70].

O principal processo de degradação do SA em meios aquosos está descrito como auto-oxidação, através do qual se formam produtos carbonilados [70]. Sabe-se que este processo é influenciado por vários factores, tais como o pH, a presença de sais, iões metálicos, glicerol [68] e aminoácidos [64]. Por outro lado, a instabilidade e a degradação do SA foram também correlacionadas com processos de oxidação, de radiólise [67] e de acção microbiana [71].

Os produtos de degradação do SA em soluções aquosas foram já isolados e alguns deles foram também caracterizados [64, 69]. De entre os últimos, destacam-se o acetaldeído, o malonaldeído, o crotonaldeído, a acroleína e a acetona. É importante salientar que alguns dos produtos de degradação do SA são tóxicos. O acetaldeído está classificado como possível carcinogénico [72]. O crotonaldeído provoca irritações respiratórias, cutâneas e oculares [73] e tem efeitos genotóxicos nas células germinativas de mamíferos [74]. A acroleína é vista como um possível carcinogénico, podendo ainda provocar efeitos nocivos ao nível do sistema reprodutor.

A abordagem ao estudo do SA e dos seus produtos de degradação tem sido feita com recurso a diversas técnicas analíticas. Na análise de produtos farmacêuticos, as técnicas mais frequentemente utilizadas são a cromatografia gasosa de *headspace* (HS-GC) [64] e a cromatografia líquida (LC) [75, 76]. Para a análise de produtos alimentares, as técnicas mais comuns são a extracção em fase sólida (SPE), a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) [77-79], a electroforese capilar com detecção UV [60], a espectrofotometria de UV-Vis [80] e a potenciometria [81]. Os produtos de cosmética são analisados sobretudo com recurso a HPLC com detecção UV ou com detecção electroquímica [62, 82].

Contudo, não foram investigados os mecanismos electroquímicos do SA e dos seus produtos de degradação. Um objectivo deste trabalho foi investigar o comportamento

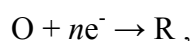
electroquímico do SA, e dos seus produtos de degradação em meio aquoso, fazendo variar não só tempo de degradação, mas também o pH do meio.

1.7 Princípios de Electroquímica

Num sistema electroquímico, é importante considerar os factores que afectam o transporte da carga através da interface entre as fases químicas. À excepção das reacções redox homogéneas, as meias-reacções estão separadas espacialmente e, normalmente, têm lugar em eléctrodos diferentes imersos em solução dentro da mesma célula electroquímica. Os eléctrodos estão ligados entre si não só através da solução (via transporte iónico no electrólito de suporte), como também externamente através de fios condutores, de modo a que a carga possa ser transportada [83].

A reacção electroquímica a investigar ocorre na superfície do eléctrodo de trabalho, na interface eléctrodo-electrólito de suporte. O potencial do eléctrodo de trabalho é controlado por um eléctrodo de referência, que deve apresentar uma impedância elevada de modo a não permitir a passagem de corrente. A corrente flui entre o eléctrodo de trabalho e um eléctrodo auxiliar através do electrólito de suporte.

Para uma reacção de eléctrodo, o estado de equilíbrio é caracterizado pela equação de Nernst, que relaciona o potencial do eléctrodo com a concentração das espécies em solução. Considerando o caso geral



em que O (espécie oxidada) recebe n electrões para se transformar em R (espécie reduzida), a equação de Nernst é dada por:

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^*}{C_R^*}$$

onde C_O representa a concentração da espécie oxidada e C_R a concentração da espécie reduzida, em solução [84].

Durante uma experiência electroquímica, quando se aplica um potencial ao eléctrodo de trabalho, as espécies electricamente carregadas são atraídas para a superfície do eléctrodo por

forças electrostáticas. Por sua vez, as espécies não carregadas são atraídas para a superfície do mesmo eléctrodo por adsorção. Assim, num processo de eléctrodo é necessário considerar o transporte das espécies até à superfície do eléctrodo, e a reacção de eléctrodo.

O movimento de matéria dentro de uma célula electroquímica designa-se por transporte de massa [83]. Neste contexto, existem três modos de transporte de massa a considerar: por convecção, por migração, e por difusão.

O transporte de massa por convecção é provocado pelo movimento da solução quando esta é agitada, quando o eléctrodo é girado/rodado, ou quando um fluxo de solução atravessa a célula. A solução em movimento transporta as moléculas reagentes até à superfície do eléctrodo e, simultaneamente, transporta os produtos gerados para longe da superfície do eléctrodo [83].

A migração consiste no movimento de uma partícula carregada resultante da interacção com um campo eléctrico, como aquele que existe nas proximidades do eléctrodo. Na maioria dos métodos analíticos, o efeito da migração é minimizado com a utilização de um electrólito de suporte inerte [83].

A difusão é a forma mais simples de transporte de massa. É um processo que está presente em todas as medições electroanalíticas, e corresponde ao movimento das espécies em solução de acordo com o gradiente de concentração [83].

Na proximidade da superfície do eléctrodo (camada de difusão) considera-se que as espécies são transportadas unicamente por difusão, já que a convecção pode ser controlada do exterior e a migração pode ser negligenciada devido ao electrólito de suporte inerte. Na **Fig. 1.5** encontra-se uma representação esquemática dos processos de eléctrodo.

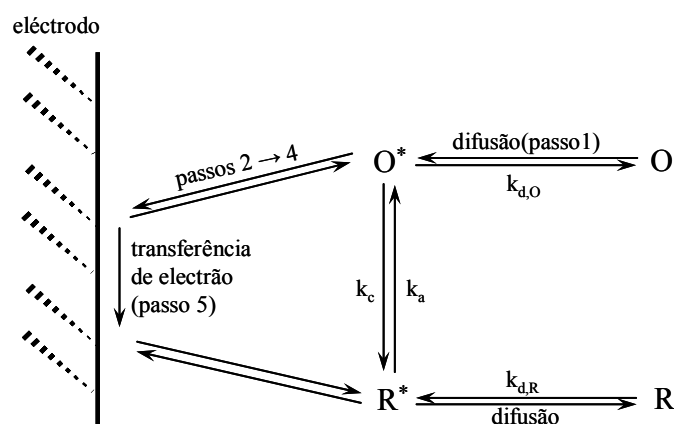


Figura 1.5. Esquema de transferência de electrão num eléctrodo [83]. **Passo 1** – difusão; **passo 2** – rearranjo da atmosfera iónica; **passo 3** – reorientação dos dipolos do solvente; **passo 4** – alterações nas distâncias entre o ião central e os ligandos; **passo 5** – transferência do electrão.

Nas reacções de oxidação, considera-se que o eléctrodo de trabalho funciona como aceitador de electrões, gerando uma corrente positiva, ou seja, uma corrente anódica, I_a . Por oposição considera-se que, nas reacções de redução, o eléctrodo funciona como dador de electrões, de onde resultam correntes negativas ou catódicas, I_c .

1.7.1 Técnicas de voltametria

A voltametria consiste na medição da corrente que atravessa o eléctrodo de trabalho em função do potencial aplicado.

A corrente registada é composta por uma componente faradaica, I_f , devida à transferência de electrão, e uma componente capacitiva, I_c , devida à dupla camada. A corrente total, I_t , é a soma de ambas:

$$I_t = I_f + I_c.$$

Nas experiências de voltametria, tanto o potencial aplicado como a corrente registada variam ao longo do tempo. A resposta da corrente em função do potencial, $I = I(E)$, é registada sob a forma de um *voltamograma*. A variação de potencial ao longo do tempo designa-se por *velocidade de varrimento*, v .

As duas técnicas voltamétricas mais utilizadas são:

- a) *métodos de varrimento cíclico do potencial*, que consistem na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um potencial que varia de forma cíclica ao longo do tempo;
- b) *métodos de degrau e impulso*, que consistem na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente, alterando instantaneamente o sistema electroquímico; a voltametria de impulso diferencial e a de onda quadrada são exemplos desta técnica.

1.7.1.1 Voltametria Cíclica (CV)

A voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry*, CV) é vista como uma das técnicas electroquímicas mais eficazes e versáteis para o estudo dos mecanismos de reacção de sistemas redox. Esta eficácia deve-se, em parte, à rapidez com que é possível observar o

comportamento redox de uma molécula em toda a gama de potencial de trabalho. A voltametria cíclica é, por isso, frequentemente a técnica de eleição utilizada no início de um estudo electroquímico.

Nesta técnica, o potencial aplicado ao eléctrodo varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante, $v = dE / dt$, entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f) previamente escolhidos, **Fig. 1.6**.

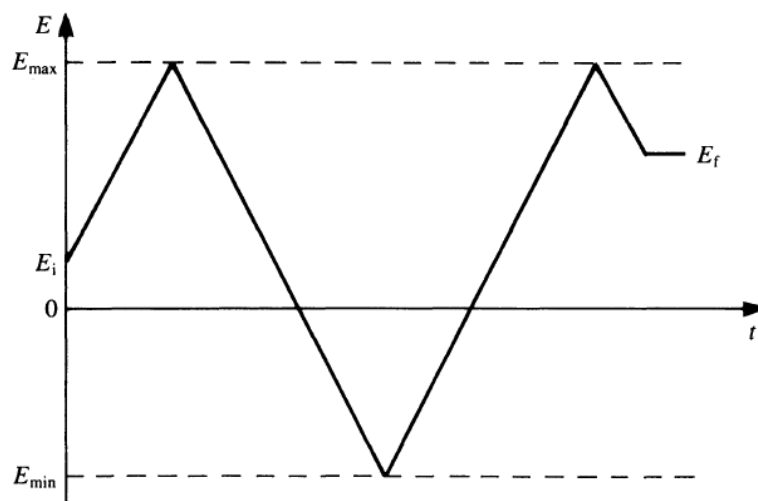


Figura 1.6. Variação do potencial aplicado em função do tempo numa experiência de voltametria cíclica. E_i – potencial inicial; E_f – potencial final; E_{max} – potencial máximo; E_{min} – potencial mínimo.

Nesta técnica, o sentido inicial do varrimento é invertido quando se atinge um valor de potencial máximo, E_{max} , ao fim de um determinado tempo, t_λ .

Os parâmetros fundamentais a considerar em voltametria cíclica são:

- O potencial inicial – E_i
- O sentido inicial do varrimento
- A velocidade de varrimento, v , dada por $v = |dE/dt|$
- O potencial máximo – E_{max}
- O potencial mínimo – E_{min}
- O potencial final - E_f

A corrente registada é a corrente faradaica, I_f , gerada pela reacção que ocorre no eléctrodo. Contudo, existe também uma contribuição da corrente capacitiva, I_c : ao inverter o

sentido do varrimento do potencial, a carga da dupla camada altera-se; esta contribuição aumenta com o aumento da velocidade de varrimento.

Transferência electrónica reversível

Na **Fig. 1.7** encontra-se um voltamograma cíclico típico que se obtém para um processo de transferência de carga reversível, e os respectivos parâmetros característicos.

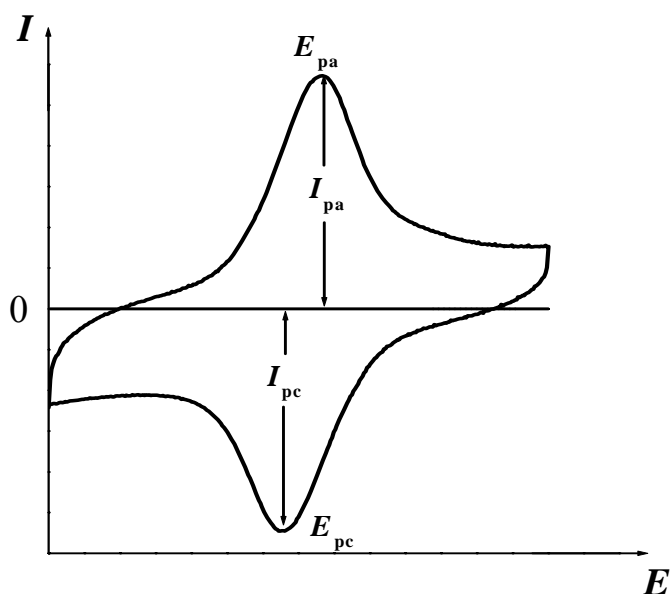


Figura 1.7. Voltamograma cíclico típico para uma reacção reversível. E_{pa} – potencial de pico anódico; I_{pa} – corrente de pico anódico; E_{pc} – potencial de pico catódico; I_{pc} – corrente de pico catódico.

As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reacção de transferência de carga e com a concentração em solução da espécie que sofre essa reacção.

As condições necessárias para diagnosticar a reversibilidade de um sistema através de voltametria cíclica são:

- $I_p \sim v^{1/2}$
- E_p independente de v
- $\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 57/n$ (mV)
- $|E_p - E_{p/2}| = 56,6/n$ (mV)
- $|I_{pa}/I_{pc}| = 1$

Pela aplicação dos critérios de reversibilidade acima descritos, é possível calcular o número de electrões transferidos no processo electroquímico. Se a reacção for reversível, pode ainda calcular-se o potencial formal de redução, E° , da seguinte forma:

$$E^{\circ} = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2}$$

Transferência electrónica irreversível

Quando não são verificadas as condições de reversibilidade de um sistema, este pode ser considerado como *quasi-reversível* ou *irreversível*.

A extensão da irreversibilidade intensifica-se com o aumento da velocidade de varrimento, e o valor de $|I_{pa}/I_{pc}|$ torna-se diferente de 1. Em comparação com o caso reversível, verifica-se ainda a diminuição das correntes de pico e a crescente separação entre picos anódicos e catódicos.

Os critérios de diagnóstico para sistemas irreversíveis são:

- $|E_p - E_{p/2}| = 47,7/(\alpha n')$ (mV)
- $|dE_p/d \log v| = 29,6/(\alpha n)$ (mV)
- E_p dependente de v

Um voltamograma cíclico de um sistema irreversível apresenta picos de corrente que não têm picos inversos associados no varrimento do potencial no sentido oposto.

Entre os processos de eléctrodo reversíveis e irreversíveis, encontram-se os processos *quasi-reversíveis*, em que se observam picos inversos aquando do varrimento do potencial no sentido oposto, mas em que $\Delta E_p > 57/n$ (mV).

1.7.1.2 Técnicas de degrau e impulso

O objectivo principal no desenvolvimento das técnicas de degrau e impulso de potencial foi diminuir tanto quanto possível a contribuição da corrente capacitiva na corrente total registada. Após a aplicação de um degrau de potencial, a corrente capacitiva decai

exponencialmente com o tempo, ao passo que a componente faradaica decai a uma velocidade inferior.

Voltametria de Impulso Diferencial (DPV)

A voltametria de impulso diferencial (*Differential Pulse Voltammetry*, DPV) consiste na aplicação de pequenos impulsos de amplitude crescente, ΔE_p , sobre um potencial-base, E_{base} , sendo o aumento de amplitude sempre igual, ΔE_s .

A corrente é medida em dois momentos: imediatamente antes da aplicação do impulso e no fim do impulso; no entanto, é a diferença entre as duas medidas que é registada. A onda voltamétrica formada em DPV está representada na **Fig. 1.8**.

Dado que a DPV é uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma convencional, ou seja, um pico. O potencial do pico, E_p , pode ser identificado aproximadamente com $E_{1/2}$. Com o aumento da irreversibilidade do sistema, E_p afasta-se de $E_{1/2}$ (sistema reversível); simultaneamente, a largura do pico aumenta e a sua altura diminui.

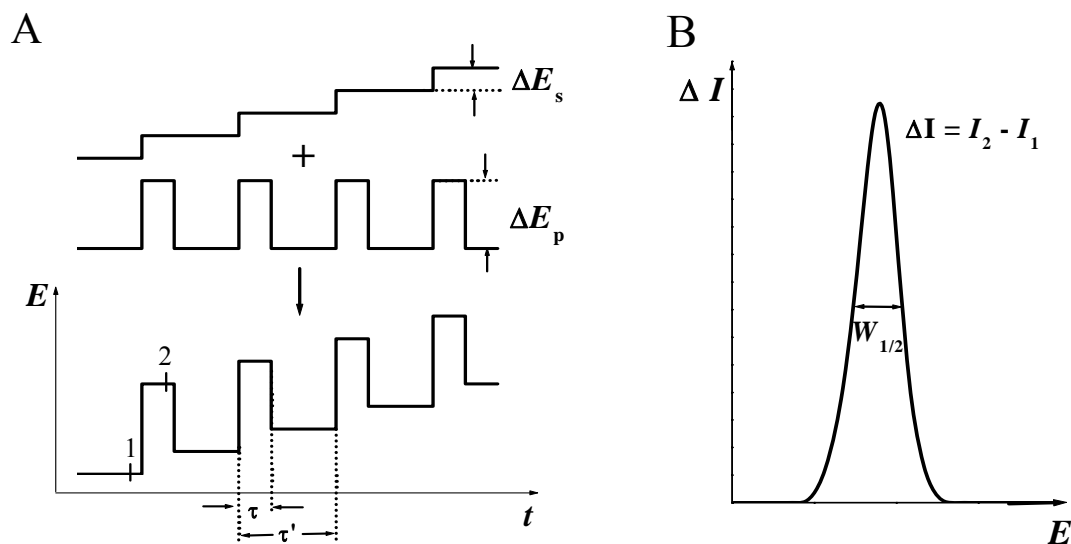


Figura 1.8. Representação esquemática (A) da aplicação de potenciais e (B) perfil I vs. E típico em voltametria de impulso diferencial.

A velocidade de varrimento é determinada pelo tempo de intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso e pelo valor de ΔE_s : $v = \tau \Delta E_s$. Normalmente, a velocidade de varrimento varia entre 1 e 10 mV s⁻¹.

A amplitude escolhida para o impulso de potencial ΔE_p deve ter em conta a reacção em estudo e a sensibilidade exigida, já que grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem diminuir a possibilidade de detectar a corrente faradaica.

Para amplitudes de impulso pequenas, a largura a meia altura, $W_{1/2}$, do pico de corrente é inversamente proporcional ao número de electrões transferidos:

$$W_{1/2} = 3,52 RT / nF$$

o que permite caracterizar o mecanismo da reacção de transferência de carga. A intensidade do pico de corrente, I_p , é proporcional à concentração do analito; no entanto, também depende da velocidade da reacção electroquímica.

Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada (*Square Wave Voltammetry*, SWV) foi desenvolvida em 1952 por Barker e é hoje em dia uma técnica analítica de elevada importância.

A onda gerada consiste numa onda quadrada de impulso ΔE_p de larga amplitude sobreposta numa escada de potencial com degraus de amplitude ΔE_s , e com período τ , **Fig. 1.9**.

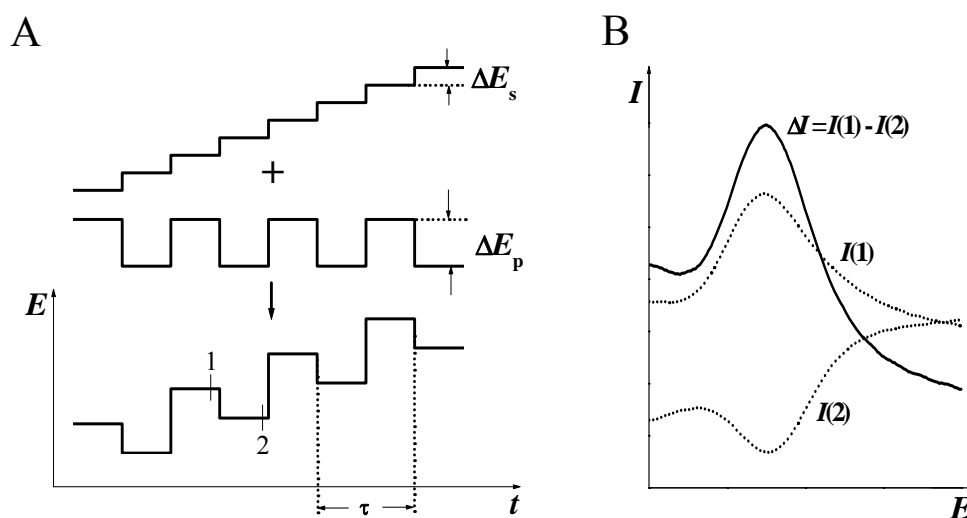


Figura 1.9. (A) Esquema de aplicação de potenciais e (B) resposta típica em voltametria de onda quadrada.

Em SWV, a amostragem de corrente é feita antes do fim de ambos os impulsos – positivo e negativo – em cada ciclo (1 e 2 na **Fig. 1.9A**). A *corrente total*, ΔI (I_t) que é registada corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no fim do impulso de potencial directo – *corrente directa* (*forward current*, I_f) – e a corrente $I(2)$ registada no fim de do impulso inverso – *corrente inversa* (*backward current*, I_b). Dado que $I(2)$ possui sinal contrário a $I(1)$, para sistemas reversíveis, $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$, **Fig. 1.9B**.

Enquanto que em DPV as velocidades de varrimento aplicadas oscilam entre 1 e 10 mV s^{-1} , em voltametria de onda quadrada é possível aplicar velocidades mais elevadas, como 1 V s^{-1} , o que confere algumas vantagens a esta técnica, tais como: maior rapidez de análise, menor consumo de espécies electroactivas (em relação à DPV), e redução dos problemas que advêm do bloqueio da superfície do eléctrodo [83].

1.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O termo “cromatografia” engloba uma série de técnicas cuja finalidade consiste na separação de múltiplos componentes contidos numa mesma amostra, tendo por base as diferenças de afinidade que esses componentes apresentam para com uma fase móvel e uma fase estacionária [85].

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) é uma técnica cromatográfica que faz uso de pressões elevadas para forçar um solvente (fase móvel) a atravessar uma coluna composta por partículas de pequenas dimensões (3-10 μm , fase estacionária), de onde resultam separações de alta resolução. O processo através do qual o analito é arrastado ao longo da coluna de separação por acção da fase móvel designa-se por eluição [85].

A HPLC apresenta dois modos principais: HPLC de fase normal (HPLC-NP) e HPLC de fase reversa (HPLC-RP). Na HPLC-NP, a fase estacionária é polar (por ex.: sílica) e a fase móvel é apolar ou pouco polar (por ex.: hexano ou 99/1 v/v hexano/diclorometano); nesta vertente, são retidos preferencialmente os compostos polares. Na HPLC-RP, acontece o oposto: a fase estacionária é de natureza apolar (por ex.: octadecil), e a fase móvel é composta por um solvente principal polar – normalmente a água – modificado com um solvente menos polar (por ex.: metanol, acetonitrilo, tetrahydrofurano) [86].

Um aparelho de HPLC é composto por um sistema de controlo de solventes, uma válvula de injeção, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador, com o qual se controlam os parâmetros cromatográficos e se visualizam os resultados obtidos, sob a forma de cromatogramas (resposta do detector *vs.* tempo de eluição da amostra).

Existem vários métodos de detecção utilizados em HPLC, dependendo sobretudo das propriedades físico-químicas do(s) analito(s) que se pretende detectar. Em cromatografia líquida, os detectores mais frequentemente utilizados são sensíveis às diferenças de concentração do analito, ou seja, o sinal registado pelo detector é uma função da concentração do analito que atravessou a coluna de separação [87].

O detector de índice de refração (RI), o detector de fluorescência (FL), o detector electroquímico (EC) e o detector ultravioleta (UV) são os mais utilizados em HPLC. De entre todos os métodos, a detecção UV é a mais popular e pode ser feita de três formas distintas: detecção a um único comprimento de onda (fixo), detecção a um comprimento de onda variável, e detecção UV com informação espectral, como é o caso do detector de fotodíodos (*photodiode array*, PDA).

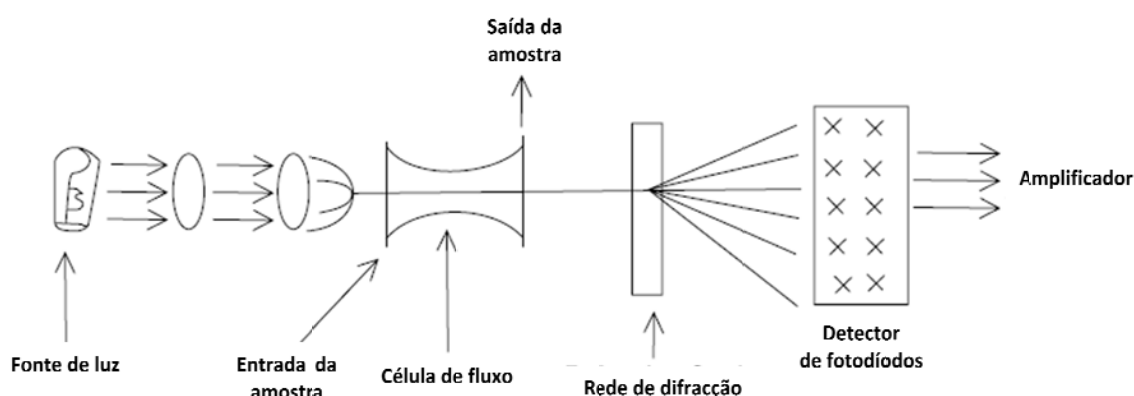


Figura 1.10. Percurso óptico de um detector PDA. Adaptado de [88]

O PDA é o detector UV mais avançado utilizado em HPLC. Comparado com os outros detectores UV, o PDA tem a vantagem de recolher informação espectral sem comprometer a sensibilidade e a resolução da análise [89].

Os componentes ópticos que constituem um detector de PDA estão apresentados na **Fig. 1.10.**

Uma lâmpada de deutério emite luz na direcção da célula de fluxo, a qual contém líquido a passar continuamente. Existe um interruptor entre a fonte de luz e a célula de fluxo, que

tanto pode estar aberto como fechado. O feixe de luz atinge a rede de difracção, onde é dividida, e os comprimentos de onda variam desde 190 a 800 nm [89].

Através da análise da informação espectral, o detector de PDA fornece informações úteis sobre a identidade e a pureza de um composto, que, quando combinadas com condições apropriadas de sensibilidade e selectividade, são ferramentas essenciais nas análises qualitativas e quantitativas por HPLC [89].

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL

Neste capítulo é feita uma descrição dos reagentes e soluções, dos diversos materiais utilizados na preparação e na execução das experiências, da instrumentação relativa às técnicas de análise e dos parâmetros experimentais associados a cada uma delas, bem como do tratamento e apresentação dos resultados experimentais obtidos ao longo deste trabalho.

2.1 Reagentes e Soluções

A MC-LR e a NOD foram adquiridas à Alexis Biochemicals (Alexis Corporation, Switzerland). O SA, os aminoácidos L-Leucina, L-Arginina, D-Alanina, ácido L-glutâmico, ácido L-aspartico e o ácido 2-acetamidoacrílico, o acetonitrilo e o ácido fórmico (ambos com grau de pureza para HPLC) foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Após a preparação das soluções *stock*, estas foram guardadas a 4 °C até ao momento da sua utilização. As concentrações específicas utilizadas nas medidas voltamétricas estão referidas ao longo do texto e foram obtidas por diluição da respectiva substância no electrólito desejado, directamente na célula electroquímica. Após a análise das soluções, estas foram transferidas da célula electroquímica para tubos de microcentrífuga de 0,65 mL (Costar®) e armazenadas a 4 °C, durante os vários períodos de incubação estudados (indicados em cada caso no Capítulo 3).

Todas as soluções dos vários compostos e todas as soluções tampão foram preparadas em água desionizada ultrapura obtida através de um sistema Millipore Milli-Q (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$), Millipore S.A., França.

As soluções saturadas com N₂ foram preparadas pela passagem do fluxo de gás de elevada pureza através das soluções durante 15 minutos antes do início do ensaio voltamétrico. Durante o ensaio, o fluxo de gás foi mantido sobre as soluções.

As soluções tampão de electrólito de suporte, com diferentes valores de pH e força iónica 0,1 M, foram preparadas de acordo com a **Tabela 2.1**, a partir de reagentes de pureza analítica.

Tabela 2.1. Composição das soluções tampão de electrólito de suporte.

Electrólito de suporte	pH
KCl + HCl	1,3
KCl + HCl	2,1
HAcO + NaAcO	3,4
HAcO + NaAcO	4,2
HAcO + NaAcO	5,3
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	6,1
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	7,0
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄	8,1
Na ₂ B ₄ O ₇ + NaOH	9,2
Na ₂ B ₄ O ₇ + NaOH	10,3
KCl + NaOH	11,9

As medições de pH foram feitas com um medidor de pH Crison micropH 2001 (Barcelona, Espanha), com um eléctrodo de vidro combinado Ingold.

Todas as experiências foram feitas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

No tratamento dos dados e na construção dos gráficos apresentados neste trabalho foi utilizada a versão 6.0 do programa Origin® (Microcal Software, Inc., USA).

Para desenhar as estruturas químicas das substâncias estudadas utilizou-se o programa ChemDraw Ultra, versão 8.0 (CambridgeSoft Corporation, EUA).

2.2 Instrumentação

2.2.1 Experiências electroquímicas

As experiências electroquímicas de voltametria foram feitas numa célula electroquímica de 2 mL de capacidade máxima, com um eléctrodo de carbono vítreo (GCE) de 1,5 mm de diâmetro (Cypress Systems Inc., EUA) como eléctrodo de trabalho, um fio de platina como eléctrodo auxiliar e um eléctrodo Ag/AgCl (3M KCl) (Cypress Systems Inc., EUA) como eléctrodo de referência, **Fig 2.1**.

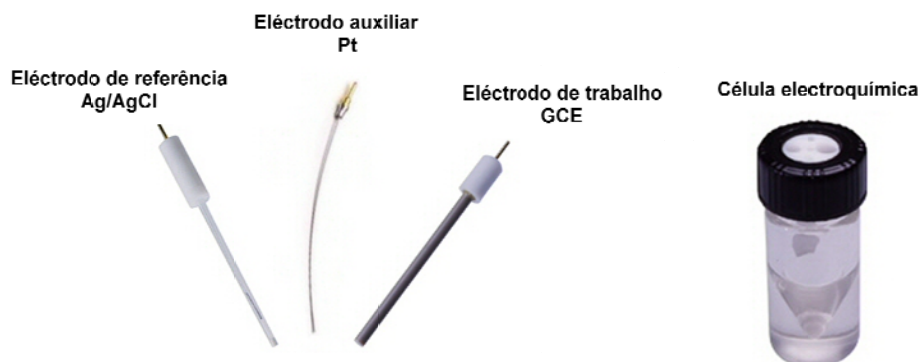


Figura 2.1. – Eléctrodos e célula electroquímica.

Para o polimento do eléctrodo de trabalho utilizou-se spray de diamante com partículas de 1 μm (Kemet International Ltd, Reino Unido). Após o polimento, o GCE foi limpo com um jacto de água desionizada. Depois deste procedimento, foram registados vários voltamogramas em solução tampão até se obter uma linha de base estável, para garantir que a superfície do GCE havia sido devidamente limpa.

Todos os ensaios electroquímicos foram feitos com um potenciostato $\mu\text{Autolab}$ Tipo II (Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda), **Fig. 2.2**, com o software GPES (General Purpose Electrochemical System), versão 4.9 (Echo-Chemie, Utrecht, Holanda). Este software permitiu não só o controlo dos parâmetros voltamétricos em cada experiência, como também a obtenção e o tratamento dos dados experimentais.



Figura 2.2. – Imagem do potenciostato μ Autolab Tipo II.

Para as experiências de DPV, os parâmetros voltamétricos foram os seguintes: amplitude de impulso de 50 mV, largura de impulso de 70 ms e velocidade de varrimento de $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Nas experiências de SWV, aplicou-se a frequência de 50 Hz, e o incremento de potencial de 2 mV, correspondendo a uma velocidade de varrimento efectiva de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Nas experiências de CV, foram utilizadas as velocidades de varrimento 50 e $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.2.2 Espectrofotometria de UV-Vis

As experiências espectrofotométricas foram registadas num espectrofotómetro SPECORD S100, associado ao programa Aspect Plus, versão 1.5 (Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha). Foram utilizadas cuvettes de quartzo com percurso óptico de 1 cm para as soluções de SA e de 1 mm para as soluções de MC-LR e de NOD. Os espectros foram obtidos na gama de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os ensaios de HPLC foram feitos num cromatógrafo AllianceTM Waters 2690, acoplado a um detector espectrofotométrico de fotodíodos (Photodiode Array Detector 996, PDA 996) (Waters, S.A., EUA).

A coluna utilizada foi uma C_{18} de fase reversa ODS-3V (Inertsil).

A fase móvel teve a seguinte composição: 35 % acetonitrilo, 65 % água, 0,05 % ácido fórmico, com pH final de 2,8.

A absorvância UV foi monitorizada a 260 nm (SA) e a 239 nm (MC-LR e NOD), e na gama de 210-600 nm com o PDA.

O volume de injeção utilizado para todas as amostras foi de 50 μ L. A eluição foi feita de modo isocrático, ou seja, a composição da fase móvel foi constante ao longo do tempo.

Os cromatogramas apresentados foram obtidos com o programa Millennium 32 Chromatography Manager (Waters, S.A., EUA).

CAPÍTULO 3

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO ÁCIDO SÓRBICO

A caracterização sistemática do comportamento electroquímico do ácido sórbico e da sua degradação em meio aquoso foi efectuada por voltametria cíclica, de onda quadrada e de impulso diferencial, por espectrofotometria de UV-Vis e por HPLC.

3.1 Oxidação electroquímica do SA

3.1.1 Voltametria Cíclica

O estudo do comportamento electroquímico do SA iniciou-se com experiências de CV. Os primeiros voltamogramas cíclicos foram registados numa solução de SA $7,5 \times 10^{-4}$ M preparada em tampão fosfato, pH 7,0, saturada com N_2 .

O varrimento do potencial teve início a 0,00 V, evoluiu no sentido positivo atingindo o limite de + 1,50 V, onde foi invertido o sentido do varrimento; uma vez atingido o limite negativo de -1,00 V, o sentido do varrimento foi novamente invertido até alcançar o potencial inicial, e assim sucessivamente.

Independentemente do sentido inicial do varrimento, foi observado apenas um pico na região anódica, o que indicou que a única reacção do SA é de oxidação. Assim, todos os voltamogramas cíclicos foram registados na janela de potencial compreendida entre 0,00 V e + 1,50 V.

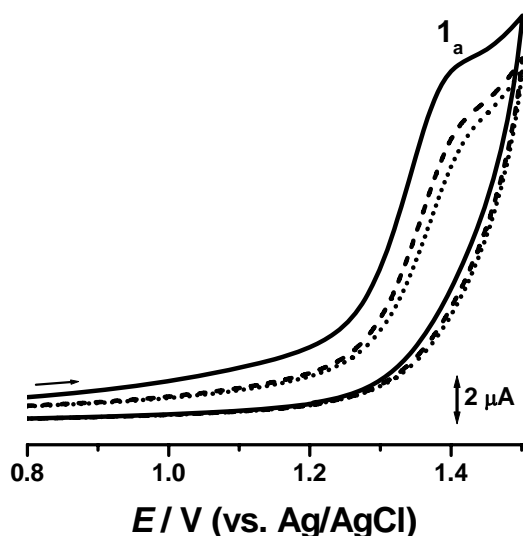


Figura 3.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos com um GCE numa solução de SA 750 μM a pH 7 (tampão fosfato 0,1 M): (—) primeiro, (---) segundo e (•••) terceiro varrimentos a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

No sentido positivo do primeiro varrimento obtido numa solução de SA $7,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ preparada em tampão fosfato, pH 7,0, verificou-se a ocorrência do pico anódico 1_a a $E_{pa}^1 = +1,38 \text{ V}$. Após a inversão do sentido do varrimento não se observou nenhum pico catódico, **Fig. 3.1**, de onde se concluiu que a oxidação do SA à superfície do GCE é uma reacção irreversível. Ainda na mesma solução de SA e sem limpar a superfície do GCE, foram registados varrimentos sucessivos do potencial. Nesses varrimentos não se verificou a existência de novos picos, o que evidenciou que a oxidação do SA não envolve a formação de quaisquer produtos electroactivos. Contudo, observou-se a diminuição da corrente do pico 1_a no segundo e terceiro varrimentos. Esta observação é consequência da adsorção do SA e/ou dos seus produtos de oxidação não electroactivos à superfície do GCE.

3.1.2 Voltametria de Impulso Diferencial

O efeito do pH na oxidação electroquímica do SA foi avaliado por DPV, entre pH 3,4 e 11,9. Preparou-se uma solução de SA $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ para cada valor de pH do electrólito de suporte. Os primeiros voltamogramas registados em cada uma das soluções de SA estão representados graficamente na **Fig. 3.2**.

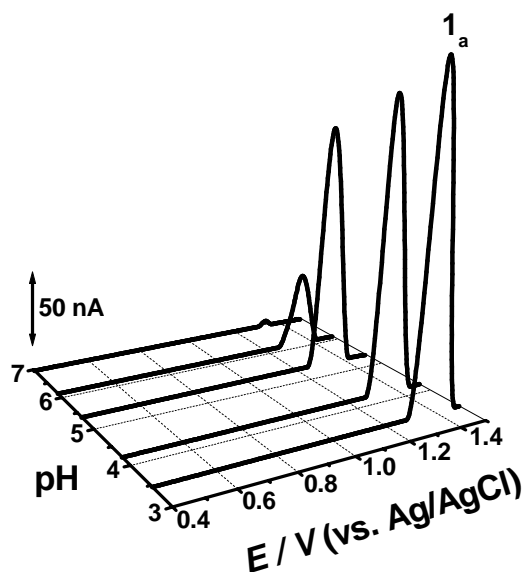


Figura 3.2 – Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE em soluções de SA 150 μM em diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

O pico 1_a foi registado a $E_{pa}^1 \approx +1,36$ V em todos os voltamogramas, independentemente do pH do electrólito de suporte, o que indica que a reacção de oxidação do SA envolve apenas a transferência de electrões. A largura a meia altura do pico 1_a , $W_{1/2} \approx 87$ mV, corresponde à transferência de um electrão [83]. Verificou-se uma diminuição da corrente do pico 1_a com o aumento do pH e para electrólitos de suporte com pH superior a 7,0 o pico 1_a não foi observado.

3.2 Comportamento electroquímico do SA quimicamente degradado

Observou-se que o perfil electroquímico de uma solução de SA imediatamente após a sua preparação e passadas aproximadamente cinco horas não era idêntico, pois foram registados novos picos de oxidação, a potenciais menos positivos. O aparecimento de novos picos foi associado à formação de SA quimicamente degradado (cdSA) em solução ao longo do tempo de incubação. Assim, procedeu-se ao estudo do comportamento electroquímico do cdSA por voltametria.

3.2.1 Voltametria de Impulso Diferencial e efeito do pH

O estudo do comportamento electroquímico do dSA foi primeiro efectuado com uma solução de SA a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M) por DPV. Os voltamogramas foram registados após diferentes tempos de incubação em soluções de SA 30 μM . A superfície do GCE foi devidamente limpa entre cada experiência.

Os voltamogramas registados após 5 horas de incubação apresentavam o pico 2_a , a $E_{pa}^2 = +0,83$ V, que se atribuiu à oxidação do cdSA, **Fig. 3.3**. Nesta solução, foram também registados voltamogramas após períodos mais longos de incubação: 24, 48 e 96 horas, e 7 e 14 dias. Nestes voltamogramas verificou-se ao longo do tempo um aumento progressivo da corrente do pico 2_a , enquanto que a corrente do pico 1_a diminuiu à medida que o tempo de incubação aumentou, até que o pico 1_a deixou de ser observado, **Fig. 3.3**. Contudo, após 14 dias de incubação, a corrente do pico 2_a atingiu um valor constante, o que indicou que a degradação do SA naquela solução estava completa.

Estas experiências evidenciaram que, após um período de incubação em soluções tampão, a molécula de SA sofre alterações estruturais. O decréscimo da corrente do pico 1_a com o passar do tempo corresponde à diminuição da concentração de SA em solução; por outro lado, o aumento da corrente do pico 2_a traduz o aumento da concentração de cdSA na mesma solução.

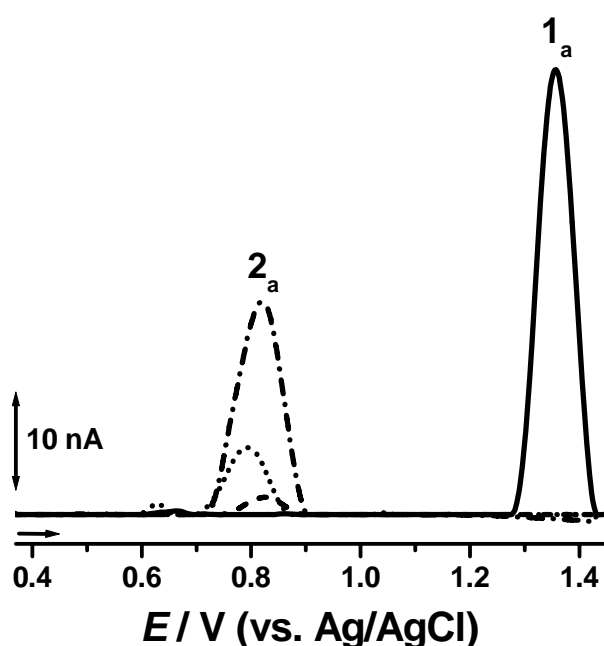


Figura 3.3 – Voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE em soluções de SA 30 μM a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M) após (—) 0 h, (---) 5 h, (•••) 48 h e (-•-) 14 dias de incubação.

Foram registados voltamogramas sucessivos numa solução de SA a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M), após 14 dias de incubação, **Fig. 3.4**. No primeiro varrimento observou-se o pico 2_a a $E_{pa}^2 = +0,82$ V. No segundo varrimento verificou-se o aparecimento de dois novos picos de oxidação: o pico 3_a , a $E_{pa}^3 = +0,48$ V, e o pico 4_a , a $E_{pa}^4 = +0,57$ V. Estes dois picos correspondem à oxidação do produto de oxidação do cdAS formado à superfície do GCE durante o primeiro varrimento do potencial. Com o aumento do número de varrimentos sucessivos, verificou-se o aumento da corrente dos picos 3_a e 4_a , devido à formação de maior quantidade de produto de oxidação do cdSA à superfície do GCE. Verificou-se ainda que os produtos de oxidação do cdSA adsorvem à superfície do GCE, **Fig. 3.4**.

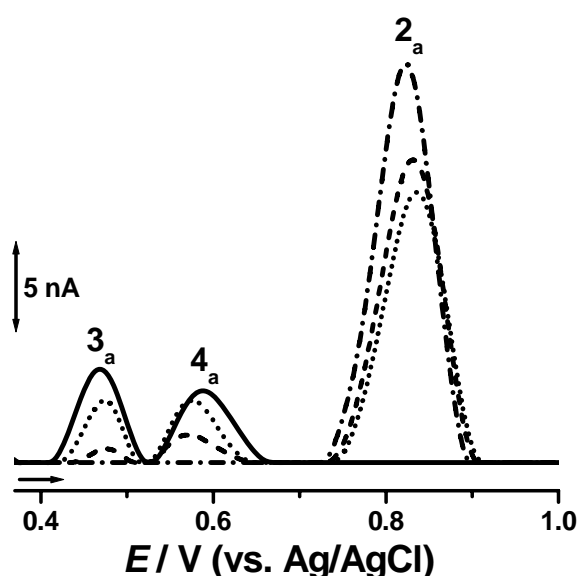


Figura 3.4 – Voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE em soluções de SA 30 μ M a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M) após 14 dias de incubação: (---) 1^o, (---) 2^o e (•••) 3^o varrimentos sucessivos e (—) 1^o varrimentos após transferir o GCE para solução tampão.

O comportamento electroquímico do cdSA e dos seus produtos de oxidação foi estudado por DPV, numa ampla gama de pH: de 3,4 a 11,9. Todos os voltamogramas foram registados em soluções degradadas quimicamente de SA 30 μ M após 14 dias de incubação nos diferentes electrólitos de suporte. A superfície do GCE foi devidamente limpa entre cada experiência.

O pico 2_a foi observado para electrólitos de suporte com pH inferior a 11,9. Para electrólitos com pH superior a 3,4 e inferior a 9,2, verificou-se o deslocamento do potencial do pico 2_a para valores menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 3.5**.

Verificou-se a relação linear, E_{pa}^2 (V) = 1,03 – 0,059 pH, **Fig. 3.6**, e a inclinação da recta (59 mV por unidade de pH), o que permitiu concluir que o mecanismo de oxidação do cdSA envolve a transferência do mesmo número de electrões e de protões [90]. Sendo a largura a meia altura do pico 2_a aproximadamente 73 mV, o mecanismo de oxidação do cdSA deve envolver a transferência de um electrão e de um protão.

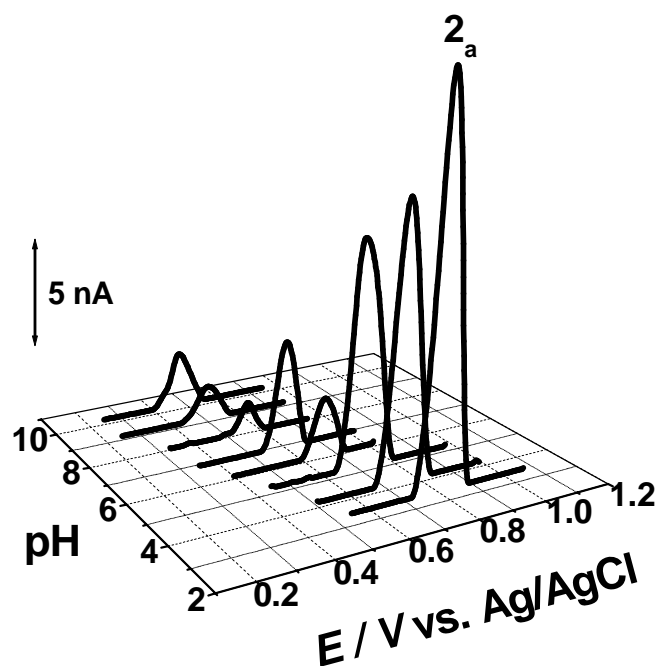


Figura 3.5 - Representação gráfica 3D de voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE após 14 dias de incubação de soluções de SA 30 μ M preparadas em diferentes electrólitos de suporte, em função do pH.

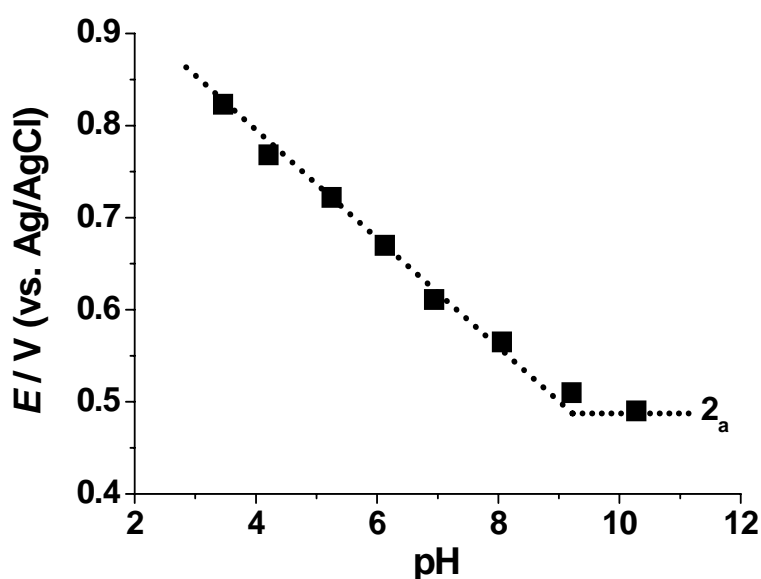


Figura 3.6 - Representação gráfica do potencial (■) E_p do pico 2_a em função do pH.

Para electrólitos de suporte com pH superior a 9,2 o potencial do pico 2_a manteve-se constante. Assim, o mecanismo de oxidação do cdSA é independente do pH, envolvendo apenas a transferência de um electrão.

Pela intersecção da recta com inclinação de 59 mV por unidade de pH com a recta horizontal, **Fig. 3.6**, determinou-se para o cdSA o valor de $pK_a \approx 9,2$.

Durante estas experiências, para cada uma das soluções preparadas nos diferentes electrólitos de suporte foram registados voltamogramas sucessivos sem limpar a superfície do GCE.

Para electrólitos com pH superior a 3,4 e inferior a 11,9, no segundo varrimento, foram observados os picos 3_a e 4_a , que, como mencionado anteriormente, correspondem à oxidação dos produtos de oxidação do dSA formados à superfície do GCE durante o primeiro varrimento do potencial. O comportamento electroquímico destes produtos foi estudado em função do pH do electrólito de suporte.

Verificou-se que o potencial dos picos 3_a e 4_a se deslocou para valores menos positivos com o aumento do pH, numa relação linear entre potencial e pH. O declive da recta, 59 mV por unidade de pH, evidenciou que os mecanismos de oxidação subjacentes envolvem a transferência do mesmo número de electrões e de prótons. Para ambos os picos, registou-se a largura a meia altura de 54 mV, o que indica que ambas as oxidações envolvem, cada uma, a transferência de dois electrões e de dois prótons.

Para electrólitos de suporte com pH superior a 9,2, o potencial dos picos 3_a e 4_a manteve-se constante, ou seja, os mecanismos de oxidação são independentes do pH, envolvendo apenas a transferência de dois electrões.

Foi ainda analisada a variação da corrente do pico 2_a em função do tempo de incubação, **Fig. 3.7**.

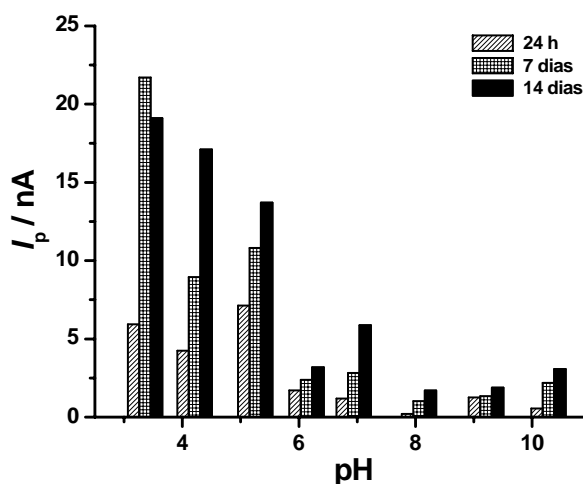


Figura 3.7 – Representação gráfica da variação da corrente do pico 2_a (I_{pa}) com o tempo de incubação, em função do pH do electrólito de suporte.

Através da análise do gráfico, **Fig. 3.7**, verificou-se que os valores mais elevados da corrente do pico 2_a foram obtidos em electrólitos ácidos, o que sugere que a degradação química do SA em solução é favorecida nestes pH's, e desfavorecida em electrólitos alcalinos.

3.2.2 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada foi utilizada com o intuito de melhor caracterizar os produtos da degradação química do SA e o respectivo comportamento electroquímico.

Registaram-se voltamogramas de onda quadrada em diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH. Contudo, o comportamento electroquímico do cdSA foi semelhante nos vários pH's.

O voltamograma apresentado na **Fig. 3.8** foi registado numa solução de SA 30 μM a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M) após 20 dias de incubação. Observou-se que o pico 2_a , a $E_{pa}^2 = +0,87 \text{ V}$, corresponde a uma reacção de oxidação irreversível, pois a componente directa da corrente apresenta um pico anódico de corrente semelhante à corrente total, enquanto que a componente inversa não apresenta qualquer pico catódico.

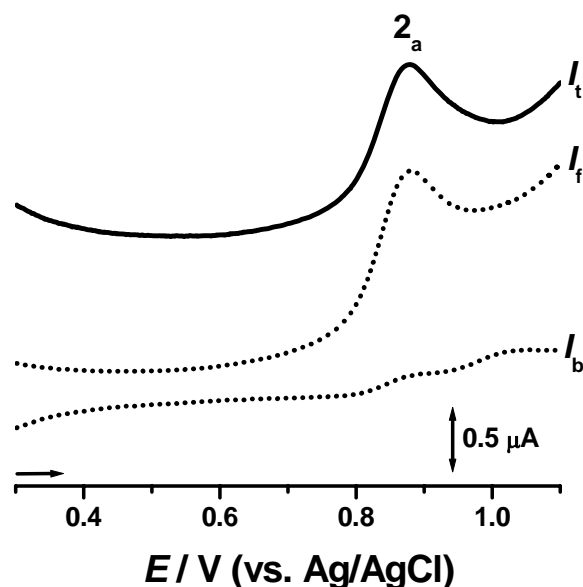


Figura 3.8. Voltamograma de onda quadrada (1^o varrimento) obtido com um GCE após 20 dias de incubação de uma solução de SA 30 μM a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M). $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, amplitude de impulso 50 mV, $\nu_{\text{eff}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

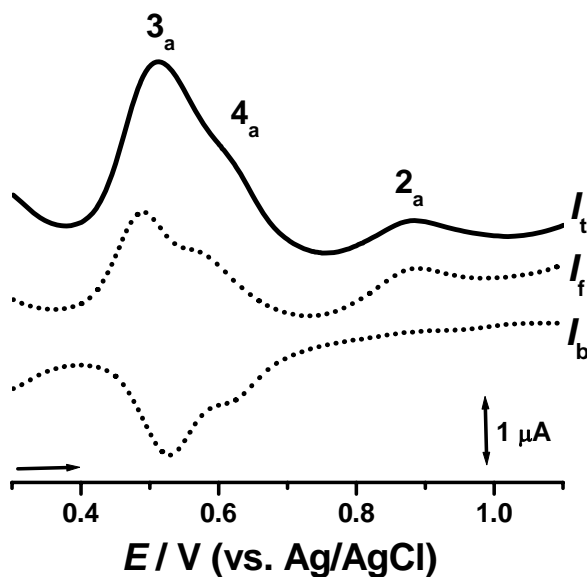


Figura 3.9 - Voltamograma de onda quadrada (2º varrimento) obtido com um GCE após 20 dias de incubação de uma solução de SA 30 μM a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M). $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, amplitude de impulso 50 mV, $v_{\text{eff}} = 100$ mV s^{-1} ; I_t – corrente total, I_f – corrente directa, I_b – corrente inversa.

Foi registado um segundo varrimento na mesma solução de SA sem limpar a superfície do GCE, **Fig. 3.9**. Observou-se o pico 3_a a $E_{\text{pa}}^3 = +0,51$ V e o pico 4_a a $E_{\text{pa}}^4 = +0,62$ V. Através da separação da corrente total nas suas componentes – directa e inversa – verificou-se que ambos os picos correspondem a reacções reversíveis, pois as correntes anódicas e catódicas são iguais. Neste varrimento, a corrente do pico 2_a foi menor do que no primeiro devido à adsorção dos produtos de oxidação do cdSA à superfície do GCE.

3.3 Espectrofotometria de UV-Vis

Foram registados espectros de absorção UV-Vis com a finalidade de complementar os estudos voltamétricos. Os espectros obtidos foram registados em soluções de SA 25 μM preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, fazendo variar o pH entre 2,1 e 11,9.

Para pH inferior a 4,0 os espectros apresentaram uma banda a $\lambda \approx 263$ nm, devida à ligação dupla do grupo carbonílico [70, 91].

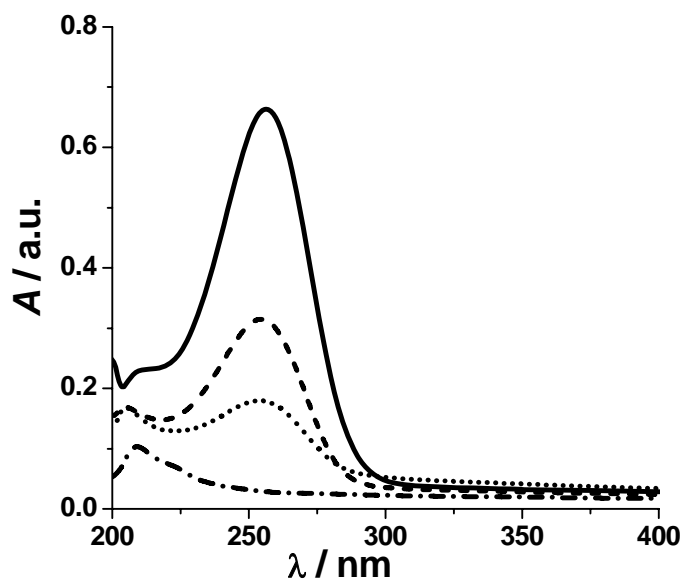


Figura 3.10 – Espectros de absorção UV-Vis de soluções de SA 25 μM preparadas em tampão fosfato 0,1 M: (—) 0 h a pH 6,1, e após 15 dias de incubação a (---) pH 6,1, (···) pH 7,0 e (-·-) pH 8,1.

Para pH superior a 4,0 a banda de absorção deslocou-se para $\lambda \approx 254$ nm com o aumento do pH, **Fig. 3.10**.

Foram registados espectros de absorção para diferentes soluções de SA, com diferentes valores de pH, não só imediatamente após a preparação das soluções, mas também após quinze dias de incubação.

Os espectros registados imediatamente após a preparação das soluções de SA a pH 6,1, 7,0 e 8,1 foram semelhantes, **Fig. 3.10**. Após quinze dias, a intensidade da banda de absorção diminuiu para os pH's 7,0 e 8,1; para pH 6,1 a banda de absorção não foi observada.

Estas observações levaram à conclusão de que a degradação do SA em meio aquoso é desfavorecida com o aumento do pH. Esta conclusão vai de encontro ao que havia sido anteriormente verificado nas experiências electroquímicas, **Fig. 3.7**.

3.4 HPLC

Com os ensaios de HPLC com detecção UV de comprimento de onda variável (PDA) pretendeu-se complementar os resultados obtidos através da electroquímica e da espectrofotometria.

Foram testadas soluções de SA 5 μM imediatamente após a sua preparação na fase móvel, e também ao fim de 24 dias de incubação.

O cromatograma correspondente à solução de SA logo após a sua preparação apresentou um único pico, com um tempo de retenção de 5,5 minutos, **Fig. 3.11**, cujo máximo de absorvância foi registrado para $\lambda \approx 262$ nm.

Após 24 dias de incubação, o cromatograma obtido apresentou três picos, **Fig. 3.12**. O pico corresponde ao SA apresentou o mesmo tempo de retenção; contudo, a intensidade da absorvância registrada foi inferior. Os dois novos picos apresentaram tempos de retenção de 3,8 e 9,5 minutos, com máximos de absorvância registrados para $\lambda \approx 246$ nm e $\lambda \approx 256$ nm, respectivamente.

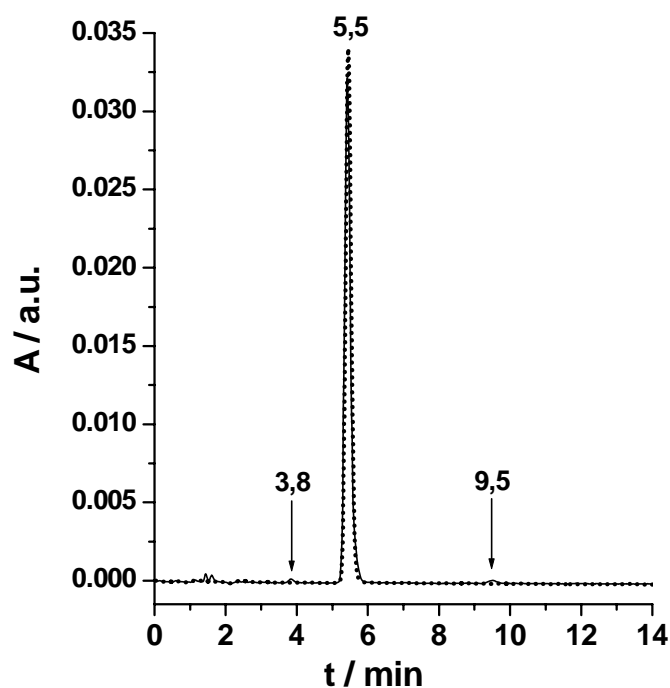


Figura 3.11 – Cromatogramas obtidos para soluções de SA 5 μM após (•••) 0 h e (—) 24 dias de incubação.

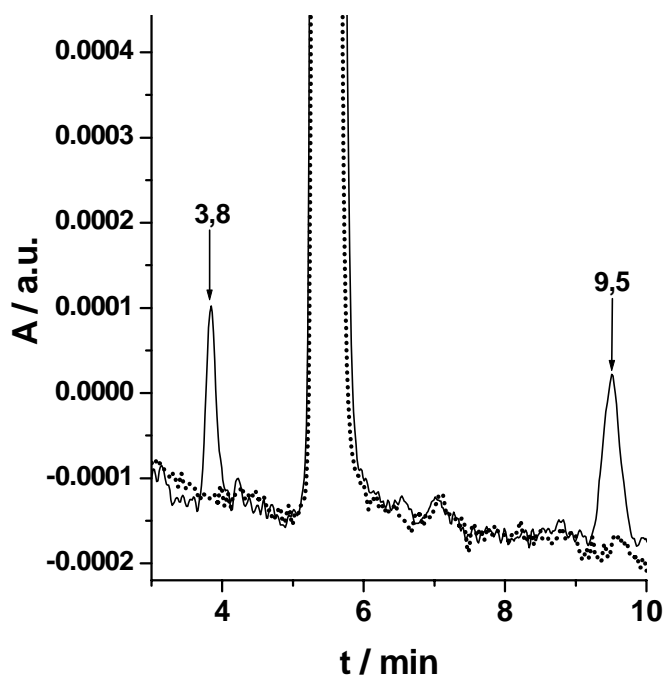


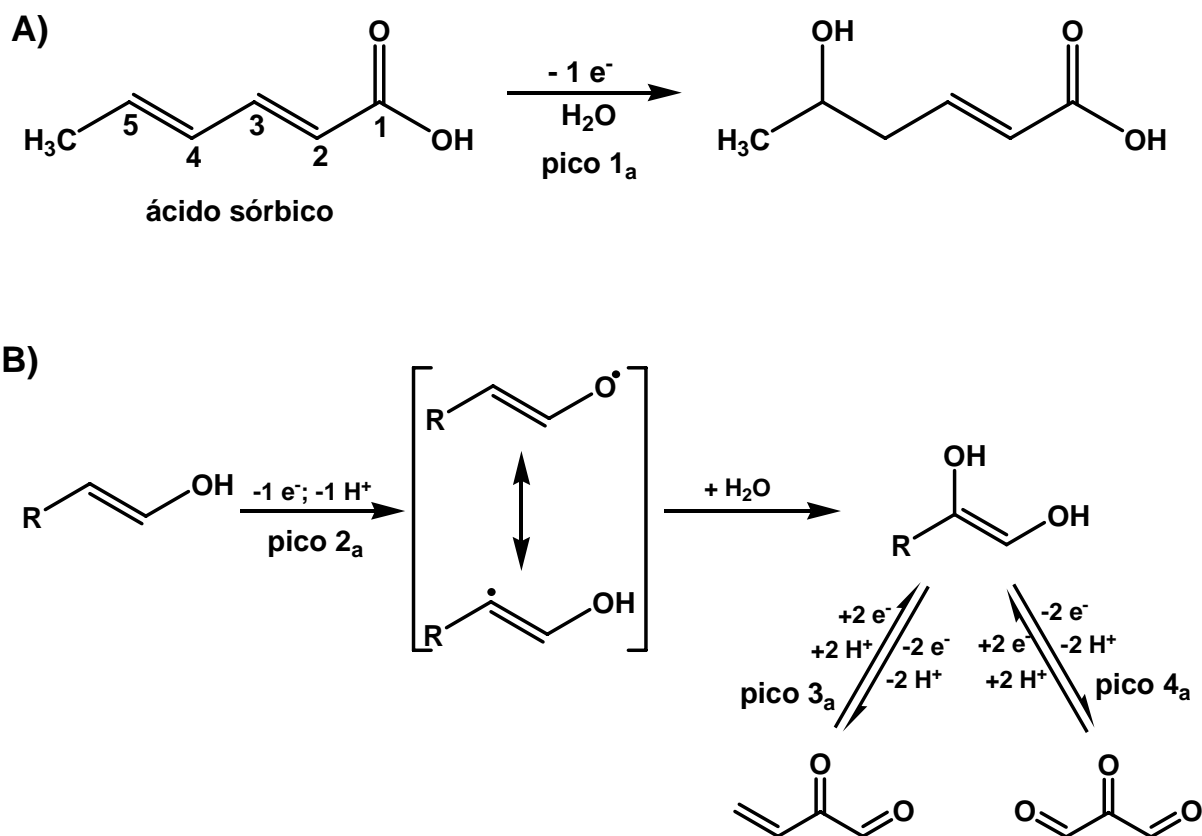
Figura 3.12 – Detalhe dos cromatogramas apresentados na Fig. 3.11.

O aparecimento destes novos picos levou a concluir que o processo de degradação química do SA em solução envolve a quebra da molécula em duas partes, que constituem os produtos de degradação.

3.5 Mecanismo de oxidação e de degradação do SA

As experiências efectuadas demonstraram que o SA é oxidado à superfície de eléctrodos de carbono.

A oxidação tem lugar na ligação dupla existente entre os átomos de carbono 2 (C2) e 3 (C3) ou 4 (C4) e 5 (C5). Uma vez que a ligação dupla C2 – C3 está mais próxima do terminal carboxílico da molécula de SA, o seu acesso à superfície do GCE é mais difícil relativamente à ligação dupla C4 – C5; assim, o pico 1_a corresponde à quebra da ligação dupla C4 – C5, com a remoção de um electrão e adição de um grupo hidroxilo ao carbono C5, **Esquema 3.1A**.



Esquema 3.1. Mecanismo proposto para a oxidação (A) do SA e (B) do dSA.

Os resultados electroquímicos revelaram que a degradação química do SA envolve a formação de um produto electroactivo (pico 2_a).

Os principais produtos de degradação do SA em soluções aquosas são o malonaldeído, o crotonaldeído e a acroleína [70]. A acroleína é uma molécula planar com as orbitais π das ligações duplas C=C e C=O sobrepostas, o que lhe confere maior estabilidade. Assim, a oxidação da acroleína ocorre para um potencial muito superior à decomposição do solvente aquoso e não pode ser detectada. O pico 2_a é devido à oxidação do malonaldeído e do crotonaldeído.

No **Esquema 3.1B** é proposto um mecanismo para a oxidação do crotonaldeído e do malonaldeído à superfície do GCE, pico 2_a, com a formação de 2-hidroxicrotonaldeído e 2-hidroxi-malonaldeído [92,93], que são reversivelmente oxidados, picos 3_a-3_c e 4_a-4_c, respectivamente.

CAPÍTULO 4

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA MICROCISTINA-LR

Neste capítulo descreve-se o comportamento electroquímico da microcistina-LR (MC-LR), e dos seus produtos de degradação química em diferentes electrólitos de suporte.

4.1 Teste dos aminoácidos constituintes da MC-LR

Na sua estrutura química, a MC-LR contém os seguintes aminoácidos: alanina (Ala), ácido *D-eritro-β*-metil aspártico (MeAsp), Adda, glutamato (Glu), Mdha, leucina (Leu) e arginina (Arg). Com a finalidade de determinar quais os centros electroactivos da molécula de MC-LR, isto é, quais os locais responsáveis pela geração dos sinais electroquímicos, foram também investigados estes aminoácidos.

4.1.1 Leu, Arg, Ala, Glu e Asp

Foram preparadas soluções de Leu, Arg, Ala, Glu e Asp, 30 e 60 μM , a pH 5,3 (tampão acetato) e a pH 7,0 (tampão fosfato). Estas soluções foram investigadas por DPV com um GCE.

Os voltamogramas registados nestas soluções não apresentaram qualquer resposta electroquímica, mesmo após incubação durante longos períodos de tempo.

4.1.2 *N*-metildesidroalanina (Mdha)

A *N*-metildesidroalanina (Mdha) é um dos aminoácidos constituintes da estrutura cíclica da MC-LR.

Dado que não foi possível obter comercialmente o aminoácido Mdha, estudou-se um composto semelhante, o ácido 2-acetamidoacrílico (2-AAA) ou *N*-acetildesidroalanina.

Foram preparadas soluções de 2-AAA 60 μ M, na gama de pH entre 3,5 e 7,0. Estas soluções foram testadas por DPV após diferentes tempos de incubação, com um GCE.

Em todos os voltamogramas registados, independentemente do pH da solução e do tempo de incubação, observou-se apenas um pico anódico, a $E_{pa} = + 1,30$ V, **Fig. 4.1**.

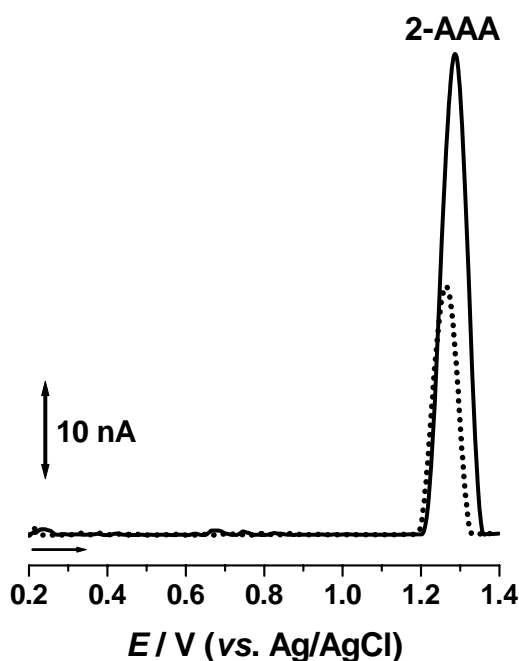


Figura 4.1. Voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE numa solução de 2-AAA 60 μ M a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M), após (—) 0 h e (•••) 6 dias de incubação.

Estas experiências revelaram que a oxidação electroquímica do 2-AAA à superfície do GCE é uma reacção independente do pH do electrólito de suporte.

Após longos períodos de incubação, os voltamogramas registados não apresentaram novos picos de oxidação; verificou-se apenas a diminuição da corrente do pico observado inicialmente.

4.1.3 Adda

À semelhança do Mdha, também não foi possível adquirir o aminoácido Adda via comercial, e foi investigado um composto análogo, o ácido sórbico (SA), descrito no Capítulo 3.

4.2 Comportamento electroquímico da MC-LR

4.2.1 Voltametria cíclica

O estudo do comportamento electroquímico da MC-LR foi iniciado com experiências de voltametria cíclica (CV), com um GCE, em soluções de MC-LR 50 μM em diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH. Todas as soluções foram saturadas com N_2 antes do início dos varrimentos cíclicos; durante o decorrer das experiências, foi mantido um fluxo constante de N_2 sobre a solução a fim de evitar a difusão de oxigénio atmosférico para o interior da solução de MC-LR.

O varrimento do potencial efectuado nas experiências de CV teve início a 0,00 V, até ao limite positivo de + 1,35 V, onde foi invertido o sentido do varrimento, atingindo posteriormente o limite negativo de - 1,00 V. Observou-se que, independentemente do sentido inicial do varrimento (para valores positivos ou para valores negativos de potencial), os voltamogramas apresentavam um único pico na região anódica, o que revelou que a MC-LR apenas sofre oxidação à superfície do GCE. Após esta observação, todas as experiências posteriores de CV foram efectuadas apenas na região anódica.

Nos voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de MC-LR 50 μM a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M) observou-se o pico 1_a , a $E_{pa}^1 = + 1,21$ V, correspondente à oxidação da MC-LR, **Fig. 4.2**. Uma vez que na região catódica não se observou qualquer pico, concluiu-se que a reacção de oxidação da MC-LR à superfície do GCE é irreversível. Ainda na mesma solução de MC-LR, sem limpar a superfície do eléctrodo, foram registados varrimentos sucessivos de potencial, nos quais se verificou uma diminuição da corrente do pico 1_a . Este efeito deve-se à adsorção da MC-LR e/ou dos seus produtos de oxidação à superfície do GCE, que diminui a área electroactiva disponível para a oxidação de novas moléculas de MC-LR.

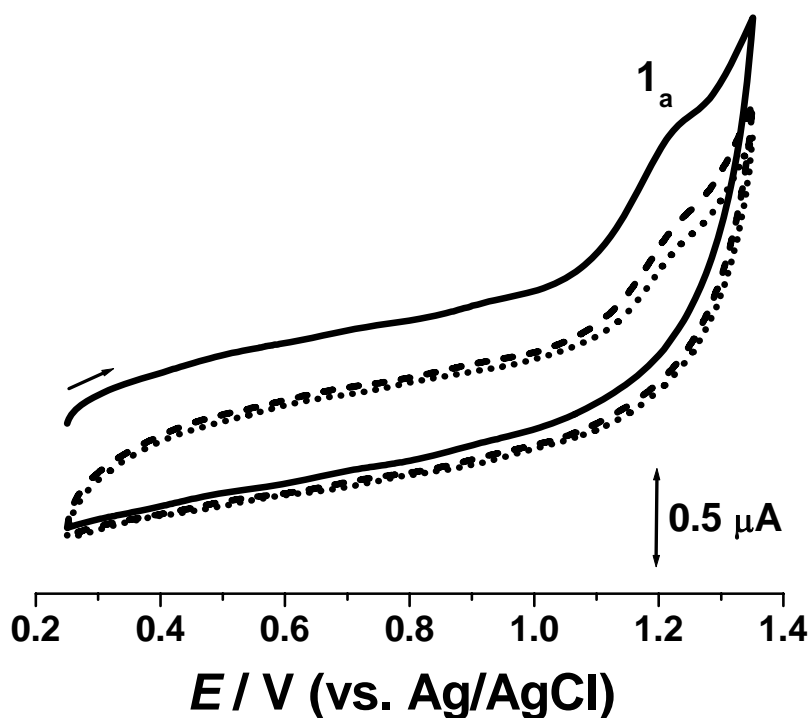


Figura 4.2. Voltamogramas cíclicos obtidos com um GCE numa solução de MC-LR $50 \mu M$ a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M): (—) 1.º, (---) 2.º e (···) 3.º varrimento registados imediatamente após a adição de MC-LR ao electrólito de suporte; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.2 Voltametria de Onda Quadrada

A grande vantagem da voltametria de onda quadrada consiste na possibilidade de determinar, num único varrimento, se a reacção de transferência de carga é reversível ou irreversível.

Foram registados vários voltamogramas de onda quadrada em soluções de MC-LR $30 \mu M$ preparadas em diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH. No primeiro voltamograma obtido na solução de MC-LR a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M) observou-se o pico 1_a , a $E_{pa}^1 = + 1,19 \text{ V}$, **Fig. 4.3**. Uma vez que em SWV a corrente é registada em duas componentes – directa, I_f , e inversa, I_b – a irreversibilidade da reacção de oxidação da MC-LR foi confirmada após comparação das duas componentes da corrente total: enquanto que na componente directa o pico de oxidação apresentava a mesma intensidade de corrente registada na corrente total, na componente inversa não se observou qualquer pico catódico.

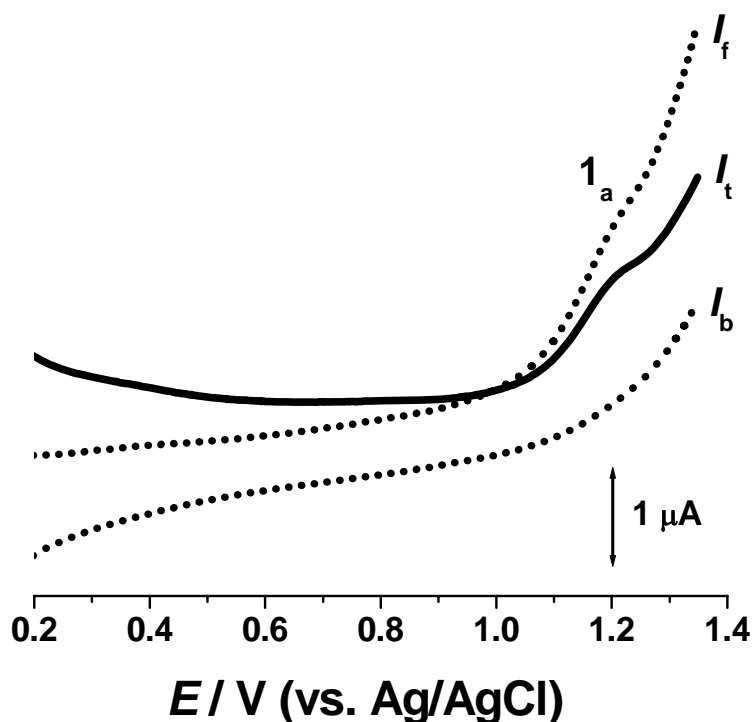


Figura 4.3. Voltamograma de onda quadrada registado com um GCE numa solução de MC-LR 30 μM a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M) imediatamente após a adição de MC-LR ao electrólito de suporte; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, amplitude de impulso 50 mV , $v_{\text{eff}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa.

4.2.3 Voltametria de impulso diferencial

A oxidação electroquímica da MC-LR foi estudada por DPV numa vasta gama de pH, entre 1,3 e 11,9. Todos os voltamogramas de impulso diferencial foram registados em soluções de MC-LR 30 μM preparadas em diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH, listados na **Tabela 2.1** (Capítulo 2).

Os voltamogramas de impulso diferencial registados imediatamente após a adição de MC-LR a cada electrólito de suporte estão representados a três dimensões (3D) na **Fig. 4.4**. Para $1,3 < \text{pH} < 8,2$, no primeiro varrimento, o pico 1_a apareceu sempre ao mesmo valor de potencial: $E_{\text{pa}}^1 \approx +1,06 \text{ V}$.

A independência do potencial de oxidação da MC-LR, **Fig. 4.4**, em relação ao pH é indicativa de que o mecanismo de oxidação envolve apenas a transferência de electrões, sem que haja qualquer transferência de prótons [90]. A largura a meia altura ($W_{1/2}$) registada para o pico 1_a foi $W_{1/2} \approx 89 \text{ mV}$, correspondendo à transferência de um electrão [83], pelo que se

pode concluir que a oxidação da MC-LR à superfície do GCE envolve unicamente a transferência de um electrão. Observou-se ainda a diminuição da corrente do pico 1_a com o aumento do pH, **Fig. 4.5**; a corrente máxima foi registada a pH's ácidos. Para pH > 8,2 o pico 1_a não foi detectado.

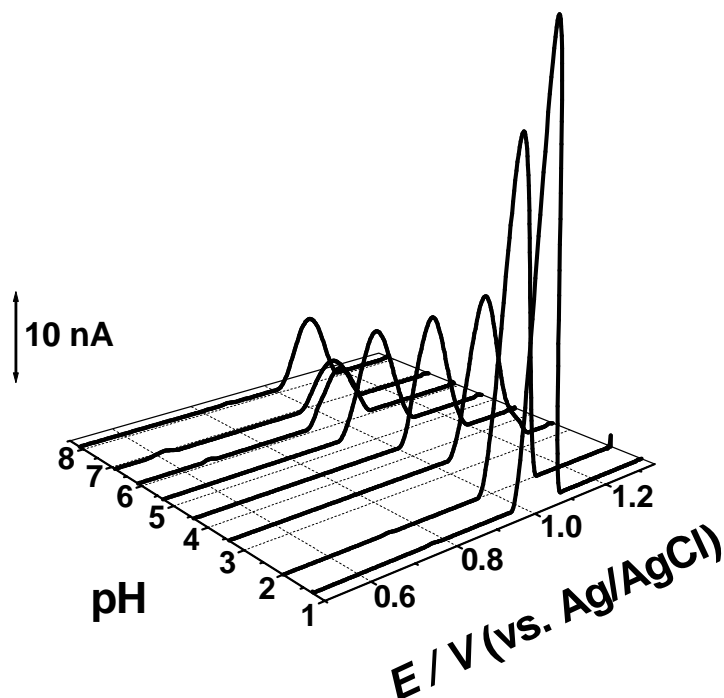


Figura 4.4. Representação 3D de voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base, obtidos com um GCE, em soluções de MC-LR 30 μ M preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

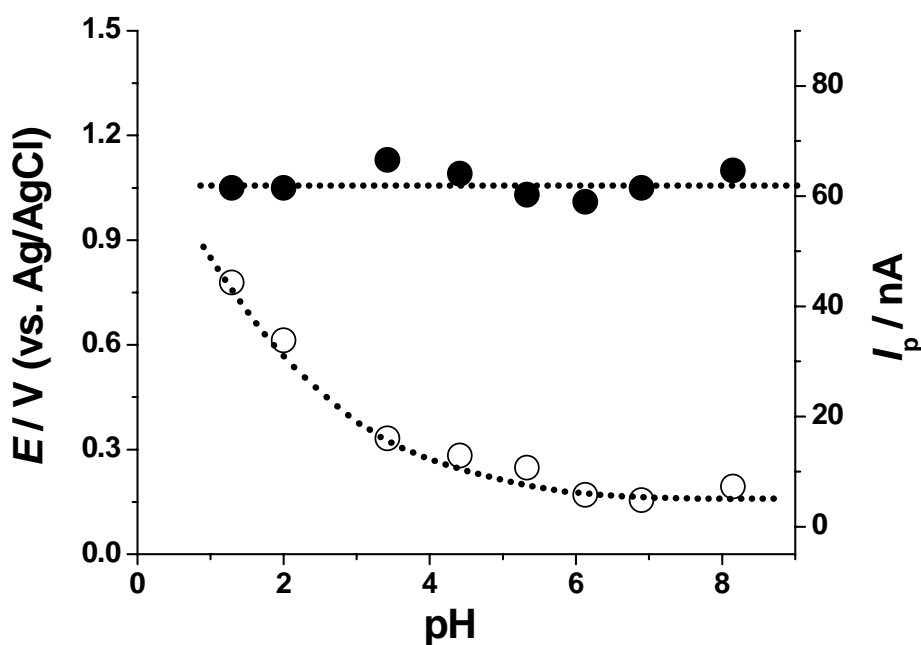


Figura 4.5. Representação gráfica do potencial (●) E_p , e da corrente (○) I_p do pico 1_a em função do pH.

Foram registados varrimentos sucessivos em cada solução de MC-LR, sem limpar a superfície do eléctrodo. No segundo e no terceiro varrimento verificou-se uma diminuição progressiva da intensidade de corrente do pico 1_a , bem como a sua deslocação para potenciais mais positivos. Este efeito é uma consequência da diminuição da área electroactiva livre, devido à adsorção da MC-LR e/ou dos seus produtos de oxidação não electroactivos à superfície do GCE. Contudo, não se verificou a ocorrência de nenhum pico novo nestes varrimentos, pelo que se concluiu que o mecanismo de oxidação electroquímica da MC-LR não envolve a formação de quaisquer produtos electroactivos.

4.3 Comportamento electroquímico da MC-LR quimicamente degradada

Passadas algumas horas após a preparação das soluções de MC-LR nos diferentes electrólitos de suporte, verificou-se uma alteração do comportamento electroquímico da toxina, que se traduziu no aparecimento de novos picos, a potenciais de oxidação mais baixos. Assim, o comportamento electroquímico da MC-LR quimicamente degradada em solução aquosa (cdMC-LR) foi estudado por CV, SWV e DPV, nos diversos electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

4.3.1 Voltametria Cíclica

Foram registados voltamogramas cíclicos numa solução de cdMC-LR, obtida 96 horas após a preparação da solução de MC-LR 50 μ M, a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M).

No primeiro varrimento no sentido positivo verificou-se o aparecimento do pico 1_a , a $E^1_{pa} = +1,21$ V, correspondente à oxidação da MC-LR, bem como um novo pico – o pico 2_a – a $E^2_{pa} = +0,94$ V, **Fig. 4.6**. Este novo pico foi atribuído à oxidação da cdMC-LR à superfície do GCE. Após a inversão do sentido do varrimento (sentido negativo do primeiro varrimento cíclico), registou-se a ocorrência de dois novos picos catódicos: o pico 4_c , a $E^4_{pc} = +0,58$ V, e o pico 3_c , a $E^3_{pc} = +0,47$ V. Estes dois picos foram atribuídos à redução dos produtos de oxidação da cdMC-LR formados à superfície do GCE aquando do varrimento anódico.

No segundo varrimento cíclico registado na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, observou-se o aparecimento de dois novos picos de oxidação: o pico 3_a , a $E^3_{pa} = +0,52$ V, e o pico 4_a , a $E^4_{pa} = +0,62$ V. O aparecimento dos picos 3 e 4 em ambos os

varrimentos – anódico e catódico – evidenciou a reversibilidade destas duas reacções de oxidação-redução.

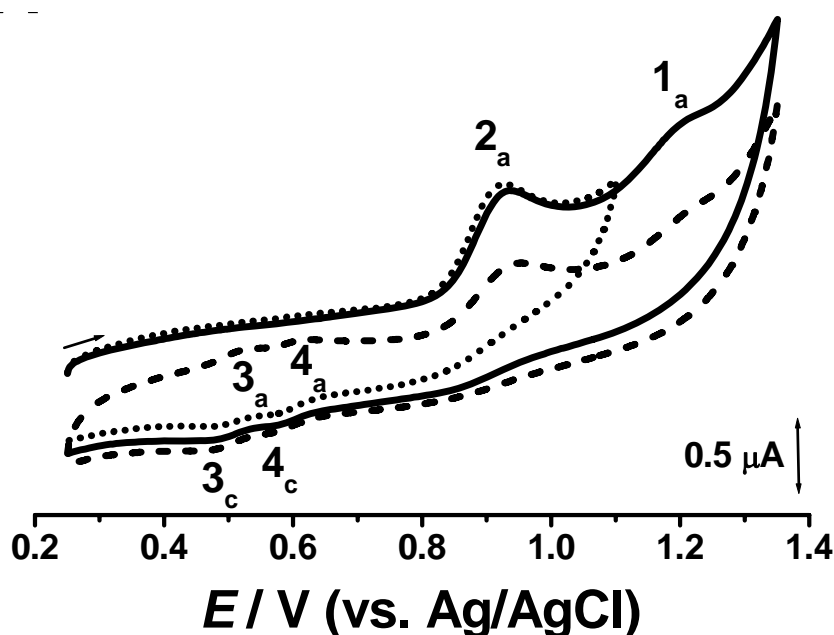


Figura 4.6. Voltamogramas cíclicos obtidos com um GCE numa solução de MC-LR 50 μM após 96 h de incubação a pH 3,4 (tampão acetato 0,1 M): (—) 1^o e (---) 2^o varrimento entre + 0,25 V e + 1,35 V, e (•••) 1^o varrimento entre + 0,25 e + 1,10 V; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Com o intuito de averiguar qual dos picos, 1_a ou 2_a, levava à ocorrência dos picos 3_a e 4_a, após limpar a superfície do GCE, foram registados voltamogramas cíclicos nas condições anteriormente descritas; porém, o sentido do varrimento foi invertido imediatamente após o aparecimento do pico 2_a. Os picos 3_a e 4_a foram observados nestas condições, o que permitiu concluir que ambos são os produtos de oxidação da cdMC-LR formados na reacção do pico 2_a.

4.3.2 Voltametria de Onda Quadrada

Foram registados voltamogramas de onda quadrada numa solução de cdMC-LR, obtida 53 horas após a preparação da solução de MC-LR 30 μM , a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M).

No primeiro voltamograma verificou-se o aparecimento do pico 2_a, a $E_{pa}^2 = + 0,78 \text{ V}$, **Fig. 4.7**, correspondente à oxidação da cdMC-LR. Ao comparar as componentes de corrente, verificou-se que a corrente directa apresentava um pico com a mesma intensidade de corrente

que a corrente total; por sua vez, a corrente inversa não apresentava qualquer pico. Assim, confirmou-se a irreversibilidade da reacção de oxidação da cdMC-LR, pico 2_a.

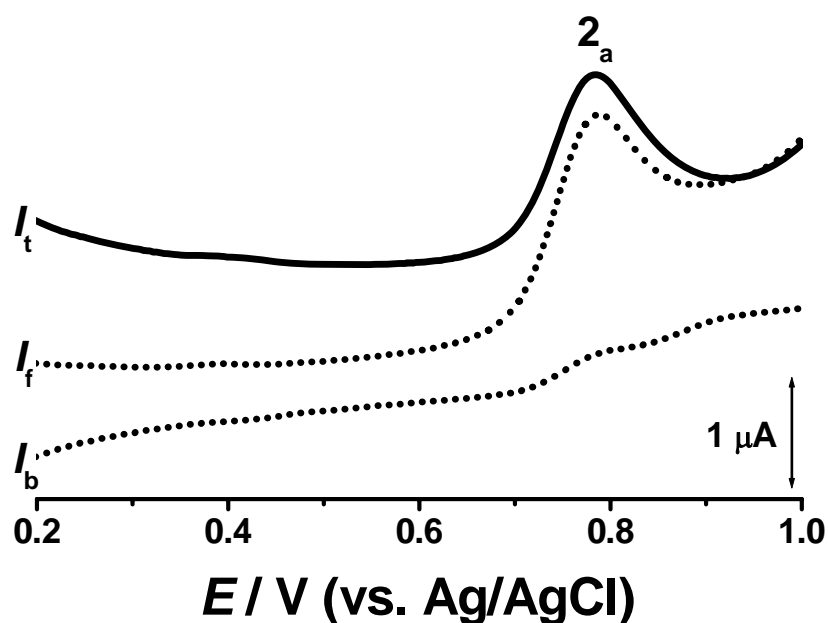


Figura 4.7. Voltamograma de onda quadrada (1^o varrimento) obtido com um GCE numa solução de MC-LR 30 μ M após 53 h de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M); $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, amplitude de impulso 50 mV, $v_{\text{eff}} = 100$ mV s⁻¹; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa.

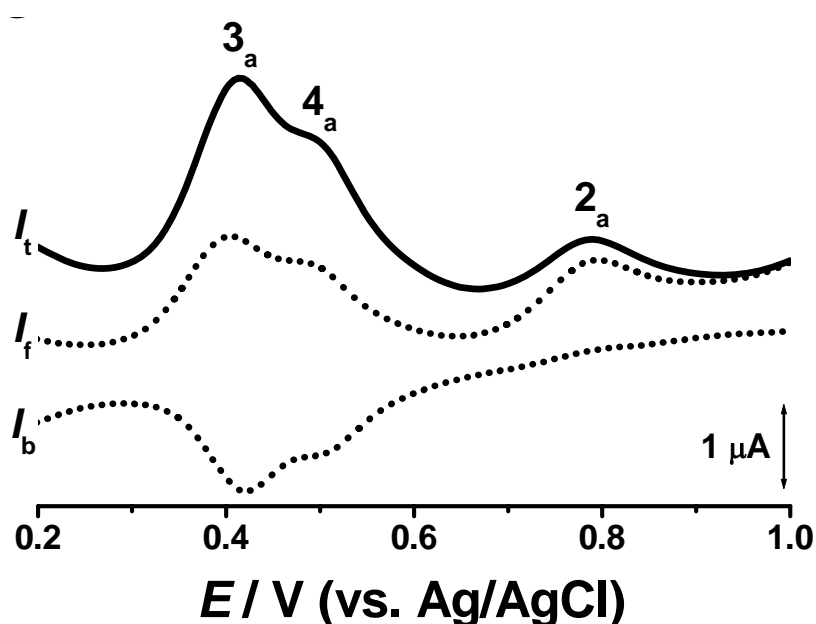


Figura 4.8. Voltamograma de onda quadrada (2^o varrimento) registado com um GCE numa solução de MC-LR 30 μ M após 53 h de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M); $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, amplitude de impulso 50 mV, $v_{\text{eff}} = 100$ mV s⁻¹; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa.

No segundo voltamograma registado na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, observou-se o pico 3_a, a $E_{pa}^3 = +0,41$ V, e o pico 4_a, a $E_{pa}^4 = +0,51$ V. Por comparação das componentes directa e inversa da corrente total, verificou-se que as intensidades da corrente de oxidação e da corrente de redução eram iguais, **Fig. 4.8**. Assim, ficou confirmada a reversibilidade das reacções que ocorrem nos picos 3 e 4. Estes resultados confirmaram os resultados obtidos por CV, onde a reversibilidade destas reacções já havia sido evidenciada.

4.3.3 Voltametria de Impulso Diferencial

O comportamento electroquímico da cdMC-LR e dos seus produtos de oxidação foi estudado por DPV numa ampla gama de pH, entre 1,3 e 11,9. Os voltamogramas foram registados em soluções de cdMC-LR obtidas através da incubação de soluções de MC-LR 30 μ M durante diferentes períodos de tempo, em diferentes electrólitos de suporte.

Os voltamogramas obtidos após 5 horas de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M) apresentaram o pico 2_a, a $E_{pa}^2 = +0,76$ V, **Fig. 4.9**, no primeiro varrimento.

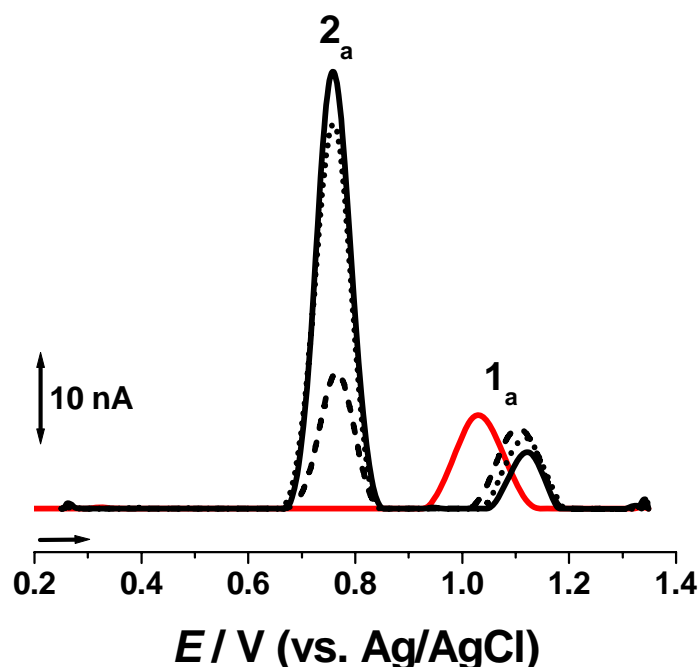


Figura 4.9. Voltamogramas de impulso diferencial (1^o varrimento) com correcção de linha de base obtidos com um GCE numa solução de MC-LR 30 μ M após (—) 0 h, (---) 5 h, (•••) 24 h e (—) 29 h de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M).

Foram igualmente registados voltamogramas de impulso diferencial nesta solução após 24 e 29 horas de incubação. Nestes voltamogramas verificou-se um aumento progressivo da corrente do pico 2_a com o aumento do tempo de incubação. Simultaneamente, observou-se uma diminuição progressiva da corrente do pico 1_a , e o seu potencial tornou-se mais positivo, **Fig. 4.9**.

Estes resultados sugerem que, com o tempo, ocorrem alterações estruturais nas moléculas de MC-LR incubadas nas diferentes soluções tampão. A diminuição da corrente do pico 1_a com o aumento do tempo de incubação traduz a diminuição na concentração de MC-LR em solução; por outro lado, o aumento da corrente do pico 2_a com o aumento do tempo de incubação corresponde ao aumento da concentração de cdMC-LR na mesma solução.

Foram registados varrimentos sucessivos numa solução de cdMC-LR, obtida após 29 horas de incubação de uma solução de MC-LR $30 \mu\text{M}$ a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M). No primeiro varrimento observou-se o aparecimento do pico 1_a , a $E_{pa}^1 = +1,09 \text{ V}$, e do pico 2_a , a $E_{pa}^2 = +0,76 \text{ V}$, **Fig. 4.10**.

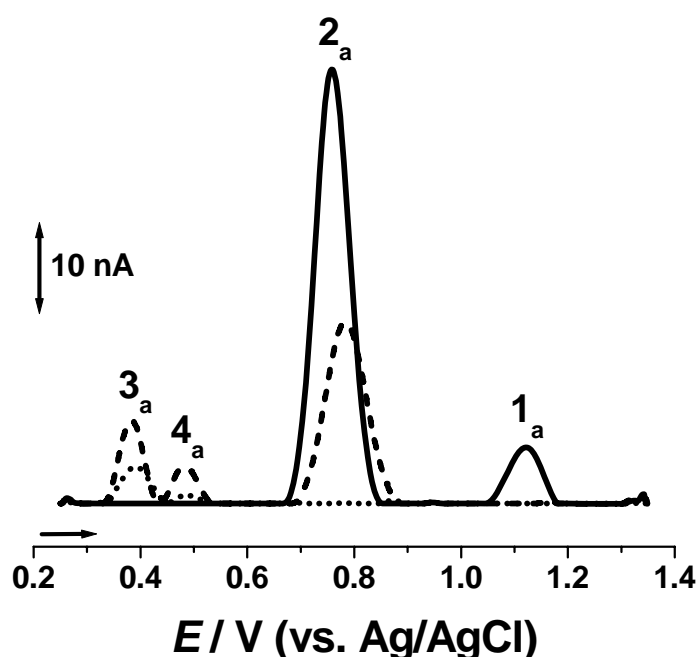


Figura 4.10. Voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE numa solução de MC-LR $30 \mu\text{M}$ após 29 h de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M): (—) 1°, (---) 2° na solução de dMC-LR e (•••) 1° varrimento após transferir o GCE para a solução tampão.

A adsorção dos produtos de oxidação da dMC-LR à superfície do GCE foi confirmada quando, após o registo de vários varrimentos sucessivos numa solução de cdMC-LR, o GCE foi lavado abundantemente com água desionizada e posteriormente transferido para a solução tampão. O voltamograma obtido nestas condições apresentou os picos 3_a e 4_a, **Fig. 4.10**.

A dependência da oxidação da cdMC-LR em relação ao pH do electrólito de suporte foi investigada em soluções de MC-LR 30 μM incubadas durante 29 horas, nos diferentes electrólitos de suporte, **Fig. 4.11**.

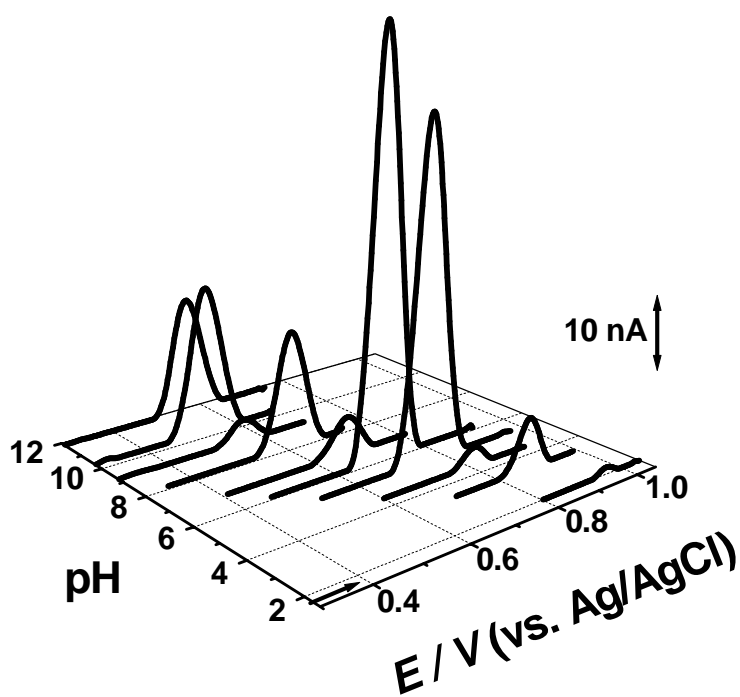


Figura 4.11. Representação 3D de voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base, obtidos com um GCE em soluções de MC-LR 30 μM incubadas durante 29 h nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

No primeiro voltamograma registou-se o pico 2_a para todos os electrólitos de suporte, excepto para pH 1,3. Para $1,3 < \text{pH} < 9,2$, o potencial do pico 2_a deslocou-se progressivamente para valores menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 4.12**.

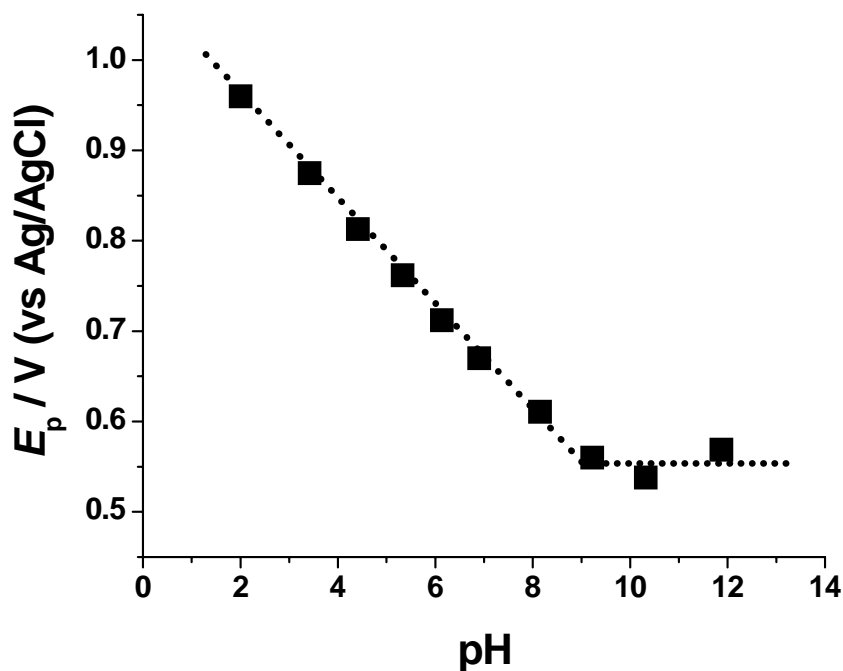


Figura 4.12. Representação gráfica do potencial (■) E_p do pico 2_a em função do pH.

Verificou-se que a relação entre o pH e o deslocamento de potencial seguia a equação $E_{pa}^2 (V) = 1,081 - 0,059 \text{ pH}$, **Fig. 4.12**.

O declive de 59 mV por unidade de pH é característico dos mecanismos de oxidação que envolvem a transferência do mesmo número de electrões e de protões [90]. Tendo em conta o valor da largura a meia altura do pico 2_a, $W_{1/2} \approx 74 \text{ mV}$, concluiu-se que a reacção de oxidação que origina o pico 2_a envolve a transferência de um electrão e de um protão. Para pH > 9,2 observou-se que o potencial do pico 2_a não sofreu alterações. Assim, para pH > 9,2 a oxidação da cdMC-LR é independente do pH do electrólito de suporte, e o mecanismo envolve unicamente a transferência de um electrão. Tendo por base os resultados descritos, determinou-se o valor de $\text{pK}_a \approx 9,2$ para a cdMC-LR.

No segundo voltamograma apareceram os picos 3_a e 4_a, **Fig. 4.13**. Com o aumento do pH até 9,2, observou-se uma diminuição do potencial de ambos os picos, **Fig. 4.14**. Verificou-se uma dependência linear com declive de 59 mV por unidade de pH, indicando que os mecanismos das reacções subjacentes aos picos 3_a e 4_a envolvem a transferência do mesmo número de electrões e protões. A largura a meia altura registada para o pico 3_a foi $W_{1/2} \approx 48 \text{ mV}$ e para o pico 4_a foi $W_{1/2} \approx 44 \text{ mV}$. Em função destes valores obtidos, concluiu-se que as reacções de oxidação dos picos 3_a e 4_a envolvem, cada uma, a transferência de dois electrões e de dois protões.

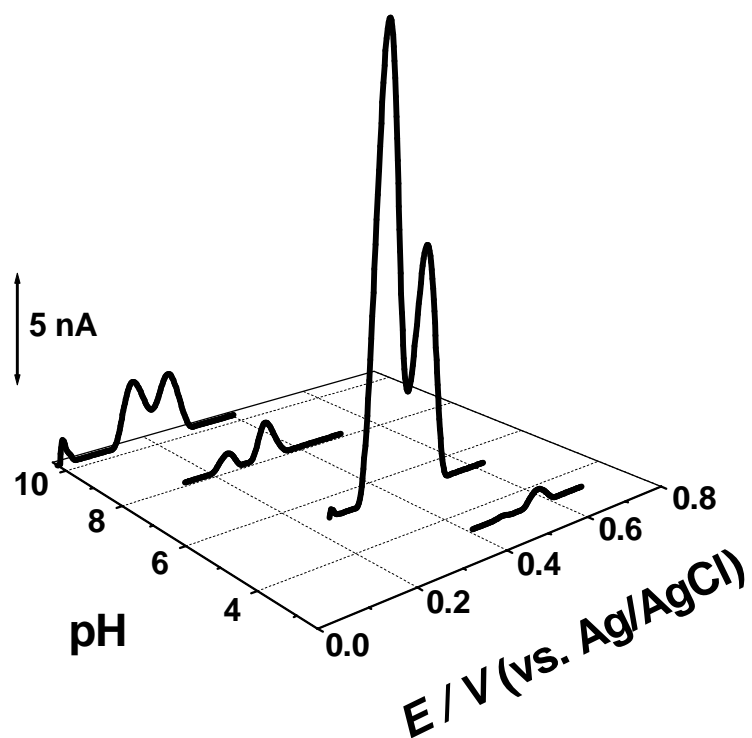


Figura 4.13. Representação 3D de voltamogramas de impulso diferencial (2º varrimento) com correção de linha de base, obtidos com um GCE em soluções de MC-LR 30 μ M incubadas durante 29 h nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

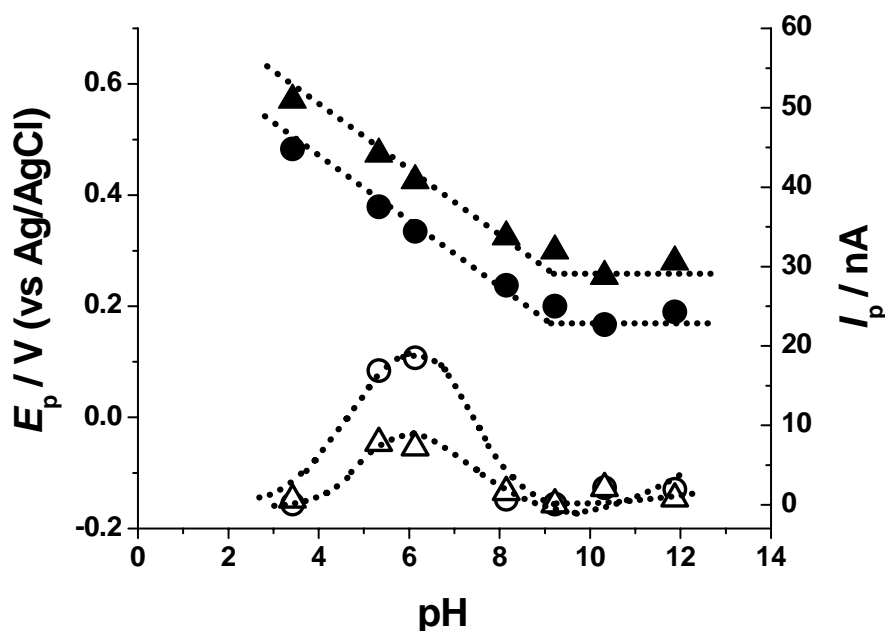


Figura 4.14. Representação gráfica do potencial, E_p , dos picos (●) 3_a e (▲) 4_a, e da corrente, I_p , dos picos (○) 3_a e (△) 4_a, em função do pH.

As correntes dos picos 3_a e 4_a apresentaram valores máximos para electrólitos de suporte com valor de pH compreendido entre 5,3 e 6,1 (Fig. 4.13 e 4.14).

Tal como foi verificado para o pico 2_a, para pH > 9.2, o potencial dos picos 3_a e 4_a é independente do pH, **Fig. 4.14**, pelo que se concluiu que o mecanismo de oxidação envolve apenas a transferência de dois electrões.

4.4 Espectrofotometria de UV-Visível

Com o intuito de complementar os estudos voltamétricos, foram registados espectros de absorção UV-Vis. Para tal, foram utilizadas soluções de MC-LR 30 µM, preparadas em diversos electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

O espectro de absorção UV-Vis registado a pH 6,1 (tampão fosfato 0,1 M), imediatamente após a adição de MC-LR à solução tampão, **Fig. 4.15**, apresentou uma única banda a 239 nm, atribuída ao aminoácido Adda presente na estrutura da toxina [94]. Foram ainda registados espectros da mesma solução após 24 e 48 horas de incubação. Contudo, não se verificaram alterações significativas na banda de absorção registada.

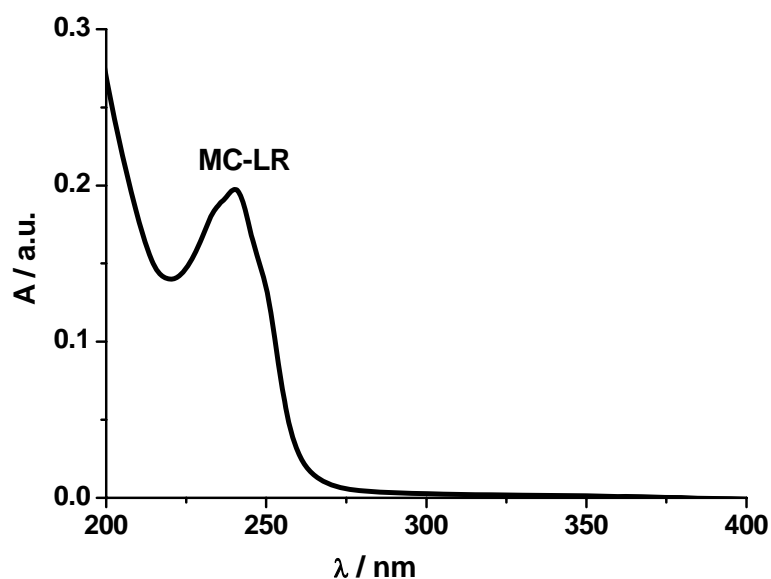


Figura 4.15. Espectro UV-Vis de uma solução de MC-LR 30 µM imediatamente após a sua preparação a pH 6,1 (tampão fosfato 0,1 M).

4.5 HPLC

Foram feitas experiência de HPLC para confirmar a degradação química da MC-LR e a formação dos respectivos produtos.

O cromatograma obtido para uma solução de MC-LR acabada de preparar, **Fig. 4.16**, apresentou um único pico com tempo de retenção de 7,6 minutos.

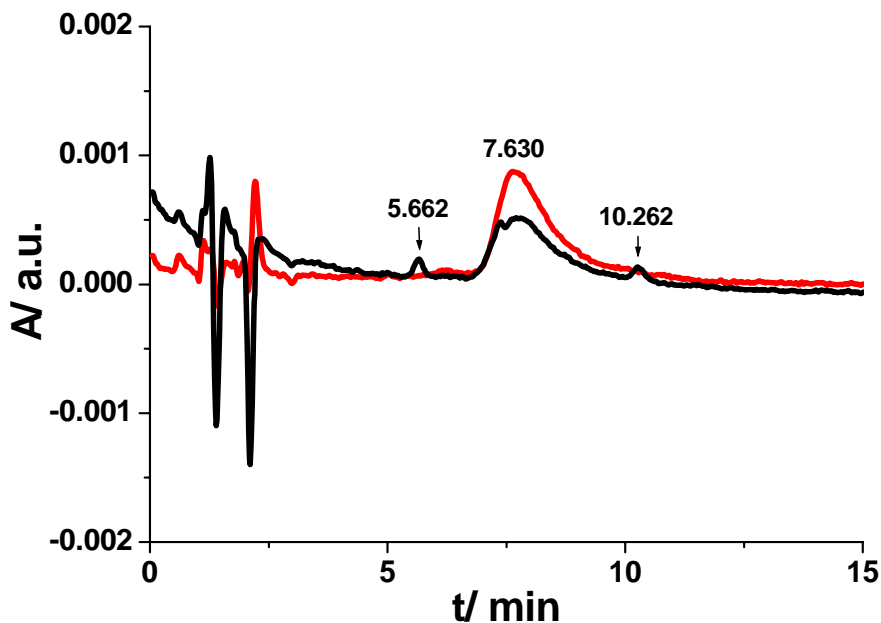


Figura 4.16. Cromatograma obtido para uma solução de MC-LR 0,63 μM após (—) 0 h e (—) 6 meses de incubação em solução tampão.

Após 6 meses de incubação, a mesma solução de MC-LR foi testada novamente por HPLC, nas mesmas condições experimentais. Neste cromatograma, foram observados três picos com diferentes tempos de retenção: um pico aos 5,7 minutos, o pico da MC-LR aos 7,6 minutos (mas com menor absorvância) e um último pico aos 10,3 minutos.

O aparecimento dos novos picos no cromatograma da solução de MC-LR com 6 meses de incubação indica que, de facto, ocorreu degradação sem qualquer tipo de indução. A degradação ocorreu através da formação de dois produtos de degradação, que foram eluídos em tempos diferentes (5,7 e 10,3 min), o que indica que apresentam estruturas químicas diferentes e, consequentemente, diferentes afinidades para com a fase estacionária.

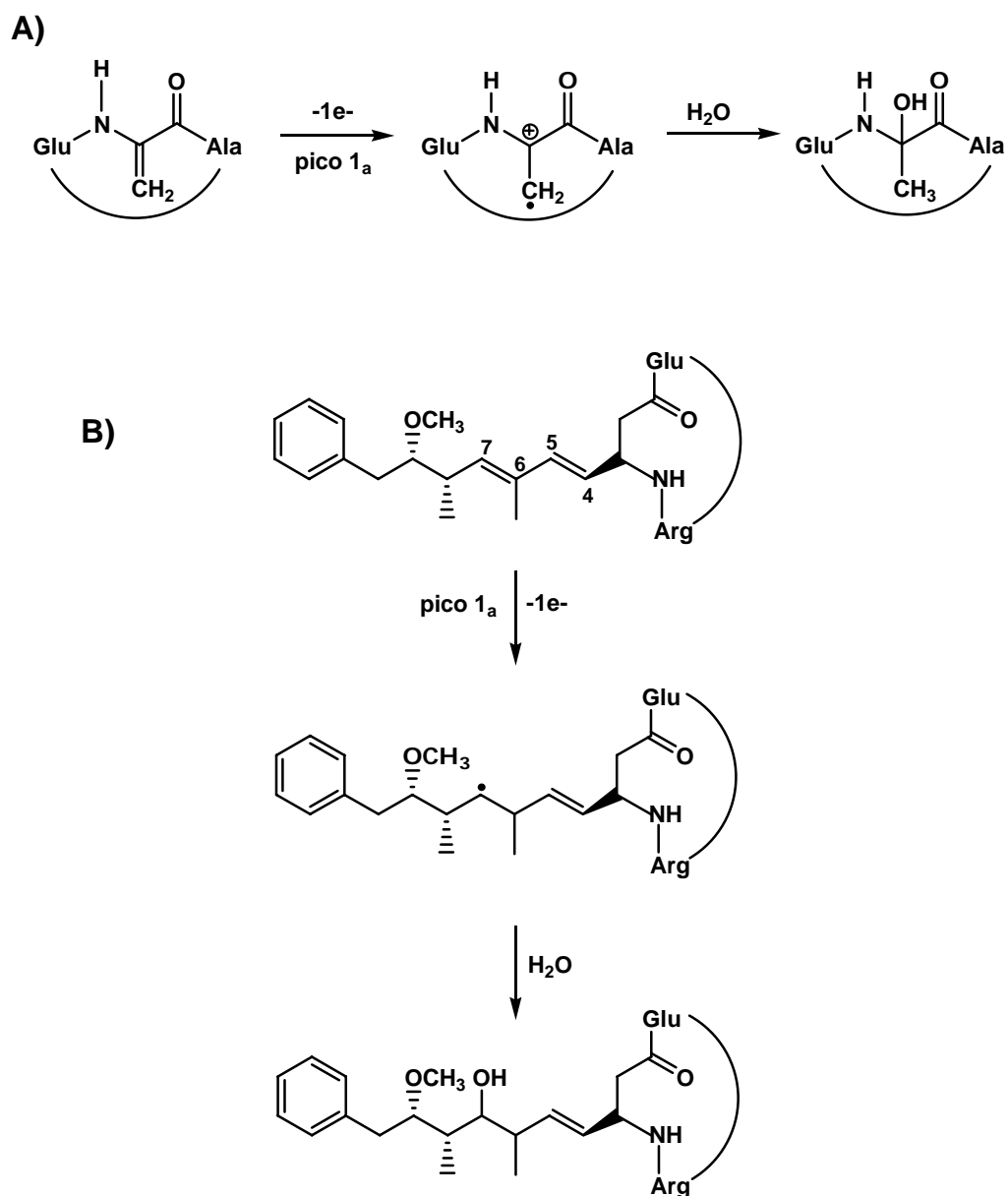
4.6 Mecanismos de oxidação da MC-LR

A oxidação electroquímica da MC-LR, pico 1_a, é uma reacção irreversível e independente do pH, onde é transferido apenas um electrão.

As experiências electroquímicas feitas com as soluções dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp não revelaram qualquer resposta electroquímica. Contudo, os compostos análogos ao Mdha (2-AAA) e ao Adda (SA) apresentaram electroactividade à superfície do GCE. Tendo em conta estas observações, concluiu-se que os aminoácidos Mdha e Adda são,

provavelmente, os centros electroactivos responsáveis pela resposta electroquímica da MC-LR, **Esquema 4.1**.

O pico 1_a da MC-LR poderá ter a contribuição de duas reacções: por um lado, a quebra da dupla ligação do aminoácido Mdha ($C=CH_2$), **Esquema 4.1A**; por outro, a quebra da dupla ligação existente entre os átomos de carbono C4-C5 e/ou C6-C7 do aminoácido Adda, **Esquema 4.1B**.



Esquema 4.1 – Mecanismos propostos para o pico 1_a : oxidação do aminoácido (A) Mdha e (B) Adda.

Após incubação, detectou-se a degradação química em solução da MC-LR pelo aparecimento do pico 2_a, e subsequente oxidação dos produtos formados no pico 2_a pelo aparecimento dos picos 3_a e 4_a. A variação da corrente do pico 2_a com o tempo de incubação em cada um dos electrólitos de suporte está representada graficamente na **Fig. 4.17**.

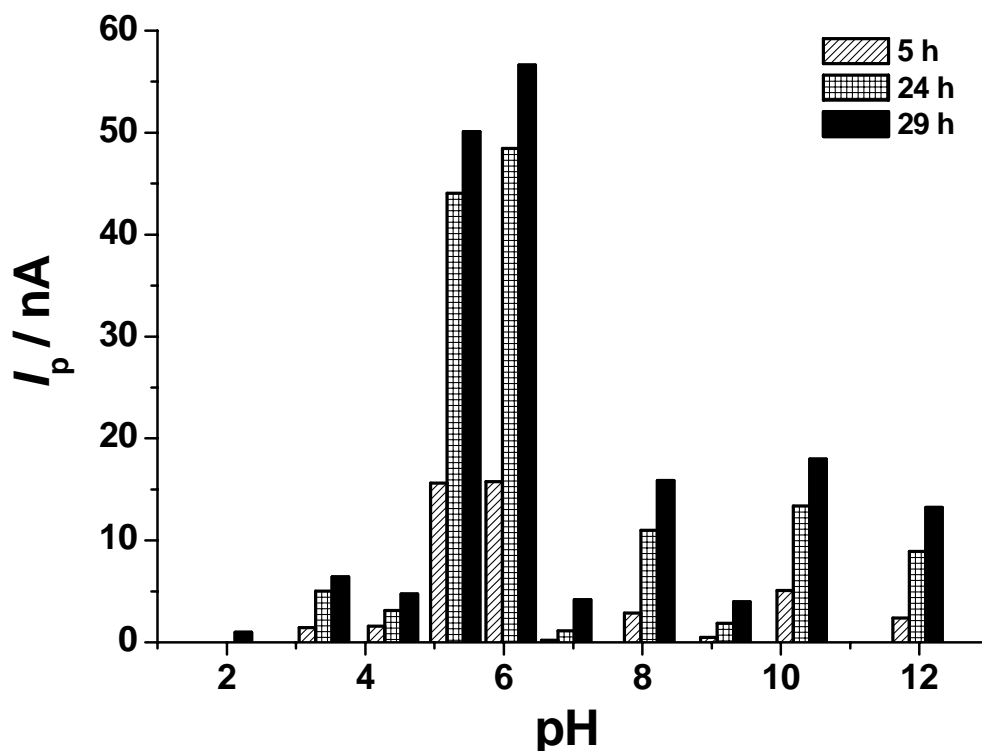
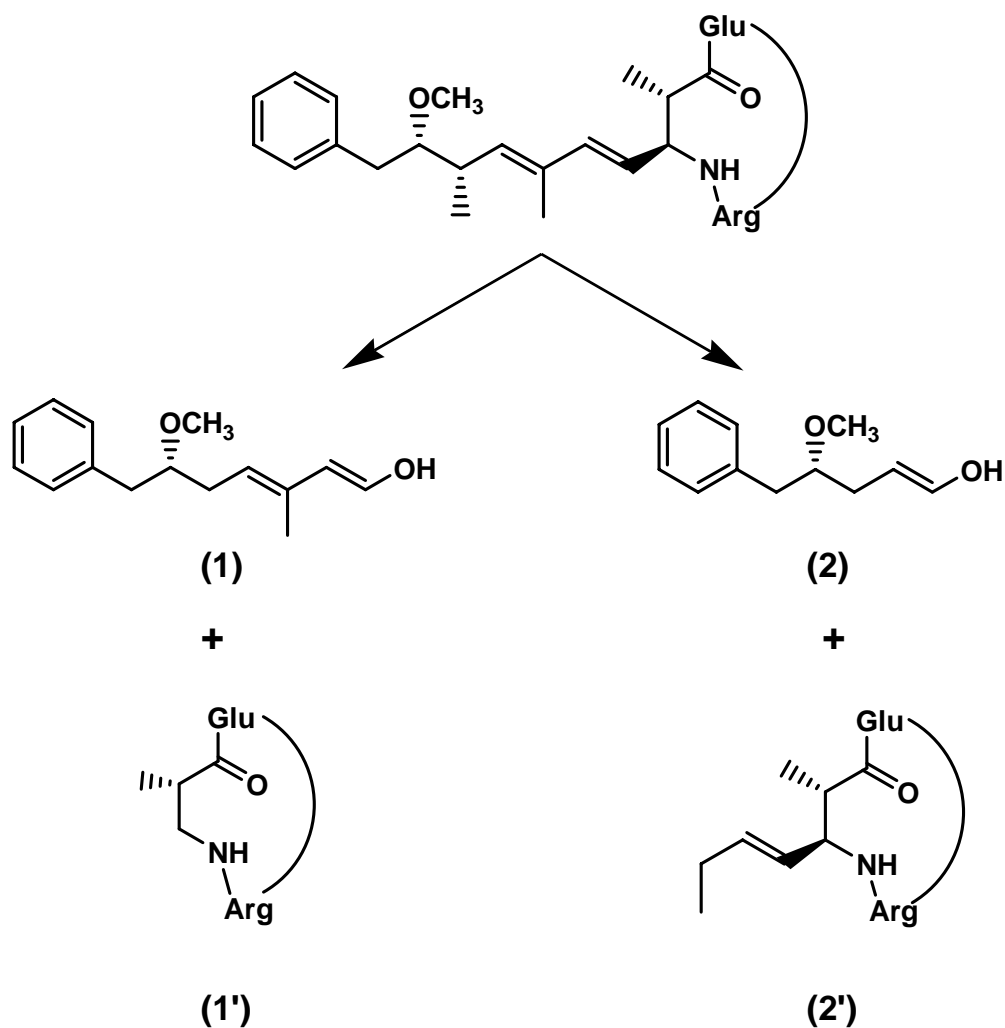


Figura 4.17. Variação da corrente (I_p) do pico 2_a, em função do tempo de incubação, em diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

Pela análise do gráfico, é possível concluir que a degradação da MC-LR é favorecida em electrólitos de suporte com pH entre 5,3 e 6,1.

Em geral, o comportamento electroquímico da MC-LR foi semelhante ao comportamento electroquímico do SA previamente estudado (Capítulo 3). Assim, o mecanismo de degradação proposto para a MC-LR está baseado no mecanismo previamente apresentado para a degradação do SA.

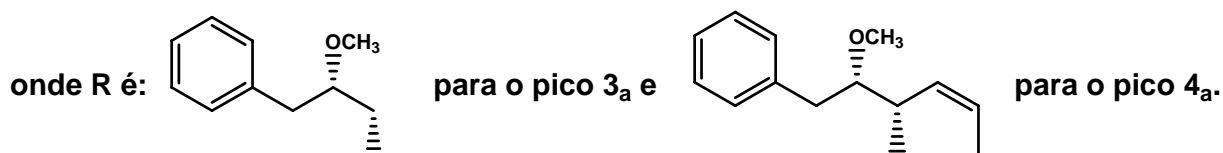
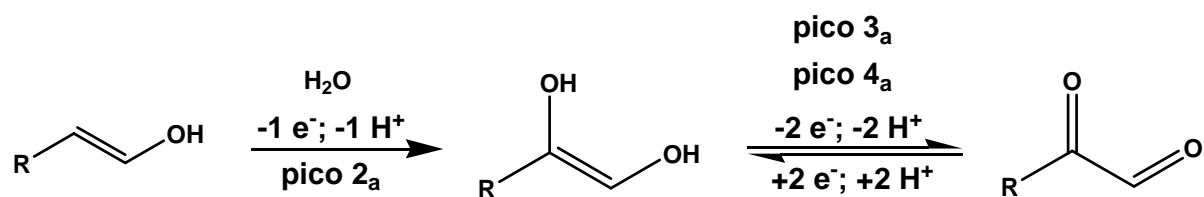
Após a incubação em electrólitos de suporte ácidos, pensa-se que a cadeia carbonada do aminoácido Adda se separa da estrutura cíclica da toxina, conforme apresentado no **Esquema 4.2**.



Esquema 4.2. Mecanismo proposto para a degradação da MC-LR.

O processo de separação da cadeia lateral do aminoácido Adda poderá ocorrer em dois locais distintos, originando dois produtos de degradação electroactivos, (1) e (2), terminando ambos com um grupo hidroxilo, **Esquema 4.2**. Neste processo, são ainda originados os produtos não electroactivos, (1') e (2'), que representam a outra fracção da molécula de MC-LR após a separação da cadeia lateral do Adda.

O mecanismo proposto para a oxidação da cdMC-LR, pico 2_a, está representado no **Esquema 4.3**.



Esquema 4.3. Mecanismo proposto para a oxidação da cdMC-LR.

A oxidação da cdMC-LR, **Esquema 4.3**, corresponde à oxidação dos produtos (1) e (2) formados na degradação química da MC-LR, **Esquema 4.2**. Na oxidação da cdMC-LR é removido um electrão e um protão, dando origem a um radical, que irá incorporar um grupo hidroxilo para se tornar uma molécula di-hidroxilada, **Esquema 4.3**.

As reacções subjacentes aos picos 3_a e 4_a, **Esquema 4.3**, são atribuídas à oxidação dos produtos di-hidroxilados, pela remoção de dois electrões e de dois protões, para originar dois grupos carbonílicos, em cada um dos produtos de oxidação. As diferenças de potencial entre os picos 3_a e 4_a são atribuídas às diferentes estruturas químicas que resultam do processo de degradação, representadas por “R” no **Esquema 4.3**.

CAPÍTULO 5

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DA NODULARINA

Neste capítulo descreve-se o comportamento electroquímico da nodularina (NOD) e da NOD após degradação química em solução aquosa (cdNOD), para uma vasta gama de pH.

5.1 Comportamento electroquímico da NOD

O comportamento electroquímico da NOD à superfície do GCE foi investigado primeiramente por CV. Para tal, preparou-se uma solução de NOD 100 μM a pH 7,0 (tampão fosfato). Os voltamogramas cíclicos foram registados entre - 1,00 V e + 1,35 V. Durante os varrimentos de potencial, foi mantido um fluxo constante de N_2 sobre a solução, de forma a evitar a difusão de oxigénio atmosférico para o interior da solução. Estas experiências revelaram que a NOD é oxidada à superfície do GCE, pois foi registado um único pico anódico.

5.1.1 Voltametria Cíclica

Registaram-se voltamogramas cíclicos numa solução de NOD 75 μM , preparada a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M), nos quais se observou apenas um pico anódico, a $E_{\text{pa}}^1 = + 1,10 \text{ V}$, **Fig. 5.1.**

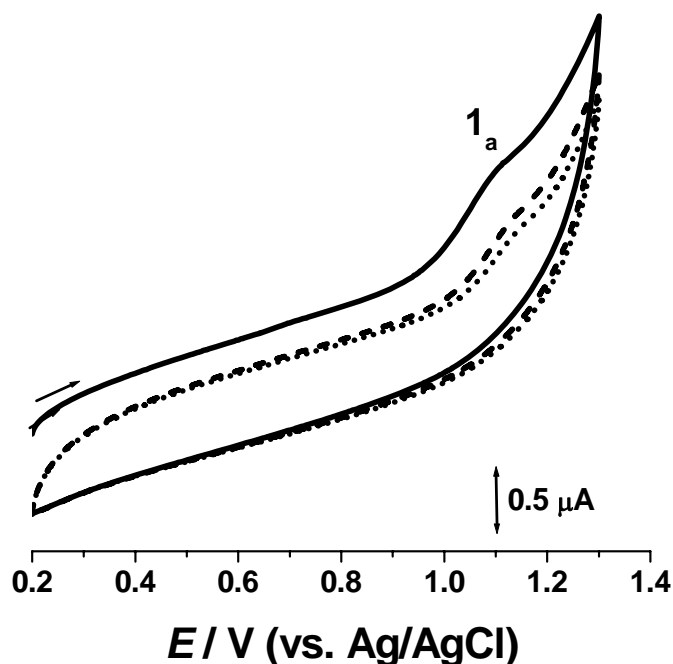


Figura 5.1 – Voltamogramas cíclicos obtidos com um GCE numa solução de NOD 75 μM imediatamente após a sua preparação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M): (—) 1^o, (---) 2^o e (•••) 3^o varrimentos; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Registaram-se também varrimentos sucessivos nesta solução, nos quais se observou apenas a diminuição da corrente do pico 1_a, devido à adsorção da NOD e/ou dos seus produtos de oxidação não electroactivos à superfície do GCE. As soluções de NOD preparadas nos restantes electrólitos de suporte apresentaram um comportamento electroquímico semelhante.

5.1.2 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada foi também utilizada no estudo do comportamento electroquímico da NOD. Os voltamogramas foram registados em soluções de NOD 50 μM preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH. Contudo, o comportamento electroquímico da NOD foi semelhante em todas as soluções testadas, independentemente do pH do electrólito de suporte.

Na **Fig. 5.2** estão representados os voltamogramas de onda quadrada obtidos numa solução de NOD 50 μM a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M), logo após a sua preparação. Nos voltamogramas registados apareceu apenas um pico anódico, a $E_{\text{pa}}^1 = + 1,09 \text{ V}$, correspondente à oxidação da NOD.

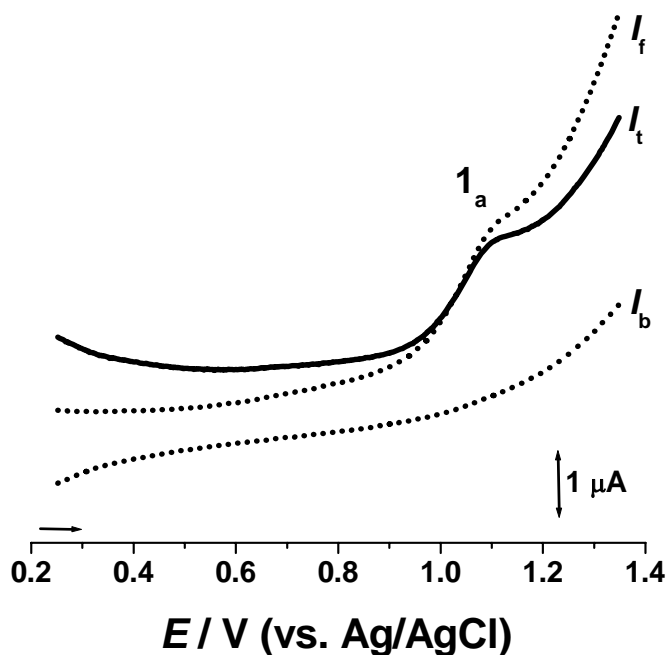


Figura 5.2. Voltamograma de onda quadrada obtido com um GCE numa solução de NOD 50 μM imediatamente após a sua preparação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M); $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, amplitude de impulso 50 mV, $\nu_{\text{eff}} = 100$ mV s⁻¹; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa.

Após a separação da corrente total nas suas componentes – corrente directa e corrente inversa – verificou-se que a reacção de oxidação da NOD à superfície do GCE é uma reacção irreversível, uma vez que a corrente inversa não apresentou qualquer pico e que a corrente directa apresentou um pico para o mesmo potencial e com a mesma intensidade de corrente que o pico 1_a .

5.1.3 Voltametria de Impulso Diferencial

Para o estudo e caracterização da oxidação electroquímica da NOD, utilizou-se ainda a voltametria de impulso diferencial (DPV). O estudo por DPV contemplou uma vasta gama de pH – de 1,1 a 11,8 – aplicada a soluções de NOD 50 μM .

Os voltamogramas registados imediatamente após a preparação das soluções de NOD com pH entre 1,1 e 9,2 estão apresentados na **Fig. 5.3**.

Os voltamogramas apresentaram um único pico, o pico 1_a , a $E_{\text{pa}}^1 = + 1,06$ V. Para soluções de NOD com pH superior a 9,2 não se observou qualquer pico.

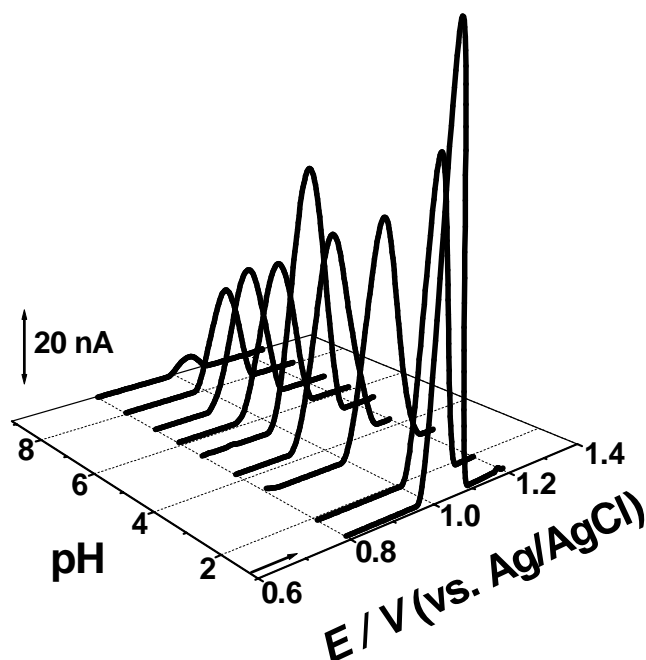


Figura 5.3. Representação 3D de voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base, obtidos com um GCE, em soluções de NOD $50 \mu\text{M}$ preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

O potencial do pico 1_a é independente do pH, **Fig. 5.4**, o que indica que o mecanismo de oxidação da NOD envolve apenas a transferência de electrões, sem transferência de protões.

A largura a meia altura registada para o pico 1_a foi $W_{1/2} \approx 84 \text{ mV}$, que é um valor próximo do valor teórico de 90 mV , correspondente à transferência de um electrão [83]. Assim, concluiu-se que a oxidação da NOD à superfície do GCE, pico 1_a , envolve a transferência de um electrão.

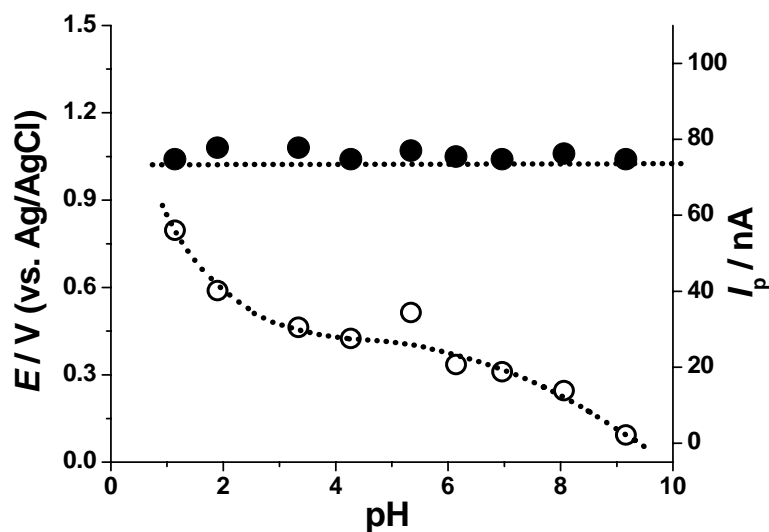


Figura 5.4. Representação gráfica do potencial (●) E_p , e da corrente (○) I_p do pico 1_a em função do pH.

A corrente do pico 1_a apresentou valores máximos em electrólitos ácidos, e diminuiu progressivamente à medida que o pH aumentou, **Fig. 5.4**.

5.2 Comportamento electroquímico da NOD quimicamente degradada

Observou-se que a NOD sofre degradação química após incubação em diferentes electrólitos de suporte. Este processo deu origem à formação de produtos de degradação electroactivos (cdNOD), cujos comportamentos electroquímicos foram estudados por CV, SWV e DPV.

5.2.1 Voltametria Cíclica

O perfil voltamétrico da cdNOD foi avaliado em soluções de NOD $75 \mu\text{M}$, após incubação durante sete dias nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH.

Os voltamogramas obtidos a pH 5,3 (tampão acetato $0,1 \text{ M}$), com velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} , revelaram o aparecimento de um novo pico anódico: o pico 2_a , a $E_{pa}^2 = +0,77 \text{ V}$, **Fig. 5.5**, que corresponde à oxidação da cdNOD à superfície do GCE.

Após a inversão do sentido do varrimento, registaram-se dois novos picos catódicos: 4_c , a $E_{pc}^4 = +0,47 \text{ V}$, e 3_c , a $E_{pc}^3 = +0,36 \text{ V}$, **Fig. 5.5**. Estes dois picos correspondem à redução do produto de oxidação da cdNOD formado durante o varrimento anódico.

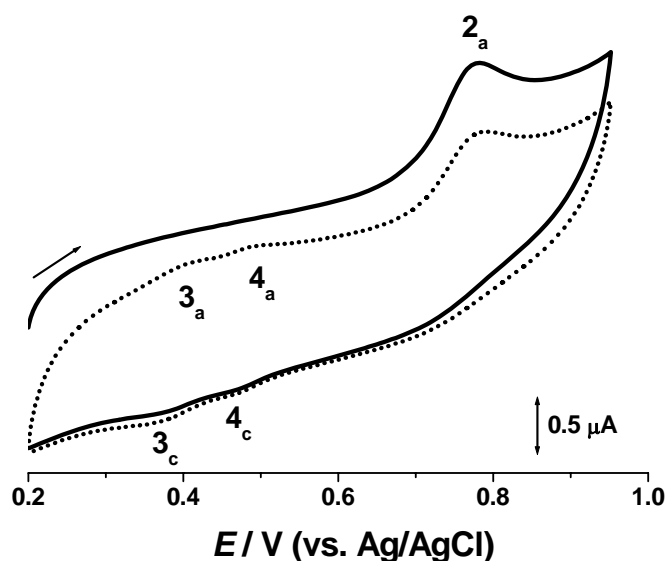


Figura 5.5 Voltamogramas cíclicos obtidos com um GCE numa solução de NOD $75 \mu\text{M}$ incubada durante 7 dias a pH 5,3 (tampão acetato $0,1 \text{ M}$): (—) 1º e (•••) 2º varrimentos, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

No segundo varrimento obtido na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, registaram-se os picos anódicos 3_a, a $E_{pa}^3 = +0,39$ V, e 4_a, a $E_{pa}^4 = +0,49$ V. Estes picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação da cdNOD, reduzidos durante o varrimento catódico. Verificou-se ainda que a corrente do pico 2_a diminuiu, provavelmente devido à adsorção dos produtos de oxidação da cdNOD à superfície do GCE.

5.2.2 Voltametria de Onda Quadrada

Foram feitas experiências de SWV com a finalidade de melhor caracterizar o comportamento electroquímico da cdNOD. Para tal, foram preparadas soluções de NOD 50 μ M em cada um dos electrólitos de suporte, que foram incubadas durante 53 horas. O comportamento electroquímico foi idêntico para todas as soluções investigadas, independentemente do pH do electrólito de suporte.

Os voltamogramas apresentados foram registados numa solução de NOD 50 μ M incubada durante 53 horas a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M). No primeiro varrimento, observou-se o pico 2_a, a $E_{pa}^2 = +0,73$ V, **Fig. 5.6**.

Através da comparação entre as correntes total, directa e inversa, verificou-se que a reacção de oxidação da cdNOD (pico 2_a) é irreversível.

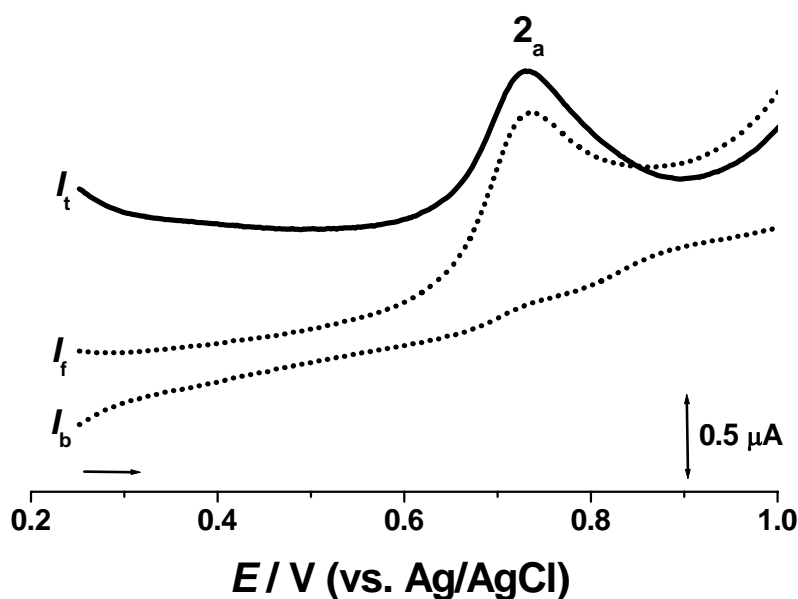


Figura 5.6. Voltamograma de onda quadrada (1^o varrimento) obtido com um GCE numa solução de NOD 50 μ M após 53 horas de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M); $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, amplitude de impulso 50 mV, $v_{eff} = 100$ mV s⁻¹; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa.

No segundo varrimento registado na mesma solução, sem limpar a superfície do GCE, observaram-se os picos 3_a , a $E_{pa}^3 = +0,37$ V, e 4_a , a $E_{pa}^4 = +0,47$ V, **Fig. 5.7**.

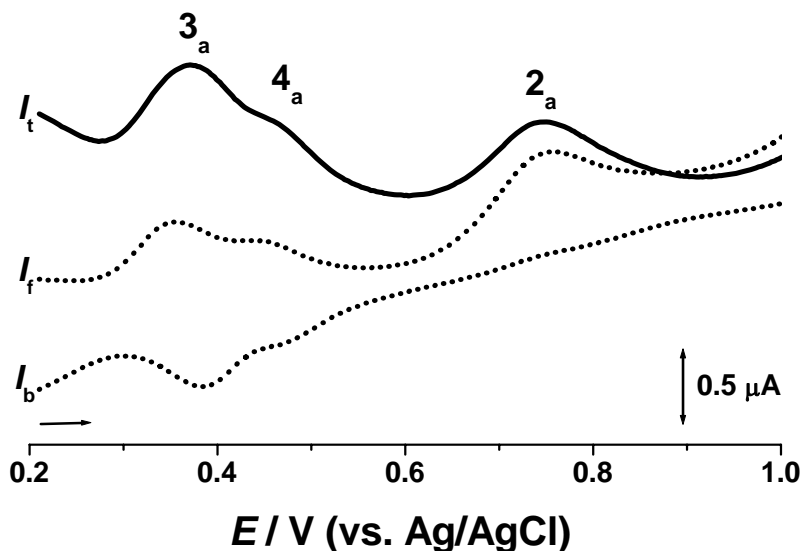


Figura 5.7. Voltamograma de onda quadrada (2º varrimento) obtido com um GCE numa solução de NOD 50 μ M após 53 horas de incubação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M); $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV, amplitude de impulso 50 mV, $v_{\text{eff}} = 100$ mV s⁻¹; I_t – corrente total, I_f – corrente directa e I_b – corrente inversa.

A reversibilidade destas reacções ficou evidenciada pelos dois picos observados tanto na corrente directa, como na corrente inversa, uma vez que as correntes de oxidação e de redução são equivalentes.

5.2.3 Voltametria de Impulso Diferencial

A DPV também foi aplicada ao estudo do comportamento electroquímico da cdNOD e dos seus produtos de oxidação.

Nos voltamogramas registados na gama de potencial entre 0,0 V e +1,4 V, em soluções de NOD 50 μ M após 5 horas de incubação a pH 6,1 (tampão fosfato 0,1 M), **Fig. 5.8**, observou-se o pico 1_a , a $E_{pa}^1 = +1,07$ V, e o pico de oxidação da cdNOD, pico 2_a , a $E_{pa}^2 = +0,70$ V.

Foram registados vários voltamogramas na mesma solução de NOD após períodos de incubação mais longos (24, 29 e 53 horas).

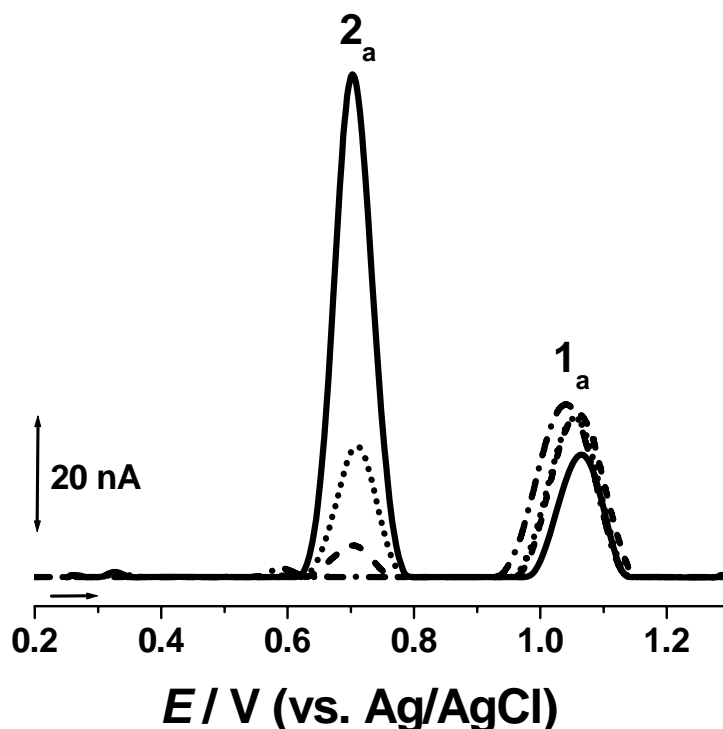


Figura 5.8. Voltamogramas de impulso diferencial (1º varrimento) com correcção de linha de base obtidos com um GCE numa solução de NOD 50 μ M a pH 6,1 (tampão fosfato 0,1 M): após (---) 0 h, (---) 5 h, (•••) 24 h e (—) 53 h de incubação.

Nesses voltamogramas, observou-se uma diminuição progressiva da corrente do pico 1_a com o aumento do tempo de incubação; concomitantemente, a corrente do pico 2_a aumentou progressivamente à medida que o tempo de incubação aumentou, **Fig. 5.8**.

As diferenças de corrente registadas indicam, por um lado, a diminuição da concentração de NOD em solução e, por outro, o aumento da concentração de cdNOD, homogeneamente formada em solução.

Após 53 horas de incubação, foram registados voltamogramas sucessivos numa solução de NOD a pH 6,1 (tampão fosfato 0,1 M), **Fig. 5.9**.

No primeiro varrimento, observou-se o pico 1_a, a $E_{pa}^1 = + 1,07$ V, e o pico 2_a, a $E_{pa}^2 = + 0,70$ V. No segundo varrimento foram registados dois novos picos de oxidação: o pico 3_a, a $E_{pa}^3 = + 0,34$ V, e o pico 4_a, a $E_{pa}^4 = + 0,44$ V. Estes novos picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação da cdNOD formados à superfície do GCE durante o primeiro varrimento do potencial. Com o aumento do número de varrimentos sucessivos, verificou-se o aumento das correntes dos picos 3_a e 4_a, devido à formação de mais produto de oxidação da cdNOD à superfície do GCE.

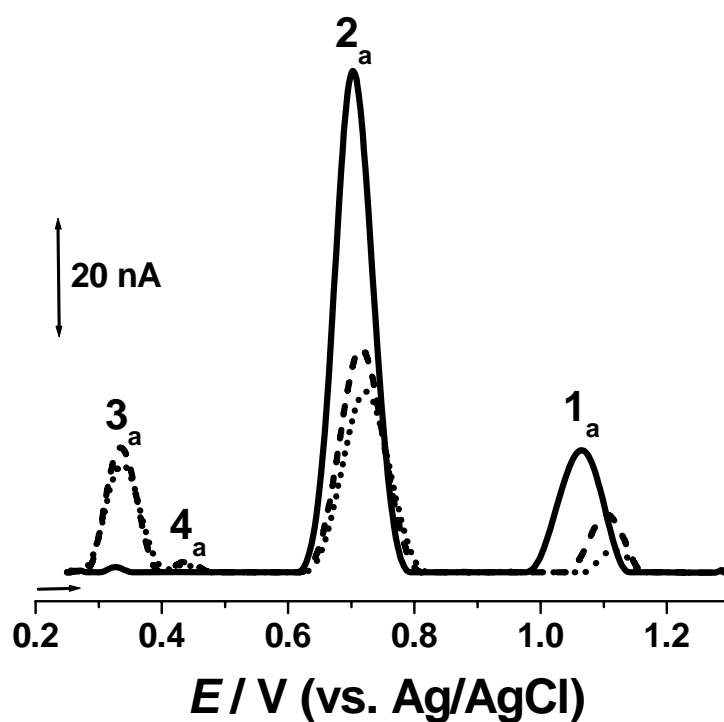


Figura 5.9. Voltamogramas de impulso diferencial com correcção de linha de base obtidos com um GCE numa solução de NOD $50 \mu\text{M}$ a pH 6,1 (tampão fosfato $0,1 \text{ M}$) após 53 h de incubação: (—) 1°, (---) 2° e (•••) 3° varrimentos.

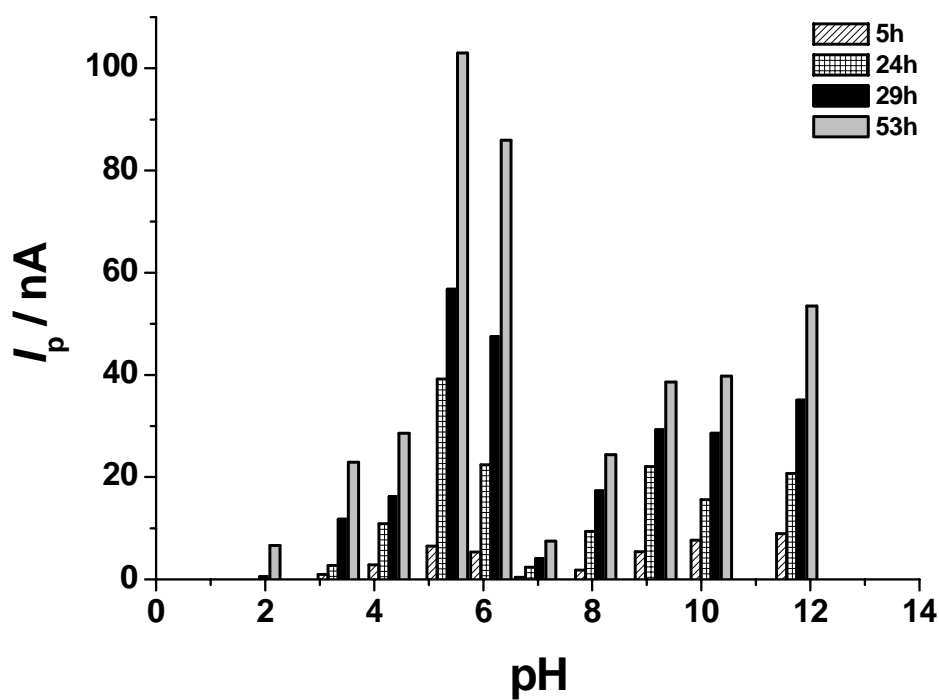


Figura 5.10. Variação da corrente do pico 2_a com o tempo de incubação.

Dado que os voltamogramas registados após 53 horas de incubação apresentaram correntes de oxidação da cdNOD mais elevadas (pico 2_a), **Fig. 5.10**, este foi o tempo de incubação escolhido para o estudo do comportamento electroquímico da cdNOD e dos seus produtos de oxidação.

As soluções de NOD foram preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH (de 1,1 a 11,8), e incubadas durante 53 horas.

Para as soluções com pH entre 1,1 e 9,2, observou-se o deslocamento do potencial do pico 2_a para valores menos positivos com o aumento do pH, à excepção da solução com pH 1,1, na qual o pico 2_a não foi observado, **Fig. 5.11**.

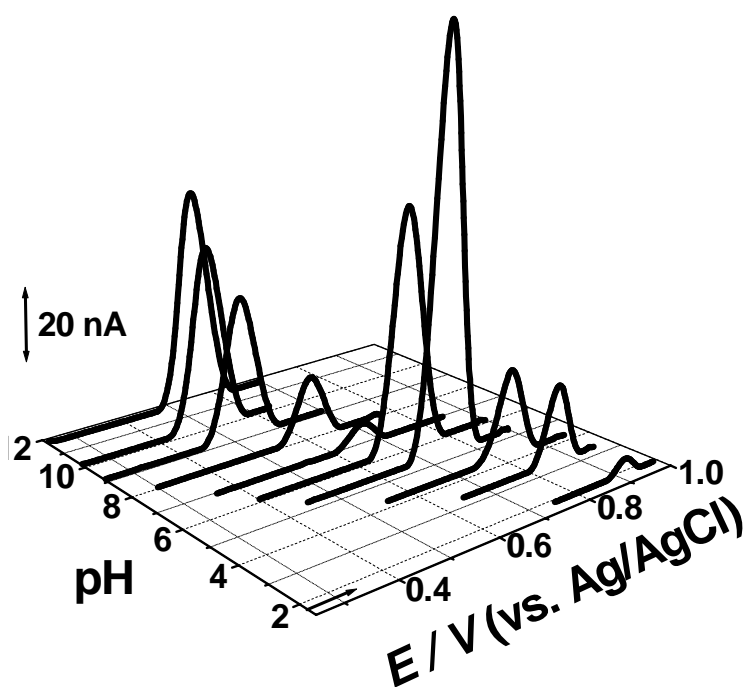


Figura 5.11. Representação 3D de voltamogramas de impulso diferencial (1^o varrimento) com correcção de linha de base, obtidos com um GCE, em soluções de NOD 50 μM preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH, após 53 horas de incubação.

Verificou-se que a dependência do potencial em relação ao pH do electrólito de suporte é dada pela equação $E_{pa}^2 \text{ (V)} = 1,081 - 0,059 \text{ pH}$, **Fig. 5.12**. O declive da recta, 59 mV por unidade de pH, é característico de um mecanismo de reacção no qual estão envolvidos o mesmo número de electrões e de protões [90]. Considerando que a largura a meia altura do pico 2_a registada foi $W_{1/2} \approx 65 \text{ mV}$, a oxidação da cdNOD envolve a transferência de um electrão; portanto, envolve também um protão.

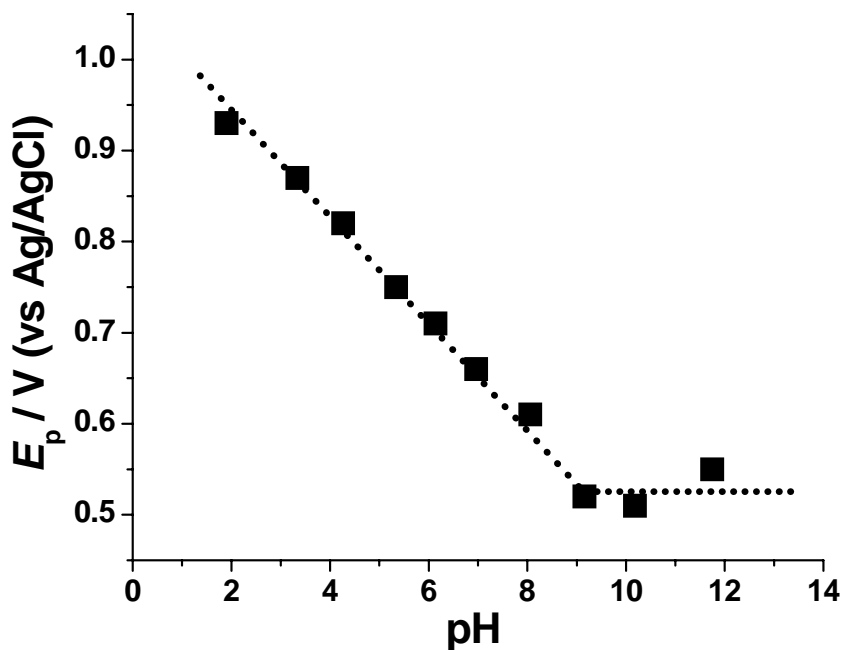


Figura 5.12. Representação gráfica do potencial (■) E_p do pico 2_a em função do pH.

Para as soluções com pH superior a 9,2, o potencial do pico 2_a manteve-se constante, de onde se conclui que, nestas condições, a oxidação da cdNOD envolve apenas a transferência de um electrão e o produto de oxidação da cdNOD sofre desprotonação em electrólitos mais alcalinos [95]. Tendo em conta os resultados obtidos, determinou-se para a cdNOD o valor de $pK_a \approx 9,2$.

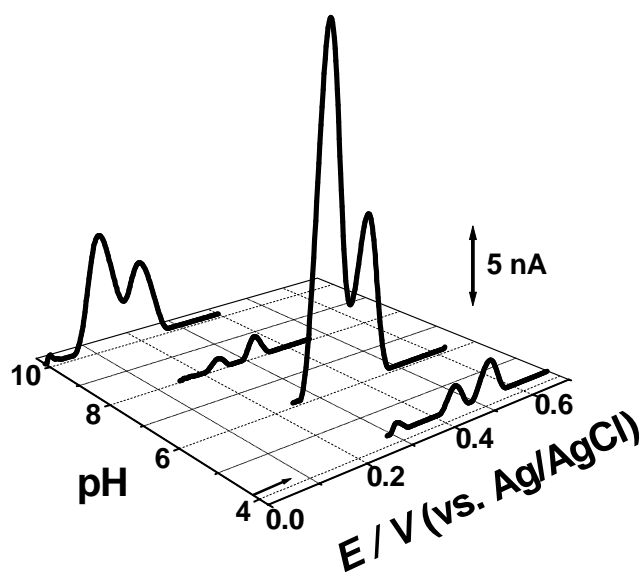


Figura 5.13. Representação 3D de voltamogramas de impulso diferencial (2º varrimento) com correcção de linha de base, obtidos com um GCE, em soluções de NOD $50 \mu\text{M}$ preparadas nos diferentes electrólitos de suporte, com diferentes valores de pH, após 53 horas de incubação.

No segundo varrimento sucessivo registado em cada uma das soluções investigadas, sem limpar a superfície do GCE, observaram-se os picos 3_a e 4_a, **Fig. 5.13**.

Para soluções com pH entre 1,1 e 9,1, os potenciais dos picos 3_a e 4_a deslocaram-se para valores menos positivos com o aumento do pH, **Fig. 5.14**.

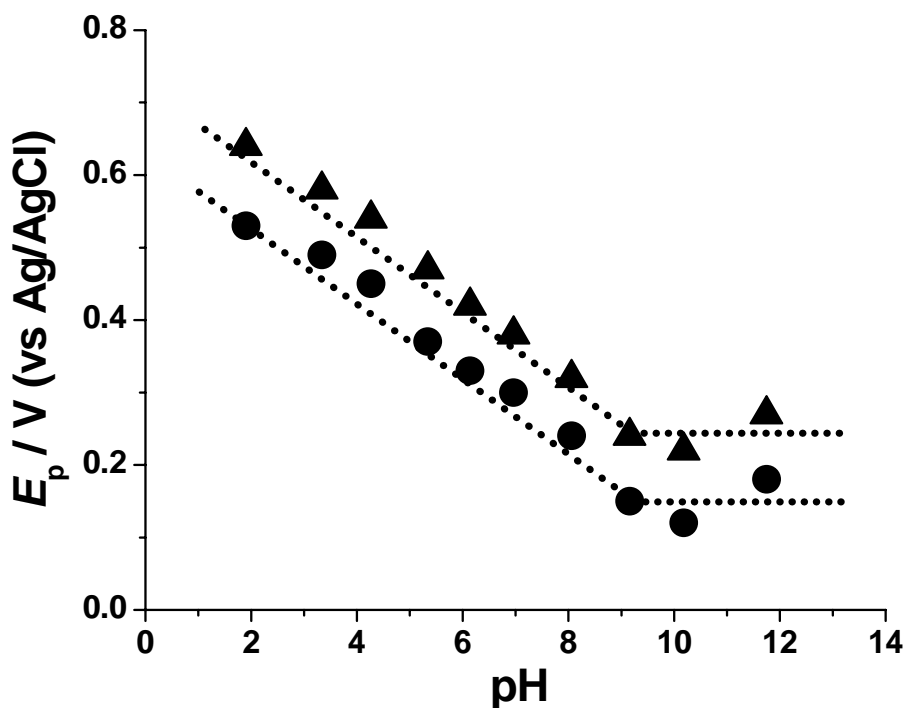


Figura 5.14. Representação gráfica do potencial dos picos (●) 3_a e (▲) 4_a em função do pH.

Verificou-se que a dependência do potencial dos picos 3_a e 4_a em relação ao pH é linear e que o declive, 59 mV por unidade de pH, é indicativo de um mecanismo de reacção no qual ocorre a transferência do mesmo número de electrões e de protões. A largura a meia altura registada para ambos os picos foi $W_{1/2} \approx 45$ mV, o que levou à conclusão de que as reacções subjacentes aos picos 3_a e 4_a envolvem, cada uma, a transferência de dois electrões e de dois protões.

Nas soluções com pH superior a 9,2 não se verificou qualquer dependência do potencial dos picos 3_a e 4_a em relação ao pH. Assim, para electrólitos muito alcalinos o mecanismo de reacção envolve apenas a transferência de dois electrões.

5.3 Espectrofotometria de UV-Vis

Foram registados espectros de absorção UV-Vis em soluções de NOD 30 μM a pH 5,3, 7,0 e 10,2, não só imediatamente após a sua preparação como também após algum tempo de incubação. A presença da toxina foi detectada pela banda de absorção característica a 239 nm, **Fig. 5.15** devida às duplas ligações conjugadas do aminoácido Adda [22].

Os espectros registados após 5 e 24 horas de incubação não revelaram alterações significativas no perfil de absorção UV-Vis.

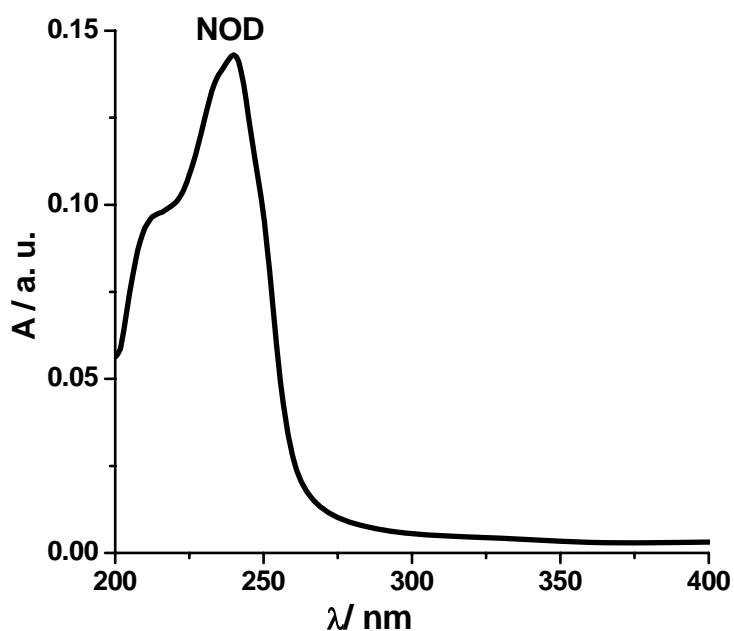


Figura 5.15. Espectro UV-Vis de uma solução de NOD 30 μM imediatamente após a sua preparação a pH 5,3 (tampão acetato 0,1 M).

5.4 HPLC

Foram feitos ensaios de HPLC com soluções de NOD 5 μM imediatamente após a sua preparação e após sete dias de incubação. O tempo de retenção registado para a NOD foi 4,31 minutos e o espectro de absorção apresentou valor máximo a 239 nm, **Fig. 5.16**.

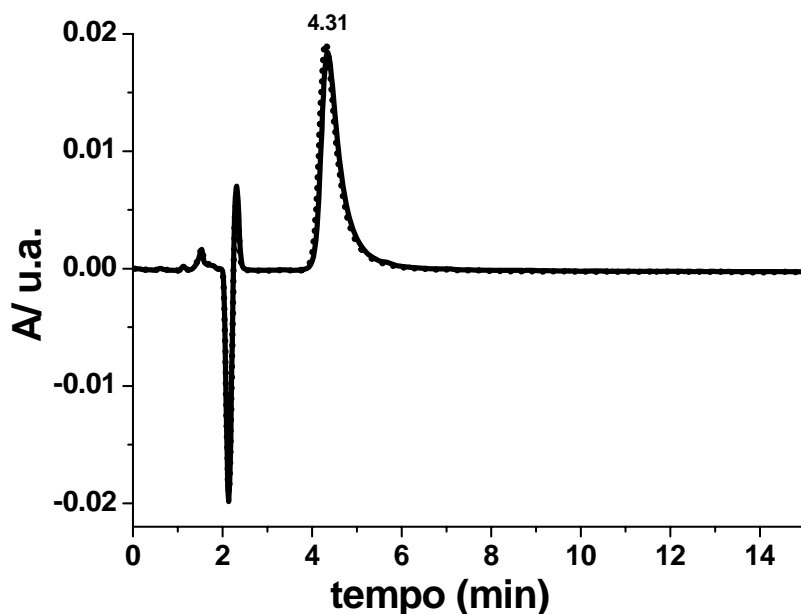


Figura 5.16. Cromatogramas obtidos para soluções de NOD 5 μM (•••) imediatamente após a sua preparação e (—) após 7 dias de incubação.

O cromatograma obtido após sete dias de incubação foi bastante semelhante ao cromatograma obtido logo após a preparação da solução de NOD. No entanto, a absorvância registada para a solução incubada foi menor do que a inicial. Perante os resultados obtidos, pode supor-se que o processo de degradação química da NOD em solução necessita de maiores tempos de incubação para que seja detectado por HPLC.

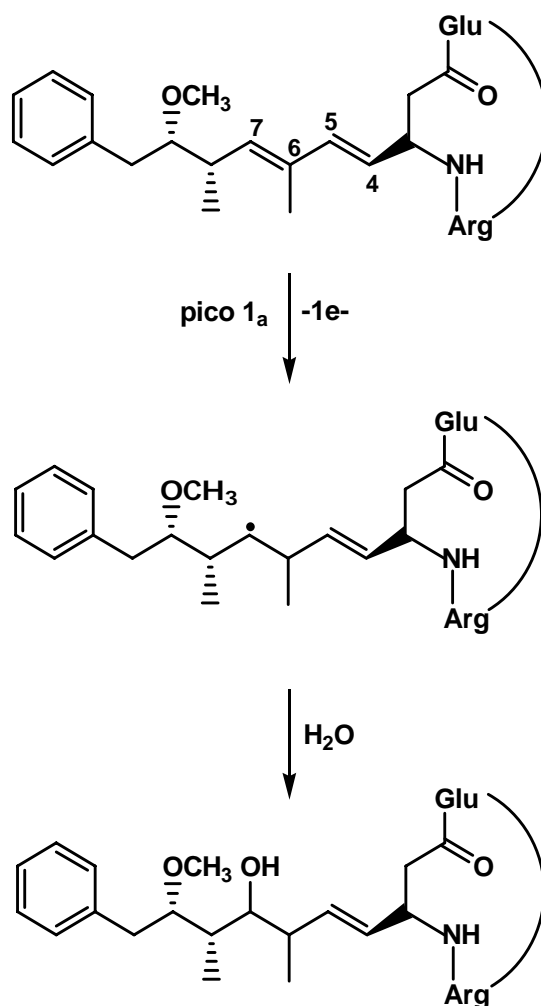
5.5 Mecanismos de oxidação da NOD

Os resultados obtidos utilizando as diferentes técnicas voltamétricas permitiram concluir que a oxidação electroquímica da NOD é uma reacção irreversível e independente do pH, onde ocorre a transferência de um electrão.

Após incubação em soluções aquosas, a degradação química da NOD é detectável pelo aparecimento de um novo pico, para potenciais mais baixos, que corresponde a uma reacção de oxidação irreversível e dependente do pH até pH 9,2, na qual são transferidos um electrão e um protão; para pH superior a 9,2, a reacção é independente do pH e envolve apenas a transferência de um electrão. Os produtos de oxidação desta reacção são oxidados em reacções reversíveis com a transferência, cada uma, de dois electrões e de dois protões. A dependência do pH é a mesma verificada para a oxidação da cdNOD.

Tendo em conta as semelhanças verificadas entre o comportamento electroquímico da NOD e do SA (Capítulo 3), inclusivamente após a degradação química, os mecanismos propostos para a oxidação e para a degradação da NOD têm por base o mecanismo de oxidação proposto para o SA.

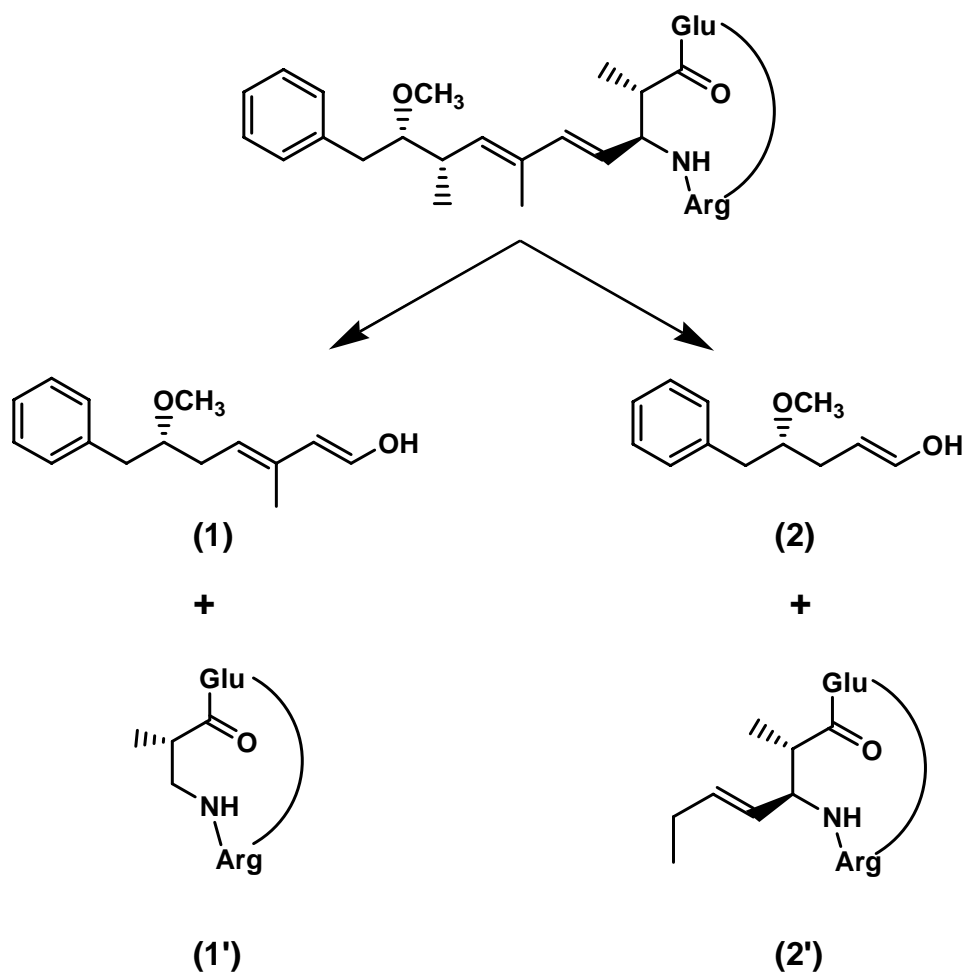
O mecanismo proposto para a oxidação da NOD (pico 1_a) descreve-se no **Esquema 5.1**.



Esquema 5.1. Mecanismo proposto para a oxidação da NOD (pico 1_a).

O pico 1_a é atribuído à quebra da ligação dupla existente entre os átomos de carbono 7 e 6 (C7-C6) do aminoácido Adda, e à subsequente adição de um grupo hidroxilo ao C7.

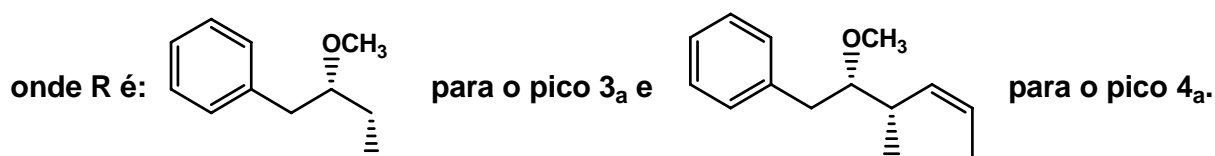
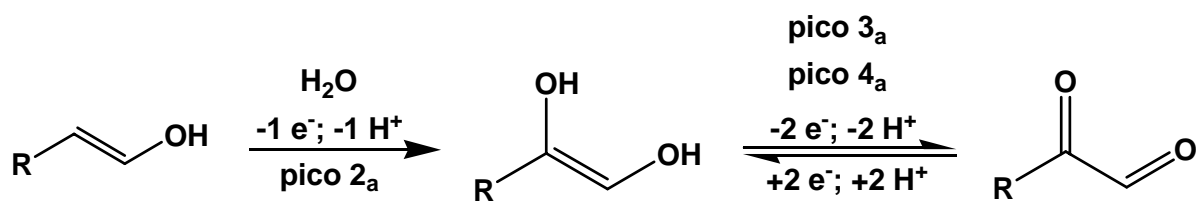
O mecanismo proposto para o processo de degradação química da NOD encontra-se esquematizado no **Esquema 5.2**.



Esquema 5.2. Mecanismo proposto para a degradação química da NOD.

Após a incubação da NOD nos diferentes electrólitos de suporte utilizados, com diferentes valores de pH, considera-se que o grupo Adda se separa da estrutura cíclica da molécula. O processo de separação poderá ocorrer em dois locais distintos do aminoácido, dando origem a dois produtos de degradação electroactivos, (1) e (2), ambos com um grupo hidroxilo, e a dois outros produtos de degradação, (1') e (2'), presentes na estrutura molecular da NOD.

A oxidação a cdNOD, pico 2_a, é atribuída à oxidação dos produtos (1) e (2). O mecanismo proposto para esta reacção irreversível, na qual se dá a transferência de um electrão e de um protão, encontra-se no **Esquema 5.3**.



Esquema 5.3. Mecanismo proposto para a oxidação da cdNOD.

A oxidação dos produtos (1) e (2) ocorre de forma idêntica: com a remoção de um electrão e de um protão, forma-se um radical, que posteriormente incorporará um grupo hidroxilo e tornar-se-á um produto di-hidroxilado. Assim, no final da reacção existem em solução dois produtos di-hidroxilados, que são reduzidos, picos 3_c e 4_c. Estes produtos são oxidados à superfície do GCE, picos 3_a e 4_a, originando o produto final com dois grupos carbonílicos, **Esquema 5.4**.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

O comportamento electroquímico da MC-LR e da NOD na superfície do GCE, bem como a sua degradação química em meio aquoso foram investigados numa ampla gama de pH utilizando técnicas voltamétricas.

Neste trabalho concluiu-se que a MC-LR e a NOD são detectáveis electroquimicamente na superfície do GCE. A oxidação electroquímica ocorre para potenciais elevados numa reacção irreversível e independente do pH do electrólito de suporte, com a transferência de um electrão.

As experiências realizadas com os aminoácidos constituintes das hepatotoxinas estudadas ou com os seus compostos análogos, 2-AAA e SA, permitiram determinar os centros electroactivos da MC-LR e da NOD.

O 2-AAA, composto análogo ao aminoácido MdhA, é oxidado para elevados potenciais à superfície do GCE, com perda de um electrão, numa reacção independente do pH.

O SA, utilizado para simular o aminoácido Adda presente na constituição das toxinas estudadas, apresentou um complexo mecanismo electroquímico. A oxidação do SA é independente do pH e envolve a transferência de um electrão. Concluiu-se que a resposta electroquímica que as toxinas apresentam é principalmente devida ao aminoácido Adda, presente tanto na MC-LR como na NOD.

Após incubação de SA nos diferentes electrólitos de suporte utilizados, foram verificadas com o tempo alterações no seu perfil voltamétrico. Um novo pico de oxidação, para potenciais menos elevados, devido à oxidação do SA degradado quimicamente em solução,

foi observado. Esta reacção ocorre com a transferência de um electrão e de um protão para pH's inferiores a 9,2. Verificou-se ainda que os dois produtos de oxidação do SA degradado quimicamente são posteriormente oxidados com a transferência de dois electrões e dois protões.

A degradação química em solução da MC-LR e da NOD foi estudada na gama de pH entre 1,3 e 11,9. Após incubação nos diferentes electrólitos de suporte, foram detectados novos processos redox que foram atribuídos aos produtos de degradação química da MC-LR e da NOD em solução aquosa, sem qualquer tipo de indução.

Os produtos da degradação química da MC-LR e da NOD são oxidados na superfície do GCE numa reacção irreversível, dependente do pH, na qual ocorre a transferência de um electrão e de um protão. Os dois produtos de oxidação resultantes são posteriormente oxidados; numa reacção reversível, dependente do pH e envolvendo a transferência de dois electrões e de dois protões.

Baseados na semelhança verificada entre a electroactividade do SA e a electroactividade das hepatotoxinas, foram propostos mecanismos para a oxidação e para a degradação química da MC-LR e da NOD.

As experiências de espectrofotometria e de HPLC foram ferramentas essenciais na confirmação dos dados electroquímicos e também revelaram a degradação química da MC-LR e da NOD em solução aquosa.

Considerando a elevada toxicidade associada a estas cianotoxinas, no futuro, seria de grande interesse avaliar a toxicidade dos seus produtos de degradação, bem como dos produtos de oxidação gerados electroquimicamente.

Tendo em conta as vantagens que a electroquímica apresenta – como a rapidez na análise e a possibilidade de miniaturizar e transportar o equipamento – o presente trabalho poderia constituir uma base para o desenvolvimento de novos métodos de detecção de cianotoxinas hepatotóxicas para utilização em ciências forenses.

BIBLIOGRAFIA

1. Bell, S., *Forensic Chemistry*. 1st ed. 2006, New Jersey, USA: Pearson Prentice Hall.
2. Meriluoto, J.A. and L.E. Spoof, Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. *Adv Exp Med Biol*, 2008. 619: p. 483-99.
3. Msagati, T.A.M., B.A. Siame, and D.D. Shushu, Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 2006. 78(4): p. 382-397.
4. Metcalf, J.S. and G.A. Codd, The status and potential of cyanobacteria and their toxins as agents of bioterrorism, in *Handbook on Cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications*, P.M. Gault and H.J. Marler, Editors. 2009, Nova Science Publishers, Inc.: New York, USA. p. 259-282.
5. Schopf, J.W., The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage, in *The ecology of cyanobacteria*, B.A. Whitton and M. Potts, Editors. 2002, Kluwer Academic Publishers: New York, USA. p. 13-35.
6. Adams, D.G., Symbiotic interactions, in *The ecology of cyanobacteria*, B.A. Whitton and M. Potts, Editors. 2000, Kluwer Academic Publishers: New York, USA. p. 523-561.
7. Sivonen, K., Cyanobacterial Toxins, in *Encyclopedia of Microbiology*. 2009. p. 209-307.
8. Metcalf, J.S. and G.A. Codd, Cyanobacterial toxins in the water environment. 2004: Foundation for Water Research.
9. Zegura, B., A. Straser, and M. Filipic, Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat Res*, 2011. 727(1-2): p. 16-41.
10. Codd, G.A., L.F. Morrison, and J.S. Metcalf, Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. 203(3): p. 264-72.
11. Puschner, B. and J.-F. Humbert, Cyanobacterial (blue-green algae) toxins in *Veterinary Toxicology*, R.C. Gupta, Editor. 2007, Elsevier, Inc. p. 714-724.
12. Hoeger, S.J., B.C. Hitzfeld, and D.R. Dietrich, Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005. 203(3): p. 231-242.
13. Campas, M., et al., Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria. *Talanta*, 2007. 72(1): p. 179-186.
14. Oberholster, P.J., et al., Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009. 72(4): p. 1177-82.

15. Nasri, H., S. El Herry, and N. Bouaicha, First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008. 71(2): p. 535-44.
16. Chen, J., et al., Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Sci Total Environ*, 2009. 407(10): p. 3317-22.
17. Pouria, S., et al., Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 1998. 352(9121): p. 21-26.
18. Azevedo, S., et al., Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 2002. 181: p. 441-446.
19. Carmichael, W.W., et al., Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988. 54(9): p. 2257-2263.
20. Galat, D.L., J.P. Verdin, and L.L. Sims, Large-scale patterns of *Nodularia spumigena* blooms in Pyramid Lake, Nevada, determined from Landsat imagery: 1972-1986. *Hydrobiologia*, 1990. 197: p. 147-164.
21. Sivonen, K., et al., Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989: p. 1990-1995.
22. Mazur, H. and M. Plinski, *Nodularia spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdansk. *Oceanologia*, 2003. 45(1): p. 305-316.
23. Pearson, L., et al., On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, 2010. 8: p. 1650-1680.
24. Mazur-Marzec, H., et al., Biodegradation of nodularin and effects of the toxin on bacterial isolates from the Gulf of Gdansk. *Water Res*, 2009. 43(11): p. 2801-10.
25. Annala, A., et al., Solution structure of nodularin. An inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16695-702.
26. Merel, S., M. Clement, and O. Thomas, State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon*, 2010. 55(4): p. 677-91.
27. Harding, W.R., et al., Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa. *J S Afr Vet Assoc*, 1995. 66(4): p. 256-9.
28. Nehring, S., Mortality of dogs associated with a mass development of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) in a brackish lake at the German North Sea coast. *Journal of Plankton Research*, 1993. 15(7): p. 867-872.

29. Codd, G.A., et al., Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 1999. 34: p. 405-415.
30. Kuiper-Goodman, T., I.R. Falconer, and J. Fitzgerald, Human health aspects, in *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*, I. Chorus and J. Bartram, Editors. 1999, E & FN SPON: London. p. 113-153.
31. Williams, C.D. and H. Jaeschke, Liver Toxicology, in *Encyclopedia of Environmental Health*, J.O. Nriagu, Editor. 2011, Elsevier B.V. p. 509-514.
32. Onstad, G.D., et al., Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation. *Environmental Science & Technology*, 2007. 41(12): p. 4397-4404.
33. Runnegar, M., N. Berndt, and N. Kaplowitz, Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995. 134: p. 264-272.
34. Fischer, W.J., et al., Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005. 203: p. 257-263.
35. Ohta, T., et al., Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research*, 1994. 54: p. 6402-6406.
36. Yoshizawa, S., et al., Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1990. 116: p. 609-614.
37. Harada, K., et al., Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, 2004. 44(1): p. 107-9.
38. Dawson, R.M., The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 1998. 36(7): p. 953-62.
39. Alverca, E., et al., Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line. *Toxicon*, 2009. 54(3): p. 283-94.
40. Bouaicha, N., et al., Genotoxic potential of Microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Environ Toxicol*, 2005. 20(3): p. 341-7.
41. Zegura, B., B. Sedmak, and M. Filipic, Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, 2003. 41(1): p. 41-48.
42. Gaudin, J., et al., In vivo DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. *Mutat Res*, 2008. 652(1): p. 65-71.

43. Jayaraj, R., T. Anand, and P.V.L. Rao, Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. *Toxicology*, 2006. 220(2-3): p. 136-146.
44. Sueoka, E., et al., Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1997. 123: p. 413-419.
45. WHO, Cyanobacterial toxins: microcystin-LR, in *Guidelines for drinking water quality*, WHO, Editor. 1998: Geneva. p. 95-110.
46. Meriluoto, J., et al., Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998. 810(1-2): p. 226-230.
47. Antoniou, M.G., et al., Unveiling New Degradation Intermediates/Pathways from the Photocatalytic Degradation of Microcystin-LR. *Environmental Science & Technology*, 2008. 42(23): p. 8877-8883.
48. Antoniou, M.G., et al., LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. *Toxicon*, 2008. 51(6): p. 1103-1118.
49. Antoniou, M.G., A.A. de la Cruz, and D.D. Dionysiou, Intermediates and reaction pathways from the degradation of microcystin-LR with sulfate radicals. *Environ Sci Technol*, 2010. 44(19): p. 7238-44.
50. Hashimoto, E.H., et al., Further Investigation of Microbial Degradation of Microcystin Using the Advanced Marfey Method. *Chemical Research in Toxicology*, 2009. 22(2): p. 391-398.
51. Al Momani, F., D.W. Smith, and M. Gamal El-Din, Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes. *J Hazard Mater*, 2008. 150(2): p. 238-49.
52. Song, K.Y., et al., Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. *Carcinogenesis*, 1999. 20(8): p. 1541-1548.
53. Rapala, J., et al., *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005. 55(Pt 4): p. 1563-8.
54. Kato, H., et al., Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides. *Water Research*, 2007. 41(8): p. 1754-1762.
55. Edwards, C., et al., Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere*, 2008. 73(8): p. 1315-1321.

56. Mazur-Marzec, H., J. Meriluoto, and M. Plinski, The degradation of the cyanobacterial hepatotoxin nodularin (NOD) by UV radiation. *Chemosphere*, 2006. 65(8): p. 1388-95.
57. Yan, F., et al., Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species. *Electrochemistry Communications*, 2001. 3(5): p. 224-228.
58. Humble, A.V., G.M. Gadd, and G.A. Codd, Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. *Water Research*, 1997. 31(7): p. 1679-1686.
59. Campas, M., M.G. Olteanu, and J.L. Marty, Enzymatic recycling for signal amplification: Improving microcystin detection with biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2008. 129(1): p. 263-267.
60. Tang, Y. and M. Wu, A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 2005. 65: p. 794-798.
61. Tfouni, S.A.V. and M.C.F. Toledo, Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*, 2002. 13: p. 117-123.
62. Bousquet, E., et al., Determination of undecylenic and sorbic acids in cosmetic preparations by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002. 30: p. 947-954.
63. Campos, C.A. and L.N. Gerschenson, Effect of certain additives on sorbate stability. *Food Research International*, 1996. 29(2): p. 147-154.
64. Yarramraju, S., et al., Investigation of sorbic acid volatile degradation products in pharmaceutical formulations using static headspace gas chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007. 44: p. 456-463.
65. Campos, C.A., A.M. Rojas, and L.N. Gerschenson, Studies of the effect of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) on sorbic acid degradation. *Food Research International*, 1996. 29(3-4): p. 259-264.
66. Campos, C.A., S.M. Alzamora, and L.N. Gerschenson, Sorbic Acid Stability in Meat Products of Reduced Water Activity. *Meat Science*, 1995. 41(1): p. 37-46.
67. Thakur, B.R., I.R. Trehan, and S.S. Arya, Radiolytic degradation of sorbic acid in isolated systems. *Journal of Food Science*, 1990. 55(6): p. 1699-1710.
68. Seow, C.C. and P.B. Cheah, Kinetics of degradation of sorbic acid in aqueous glycerol solutions *Food Chemistry*, 1985. 17(2): p. 95-103.
69. Arya, S.S. and B.R. Thakur, Degradation Products of Sorbic Acid in Aqueous Solutions. *Food Chemistry*, 1988. 29: p. 41-49.

70. Arya, S.S., Stability of Sorbic Acid in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980. 28: p. 1246-1249.
71. Casado, F.J., et al., Stability of sorbic and ascorbic acids in packed green table olives during long-term storage as affected by different packing conditions, and its influence on quality parameters. *Food Chemistry*, 2010. 122: p. 812-818.
72. Agency, U.S.E.P., Health Assessment Document for Acetaldehyde. EPA/600/8-86-015A. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Research Triangle Park. 1987: NC, USA.
73. Agency, U.S.E.P., Integrated Risk Information System (IRIS) on Acetaldehyde, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Research and Development, Cincinnati. 1993: OH, USA.
74. Jha, A.M. and M. Kumar, In vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology in mice by an unsaturated aldehyde crotonaldehyde. *Mutation Research*, 2006. 603: p. 159-163.
75. El-Gindy, A., et al., HPLC and chemometric methods for the simultaneous determination of cyproheptadine hydrochloride, multivitamins, and sorbic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004. 35: p. 703-713.
76. Aluoch-Orwa, J., et al., Quantitative analysis of sorbic acid in pharmaceutical cream formulations by liquid chromatography on poly(styrene-divinylbenzene). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997. 5: p. 155-161.
77. Saad, B., et al., Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005. 1073: p. 393-397.
78. Ferreira, I.M.P.L.V.O., et al., Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC. *Food Research International*, 2000. 33: p. 113-117.
79. Techakriengkrai, I. and R. Surakarnkul, Analysis of benzoic acid and sorbic acid in Thai rice wines and distillates by solid-phase sorbent extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007. 20: p. 220-225.
80. Chen, Y.Q. and Y.N. Ni, Simultaneous spectrophotometric determination of four preservatives in foodstuffs by multivariate calibration and artificial neural networks. *Chinese Chemical Letters*, 2009. 20: p. 615-619.
81. Santini, A.O., et al., Potentiometric sensor for sorbic acid determination in food products. *Food Chemistry*, 2009. 115: p. 1563-1567.
82. Mikami, E., et al., Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance

liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002. 28: p. 261-267.

83. Brett, C.M.A. and A.M.O. Brett, *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications* 1993, Oxford, UK: Oxford University Press. 427.

84. Bard, A.L.F., L.R., *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*. 2nd ed. 2001, New York, USA: John Wiley and Sons, Inc.

85. Sadek, P.C., *Illustrated pocket dictionary of chromatography*. 2004, Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc.

86. Pesek, J.J. and M.T. Matyska, *Reversed-Phase Chromatography: description and applications*, in *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes, Editor. 2002, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA.

87. Jinno, K., *Detection Principles*, in *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes, Editor. 2002, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA.

88. McMaster, M.C., *HPLC - A practical user's guide*. 2nd ed. 2007, Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc.

89. Aboul-Enein, H.Y. and V. Serignese, *Photodiode-array detection*, in *Encyclopedia of Chromatography*, J. Cazes, Editor. 2002, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA.

90. Smith, E.T., *Examination of $n = 2$ reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. 572: p. 259-264.

91. Lozano, V.A., et al., *Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in commercial juices using the PLS-2 multivariate calibration method and validation by high performance liquid chromatography*. *Talanta*, 2007. 73: p. 282-286.

92. Marder, H.L. and C. Schuerch, *Periodate Oxidation of Compounds Related to Malondialdehyde*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1959. 24(12): p. 1977-1979.

93. MacDonald, I.D. and H.B. Dunford, *Mechanism of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Malonaldehyde*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989. 272(1): p. 185-193.

94. Shi, H.X., et al., *Degradation of microcystins in aqueous solution with in situ electrogenerated active chlorine*. *Chemosphere*, 2005. 60(3): p. 326-33.

95. Oliveira, S.C.B., M. Vivan, and A.M. Oliveira-Brett, *Electrochemical behavior of thalidomide at a glassy carbon electrode*. *Electroanalysis*, 2008. 20(22): p. 2429-2434.

