



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Tese de Doutorado

**Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico da
Microcistina-LR e Avaliação *in situ* da sua
Interação com DNA**

Ilanna Campelo Lopes

SAPIENTIA ÆDIFICAT

João Pessoa – PB – Brasil

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Tese de Doutorado

Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico da Microcistina-LR e Avaliação *in situ* da sua Interação com DNA

Ilanna Campelo Lopes*

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal da Paraíba,
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

*** Bolsista CAPES**

João Pessoa – PB – Brasil

2011

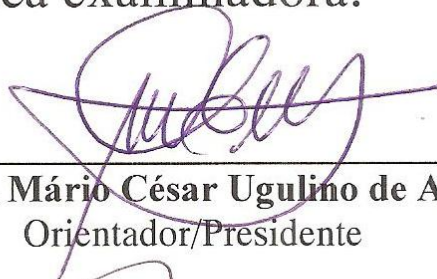
L864e Lopes, Ilanna Campelo.
Estudo eletroquímico e eletroanalítico da microcistina-LR
e avaliação in situ da sua interação com DNA / Ilana Campelo
Lopes.- João Pessoa, 2011.
126f. : il.
Orientador: Mário César Ugulino de Araújo
Co-orientador: Auro Atsushi Tanaka
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN
1. Química. 2. Microcistina-LR (MC-LR). 3. Microcistina –
estudo eletroquímico. 4. Microcistina – estudo eletroanalítico.
5. MC-LR – interação – DNA.

UFPB/BC

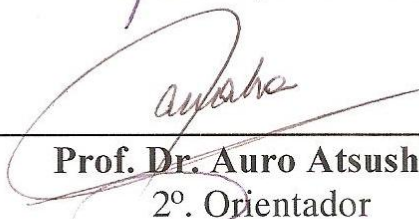
CDU: 54(043)

Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico da Microcistina-LR e Avaliação *in situ* da sua Interação com DNA.

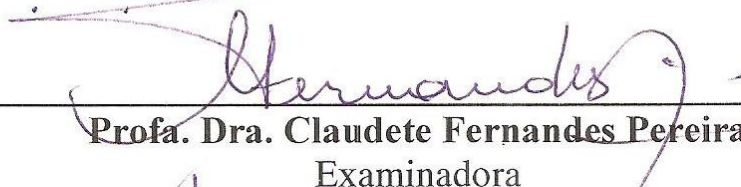
Aprovada pela banca examinadora:



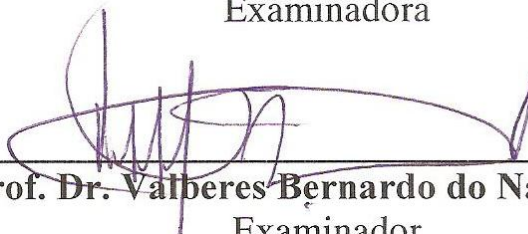
Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



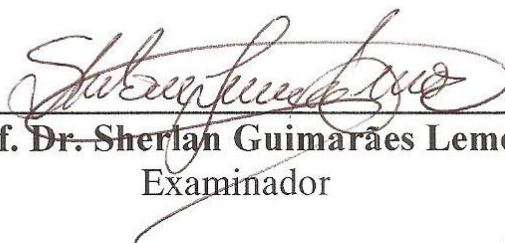
Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka
2º. Orientador



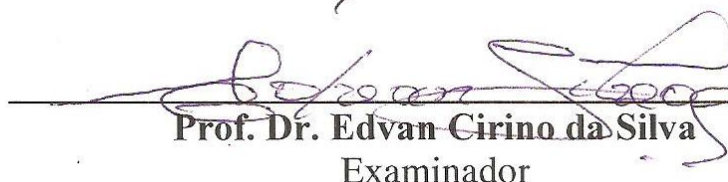
Profa. Dra. Claudete Fernandes Pereira
Examinadora



Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento
Examinador



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Examinador



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Examinador

*“Bem aventurado o homem que encontra a
sabedoria, e o homem que adquire conhecimento,
pois ela é mais proveitosa do que a prata, e dá mais
lucro do que o ouro.”
(Provérbios 3:13 e 14)*

*Dedico este trabalho, em especial, a minha querida
mãe Iolanda, pelo seu amor incondicional e
dedicação dispensada, a quem tenho espelhado-me
por seus exemplos de coragem e perseverança.
Ao meu pai Walter e irmãos Dirceu e Danilo, pelo
seu amor, carinho e compreensão.
E ao meu namorado Luís, pelo seu amor,
companheirismo e apoio durante essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, grande orientador da minha vida, por permitir que eu continuasse a minha caminhada com fé e coragem, concedendo-me a capacidade de superar os obstáculos, por tudo o que Ele fez até aqui e ainda fará.

A minha família, pelo seu amor incondicional, apoio e incentivo na realização deste trabalho.

A prima Silvânia e ao Márcio pelo acolhimento e atenção dispensada em João Pessoa.

Ao meu namorado Luís pelo seu amor, compreensão e paciência durante essa jornada.

Ao professor Dr. Mário César Ugulino de Araújo, meu especial agradecimento pela oportunidade concedida, amizade, incentivo e orientação no decorrer do trabalho.

Ao professor Dr. Auro Atsushi Tanaka, pela amizade, colaboração e co-orientação dispensada neste trabalho.

Aos amigos do LAQA-UFPB, Daniel, Edilene, Fátima, Flaviana, Francisco, Paulo Henrique, Pablo, Renato Allan e Wellington pelas amizades construídas, incentivo mútuo e companheirismo durante todos estes anos de convivência.

Ao amigo Williame, em especial, pela amizade, companheirismo e colaboração nas discussões durante a elaboração desta tese.

À professora Dra. Ana Maria Oliveira Brett, pelo apoio, confiança creditada e co-orientação dispensada no período de desenvolvimento da parte experimental deste trabalho, realizada no Laboratório de Electroanálise e Corrosão da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Aos amigos do LEC-UC-Portugal, Adrian, Ana Maria, Dora, Isabel, Sara e Tati, pela receptividade, interação científica, amizades construídas e companheirismo durante todo o período de estágio. Em especial, ao Carlos, Paulina e Victor.

À FAPEMA, CAPES e BIID pelas bolsas concedidas, ao CNPq e FCT pelos auxílios cedidos ao laboratórios envolvidos.

E a todos os alunos, professores e funcionários da Pós-Graduação em Química da UFPA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	5
1.1.1 Geral	5
1.1.2 Específicos	5
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
2.1 Considerações gerais sobre cianobactérias	7
2.1.1 Cianotoxinas	8
2.1.1.1 Microcistinas	9
2.1.1.1.1 Microcistina-LR	11
2.2 Métodos analíticos aplicados à análise de microcistina-LR	15
2.3 Ácido desoxirribonucléico	19
2.3.1 Danos ao DNA	21
2.3.2 Eletroquímica do DNA	24
2.3.2.1 Propriedades eletroquímicas do DNA	24
2.3.2.1 Biossensores eletroquímicos de DNA	26
2.4 Técnicas voltamétricas	31
2.4.1 Voltametria cíclica	32
2.4.2 Voltametria de pulso diferencial	34
2.4.3 Voltametria de onda quadrada	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Reagentes e soluções	39
3.2 Instrumentação	41
3.3 Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas	42

3.4 Tratamento dos dados voltamétricos	43
3.5 Preparação da superfície do ECV	43
3.6 Teste de adsorção dos compostos	44
3.7 Detecção dos centros eletroativos da microcistina-LR.....	44
3.7.1 Teste dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp	45
3.7.2 Teste dos compostos 2-AAA e SA.....	45
3.8 Construção da curva analítica	46
3.8.1 Limites de detecção e quantificação	46
3.9 Condições experimentais para a investigação voltamétrica <i>in situ</i> da interação da microcistina-LR com <i>dsDNA</i>	48
3.9.1 Preparação do biossensor eletroquímico de <i>dsDNA</i> e procedimento de incubação	48
3.9.2 Preparação das soluções de <i>dsDNA</i> incubadas	50
3.10 Condições experimentais para a investigação espectrofotométrica <i>in situ</i> da interação da microcistina-LR com <i>dsDNA</i>	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Comportamento eletroquímico da microcistina-LR	53
4.1.1 Voltametria cíclica.....	54
4.1.2 Voltametria de pulso diferencial.....	56
4.1.3 Voltametria de onda quadrada	59
4.2 Comportamento eletroquímico de oxidação da microcistina-LR degradada	60
4.2.1 Voltametria cíclica.....	61
4.2.2 Voltametria de pulso diferencial.....	63
4.2.3 Voltametria de onda quadrada	72
4.3 Análise cromatográfica da microcistina-LR.....	73
4.4. Estudo voltamétrico dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp	74
4.5 Estudo voltamétrico do ácido 2-acetamidoacrílico	75
4.5.1 Voltametria cíclica.....	75
4.5.2 Voltametria de pulso diferencial.....	76
4.6 Estudo voltamétrico do ácido sórbico	81
4.6.1 Voltametria cíclica.....	81
4.6.2 Voltametria de pulso diferencial.....	82

4.6.3 Estudo voltamétrico do ácido sórbico degradado	85
4.6.3.1 Voltametria de pulso diferencial	85
4.6.3.2 Voltametria de onda quadrada	91
4.6.3.3 Mecanismos de oxidação do ácido sórbico e dos seus produtos de degradação.....	92
4.7 Mecanismo de oxidação da MC-LR e dos seus produtos de degradação	94
4.8 Estudo eletroanalítico da microcistina-LR.....	99
4.8.1 Curva analítica	99
4.8.2 Figuras de mérito	101
4.9 Interação da microcistina-LR com DNA	102
4.9.1 Avaliação voltamétrica <i>in situ</i> da interação da microcistina-LR com <i>dsDNA</i> utilizando biossensores de <i>dsDNA</i>	102
4.9.2 Avaliação voltamétrica <i>in situ</i> da interação da microcistina-LR com <i>dsDNA</i> utilizando soluções de <i>dsDNA</i> incubadas	104
4.9.3 Avaliação espectrofotométrica <i>in situ</i> da interação da microcistina-LR com <i>dsDNA</i>	107
5 CONCLUSÕES	110
5.1 Perspectivas futuras	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura molecular da MC-LR.	11
Figura 2.2. Representações da dupla hélice do DNA.	20
Figura 2.3. Estrutura química do DNA. Ligações de hidrogênio entre bases complementares em um fragmento de uma molécula de DNA.	20
Figura 2.4. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 com: 60 µg mL ⁻¹ de ssDNA (•••) 1ª e (—) 10ª varredura, e 60 µg mL ⁻¹ de dsDNA (•••) 1ª e (—) 40ª varredura de potencial.	24
Figura 2.5. Imagens topográficas de dsDNA sobre HOPG obtidas por AFM. A) Filme fino de dsDNA obtido aplicando um $E = + 0,30$ mV (vs. fio de Ag) durante 3 min, numa solução de dsDNA 60 µg mL ⁻¹ e B) Filme espesso de dsDNA preparado por evaporação a partir de uma solução de 37,5 µg mL ⁻¹	28
Figura 2.6. Orientação de uma dupla hélice de DNA na superfície de um eletrodo conforme o potencial aplicado.....	29
Figura 2.7. VC. (A) Esquema de aplicação de potencial. (B) Resposta típica para um sistema reversível.	32
Figura 2.8. Variação da corrente faradáica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso.....	34
Figura 2. 9. VPD. (A) Esquema de aplicação de potenciais e (B) Resposta típica.	35
Figura 2. 10. VOQ. (A) Esquema de aplicação de potenciais; B) Resposta típica para um sistema reversível e C) para um sistema irreversível.....	36
Figura 3.1. Sistema eletroquímico de trabalho: (A) Potenciostato/Galvanostato e (B) célula eletroquímica e eletrodos.	41
Figura 3.2. Estrutura química: (A) ácido 2-acetamidoacrílico e (B) ácido sórbico.	45
Figura 3.3. Intervalo linear de um método analítico.....	47
Figura 3.4. (A) Preparação do biossensor eletroquímico de dsDNA. (B) Incubação do biossensor de dsDNA na solução de MC-LR.	49

Figura 3.5. Preparação das soluções de dsDNA incubadas com MC-LR. .50

Figura 4.1. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de MC-LR $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0, na ausência (—) e presença de MC-LR (—). $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$53

Figura 4.2. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4: (—) 1ª, (—) 2ª e (--) 3ª varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 54

Figura 4.3. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ no tampão em função do pH. (B) Relação dos E_p (■) e I_p (○) do pico 1_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$57

Figura 4.4. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 5,3. (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$58

Figura 4.5. Voltamogramas de onda quadrada sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 5,3: 1ª varredura; I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa. $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $\nu_{eff} = 100 \text{ mV s}^{-1}$60

Figura 4.6. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos após 96 h de incubação de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4. (—) 1ª e (—) 2ª varreduras entre + 0,25 V e 1,35 V. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$61

Figura 4.7. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos após 96 h de incubação de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4. (—) 1ª e (—) 2ª varreduras entre + 0,25 V e 1,10 V. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$62

Figura 4.8. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada em tampão: (A) pH 3,4, (B) pH 4,4, (C) pH 5,3 e (D) pH 6,1. (—) 1ª varredura imediatamente após adição de MC-LR ao tampão e após (—) 5 h, (—) 24 h e (—) 29 h de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$64

Figura 4.9. Variação da corrente do pico 1_a para 0, 5, 24 e 29 h de incubação em tampão em função do pH.65

Figura 4.10. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos após 29 h de incubação de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão: (A) pH 3,4, (B) pH 5,3 e (C) pH 6,1. (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$66

Figura 4.11. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos após 29 h de incubação de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão: (A) pH 3,4 e (B) pH 6,1: (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$67

Figura 4.12. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, após 29 h de incubação, em função do pH. (B) Relação do (■) E_p do pico 2_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$69

Figura 4.13. Variação da corrente do pico 2_a para 5 h, 24 h e 29 h de incubação em tampão em função do pH.70

Figura 4.14. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 2ª varredura sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, após 29 h de incubação, em função do pH. (B) Relação do E_p dos picos (●) 3_a e (▲) 4_a e I_p dos picos (○) 3_a e (Δ) 4_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$71

Figura 4.15. Voltamogramas de onda quadrada sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada após 53 h em tampão pH 5,3: (A) 1ª e (B) 2ª varreduras; I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa. $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $v_{eff} = 100 \text{ mV s}^{-1}$72

Figura 4.16. Cromatogramas da solução de MC-LR $6,3 \times 10^{-7} \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4: (—) imediatamente após a adição da MC-LR no tampão e (—) após 1 mês de incubação no tampão.74

Figura 4.17. Voltamogramas cíclicos com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de 2-AAA $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0: (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$76

Figura 4.18. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura, sobre ECV, obtidos imediatamente após a adição de uma solução de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ no tampão em função do pH. (B) Relação dos (■) E_p e (○) I_p do pico 1_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$77

Figura 4.19. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 4,5. (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$79

Figura 4.20. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos em solução de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada em tampão: (A) pH 3,5, (B) pH 4,5, (C) pH 5,3 e (D) pH 6,0. (—) 1ª varredura imediatamente após adição de 2-AAA ao tampão e após (—) 24 h e (—) 48 h de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$80

Figura 4.21. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de SA $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0: (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$...82

Figura 4.22. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de SA $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ no tampão em função do pH. (B) Relação dos (■) E_p e (○) I_p do pico 1a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$83

Figura 4.23. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de SA $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 4,2. (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$84

Figura 4.24. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos em solução de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada em tampão: (A) pH 3,4 e (B) pH 5,3. (—) 1ª varredura imediatamente após adição de SA ao tampão e após (—) 5 h, (—) 48 h e (—) 14 dias de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$86

Figura 4.25. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos após 14 dias de incubação de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 3,4: (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras e (—) 1ª varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$87

Figura 4.26. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura sobre ECV obtidos em solução de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, após 14 dias de incubação, em função do pH. (B) Relação do (■) E_p do pico 2a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$89

Figura 4.27. Variação da corrente do pico 2 _a para 24 h, 7 e 14 dias de incubação em tampão em função do pH.	90
Figura 4.28. Voltamogramas de onda quadrada sobre ECV obtidos em solução de SA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ incubada após 20 dias em tampão pH 3,4: (A) 1 ^a e (B) 2 ^a varreduras; I_t - corrente total, I_f - corrente direta, I_b - corrente reversa. $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $v_{\text{eff}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$	91
Figura 4.29. Mecanismo de oxidação proposto para o ácido sórbico.....	92
Figura 4.30. Mecanismo de oxidação proposto para os produtos de degradação do ácido sórbico: crotonaldeído (R é C = CH ₂), malonaldeído (R é C = O).	94
Figura 4.31. Mecanismos de oxidação propostos para a MC-LR: Oxidação nos aminoácidos Mdha (A) e Adda (B).....	95
Figura 4.32. (A) Esquema proposto para a degradação química da MC-LR e (B) Mecanismo de oxidação proposto para os seus produtos de degradação em solução.	98
Figura 4.33. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida para oxidação da MC-LR, sobre ECV, em tampão pH 1,3, numa faixa linear de concentração de 5 à 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Relação da I_p com a concentração da MC-LR nas mesmas condições.....	100
Figura 4.34. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos para o biossensor de dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) e incubado durante 10 (—) e 20 minutos (—) numa solução de MC-LR em tampão acetato pH 4,5: (A) 30 e (B) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	104
Figura 4.35. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida de uma mistura de dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e MC-LR 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5, obtidos em um ECV: (A) (—) dsDNA de controle, (—) 0 h; (—) 2 h e (—) 6 h de incubação; (B) (—) dsDNA de controle, (—) 24 h e (—) 48 h de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	105
Figura 4.36. Espectros de absorção de: (—) dsDNA de controle 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (—) MC-LR 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (—) solução de dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida imediatamente após a adição da MC-LR 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão pH 4,5. Inserção: espectro de absorção da mistura dsDNA/MC-LR entre 210 e 350 nm.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.....33

Tabela 3.1. Tampões para eletrólitos suporte com diluição para 100 mL de água.....40

LISTA DE SÍMBOLOS

		<i>Unidades</i>
τ	Tempo	s
α	Coeficiente de transferência de carga	-
ΔE_p	Amplitude de pulso	mV
ΔE_s	Incremento de potencial	mV
ΔE_t	Largura de pulso	ms
E_{pa}	Potencial de pico anódico	V
E_{pc}	Potencial de pico catódico	V
$E_{p/2}$	Potencial de meia altura de pico	mV
E_i	Potencial inicial	V
E_f	Potencial final	V
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda	mV
E_{max}	Potencial mínimo	V
E_{min}	Potencial máximo	V
f	Frequência de pulso	Hz
I_b	Corrente reversa (do inglês <i>backward current</i>)	A
I_f	Corrente direta (do inglês <i>forward current</i>)	A
I_{pa}	Corrente de pico anódica	A
I_{pc}	Corrente de pico catódica	A
I_t	Corrente total (do inglês <i>total current</i>)	A
n	Número de elétrons transferidos	-
t	Tempo	s
v	Velocidade de varredura	mV s ⁻¹

LISTA DE ABREVIATURAS

2,8-DHA	2-8-dihidroxiadenina
2-AAA	Ácido 2-acetamidoacrílico
8-oxoG	8-oxoguanina
Adda	3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico
Ala	Alanina
Arg	Arginina monohidroclorada
Asp	Ácido aspártico
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
dAdo	Desoxiadenosina
dGuo	Desoxiguanosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dsDNA	Ácido desoxirribonucléico de cadeia dupla (do inglês <i>double stranded Desoxyribonucleic Acid</i>)
E	Eletroforese
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Glu	Ácido glutâmico
HOPG	do inglês <i>High Oriented Pyrolytic Graphite</i>
LD	Limite de detecção
LL	Limite de linearidade
LQ	Limite de quantificação
MC-LF	Microcistina-LF
MC-LR	Microcistina-LR
MC-LW	Microcistina-LW

MC-RR	Microcistina-RR
MCs	Microcistinas
Mdha	N-metildehidroalanina
MeAsp	Ácido metilaspártico
MFA	Microscopia de força atômica
pdMC-LR	Produto(s) de degradação da microcistina-LR
pdSA	Produto(s) de degradação do ácido sórbico
POA's	processos oxidativos avançados
PP1A	Proteína fosfatase tipo 1A
PP2A	Proteína fosfatase tipo 2A
RMN	Ressonância magnética nuclear
SA	Ácido sórbico
ssDNA	Ácido desoxirribonucléico de cadeia simples (do inglês <i>single stranded Desoxyribonucleic Acid</i>)
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltameteria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

RESUMO

“Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico da Microcistina-LR e Avaliação *in situ* da sua Interação com DNA”

Ilanna C. Lopes; Mário C. U. de Araújo; Auro A. Tanaka

A Microcistina-LR (MC-LR) é a hepatotoxina heptapeptídica cíclica mais tóxica à saúde dos humanos e animais e a mais comumente encontrada em florações de cianobactérias. Além disso, ela é capaz de induzir danos oxidativos ao DNA, levando possivelmente à carcinogenicidade em humanos. Neste trabalho, a MC-LR foi investigada sobre um eletrodo de carbono vítreo utilizando técnicas voltamétricas. Um processo irreversível, controlado por difusão e independente do pH foi observado para a oxidação da MC-LR. Essa toxina sofreu degradação química em solução tampão ao longo do tempo, com a formação homogênea de dois produtos de degradação eletroativos. Esses produtos de degradação sofreram oxidação em um processo irreversível e dependente do pH levando à formação de dois produtos de oxidação, os quais sofreram reações reversíveis em um processo dependente do pH. Com isso, mecanismos de reação de oxidação da MC-LR e dos seus produtos de degradação foram propostos. Um estudo eletroanalítico para a determinação da MC-LR foi realizado utilizando DPV. Para isso, foi construída uma curva analítica na faixa linear de concentração de 5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Com base nessa curva, limites de detecção e quantificação foram estimados em 0,0014 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1,39 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 0,0046 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (4,57 $\mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Além disso, uma avaliação *in situ* da interação da MC-LR com *dsDNA* foi investigada e mostrou que essa toxina interage e se liga às cadeias do *dsDNA*, induzindo à modificações conformacionais na estrutura da dupla hélice ao longo do tempo de incubação.

Palavras-chave: Microcistina-LR, degradação, voltametria, DNA.

ABSTRACT

“Electrochemical and Electroanalytical Study of Microcystin-LR and *in situ* Evaluation of its interaction with DNA”

Ilanna C. Lopes; Mário C. U. de Araújo; Auro A. Tanaka

The Microcystin-LR (MC-LR) is a cyclic heptapeptidic hepatotoxin most toxic to the human and animal health and is the most commonly found in cyanobacteria blooms. Moreover, it can induce oxidative damage to DNA, leading possibly to the carcinogenicity in humans. In this study, MC-LR was investigated on glassy carbon electrode using voltammetric techniques. It was observed that the oxidation of MC-LR is an irreversible, diffusion controlled and pH-independent process. This toxin was chemically degraded in buffer solution along the time, with homogeneous formation of two electroactive degradation products. These degradation products have undergone an irreversible and pH-dependent oxidation process, leading to the formation of two oxidation products, which have undergone reversible and pH-dependent reactions. Thus, oxidation reaction mechanisms of MC-LR and its degradation products were proposed. An electroanalytical study for the determination of MC-LR was carried out using DPV. For this, an analytical curve was built in a linear concentration range from 5 to 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Based on this curve, detection and quantification limits were estimated at 0.0014 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1.39 $\mu\text{g L}^{-1}$) and 0.0046 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (4.57 $\mu\text{g L}^{-1}$), respectively. In addition, an *in situ* evaluation of MC-LR-*dsDNA* interaction was investigated and showed that this toxin interacts and binds to *dsDNA* chains, inducing conformational changes in the double helix structure along the incubation time.

Keywords: Microcystin-LR, degradation, voltammetry, DNA.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, são bactérias Gram-negativas procariontes fotossintéticas que são encontradas em uma variedade de habitats, colonizando biótopos aquáticos e terrestres (MANKIEWICZ *et al.*, 2003; BRIAND *et al.*, 2003). Seu domínio sobre as demais espécies do ecossistema é uma indicação de que elas possuem algumas capacidades fisiológicas específicas que lhes permitem competir de forma muito eficiente (JAYARAJ, ANAND e RAO, 2006).

As cianobactérias produtoras de toxinas são uma ameaça mundial para os seres humanos e animais, devido à sua ocorrência ampla em águas potável e recreacional (HITZFELD, HOGER e DIETRICH, 2000; RAO, 2004). Doenças humanas atribuídas às toxinas de cianobactérias podem ser categorizadas em gastroenterite e doenças associadas, reações alérgicas e irritação, e doenças hepáticas (HITZFELD, HOGER e DIETRICH, 2000; CHORUS, 2000).

Certas espécies de cianobactérias são capazes de produzir uma variedade de toxinas potentes, incluindo um grupo de hepatotoxinas, especialmente as microcistinas (MCs) (SIVONEN e JONES, 1999). As MCs são referidas como hepatotoxinas, uma vez que o fígado é o alvo primário em casos de envenenamento de animais e humanos (CODD, MORRISON e METCALF, 2005). Elas são as mais frequentemente encontradas na água e mais comumente responsáveis por envenenamento de seres humanos e outros animais que entram em contato com florações tóxicas e água contaminadas (CODD, BELL e BROKS, 1989).

Entre um grupo de cerca de 90 variantes de MCs relatadas até agora (SIVONEN e JONES, 1999; WELKER e VON DOHREN, 2006), a microcistina-LR (MC-LR) se destaca como a mais tóxica e a mais comumente encontrada em florações de cianobactérias (CÂMPAS *et al.*, 2007). Essa toxina é uma potente inibidora de proteínas fosfatase 1 e 2A,

conhecidas como PP1 e PP2A, de células eucariontes, respectivamente. Também é reconhecida como promotora de tumores hepáticos (HONKANENER *et al.*, 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992). Hemorragia aguda no fígado e morte ocorrem com altas doses de MC-LR (BISCHOFF, 2001).

A alta toxicidade das cianotoxinas gera impacto sobre os aspectos ambiental, social e econômico da sociedade moderna (ANTONIOU *et al.*, 2008a). Devido ao forte efeito tóxico e a grande presença dessas cianobactérias em águas naturais, as MCs continuam representando um risco à saúde dos seres humanos através da água potável (MERILUOTO, 1997). Porém, essas toxinas peptídicas decompõem-se rapidamente quando expostas a pigmentos de cianobactérias e devido à degradação bacteriana, dentre outras causas (DAWSON, 1998; HARADA e TSUJI, 1998; WATANABE *et al.*, 1992). A degradação total das MCs é dependente da sua concentração inicial, dos microorganismos presentes, da temperatura da água, do pH e das disponibilidades de outras fontes de carbono orgânico (ROBERTSON, LAWTON e CORNISH, 1999; PARK *et al.*, 2001). Diante disso, vários estudos têm sido citados na literatura sobre a degradação da MC-LR, como meios de investigação e inativação dessa toxina (ANTONIOU *et al.*, 2008a; ANTONIOU *et al.*, 2008b; DAVID *et al.*, 1996; MOMANI, SMITH e EL-DIN, 2008).

Muitos métodos analíticos e bioquímicos/biológicos têm sido empregados na detecção, caracterização e/ou determinação de MCs e seus produtos de degradação em água. Dentre os métodos empregados, constam a cromatografia líquida (CL), cromatografia gasosa (CG), eletroforese (E), ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia de força atômica (MFA) e imunoenaios (MSAGATI, SIAME e SHUSHU, 2006).

Abordagens eletroquímicas para o estudo dessas toxinas de cianobactérias em soluções aquosas têm sido menos frequentemente relatadas (CÂMPAS, OLTEANU e MARTY, 2008; HUMBLE, GADD e CODD,

1997; YAN, OZSOZ e SADIK, 2000; MERILUOTO *et al.*, 1998). Até o momento, a literatura nada relata sobre um processo redox direto para a detecção e determinação de MC-LR, bem como a caracterização de seus produtos formados.

A MC-LR foi relatada também por induzir danos oxidativos ao DNA (ácido desoxirribonucléico) *in vitro* e *in vivo*, e sua genotoxicidade parece ser mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) (ZEGURA, LAH e FILIPIC, 2004; GAUDIN *et al.*, 2008; ZEGURA, SEDMAK e FILIPIC, 2003). Embora a MC-LR cause grave hepatotoxicidade em mamíferos (HOOSER *et al.*, 1989; RAO *et al.*, 1995; BHATTACHARYA *et al.*, 1996), podendo atuar como um iniciador de câncer hepático (ZEGURA, SEDMAK e FILIPIC, 2003), a sua genotoxicidade e carcinogenicidade ainda são inconclusivas. Assim, segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer, essa toxina é classificada como, possivelmente, carcinogênica para humanos (IARC, 2006). Em decorrência disso, vários estudos têm sido desenvolvidos na intenção de investigar a ação danosa dessa toxina ao DNA (GAUDIN *et al.*, 2008; MAATOUK *et al.*, 2004; ZEGURA, SEDMAK e FILIPIC, 2003).

Biossensores eletroquímicos de DNA têm sido utilizados com sucesso na investigação da interação de várias moléculas com o DNA. Comparando com outros métodos, eles mostram uma grande sensibilidade para detectar pequenas perturbações na estrutura de dupla hélice (OLIVEIRA, CORDUNEANU e OLIVEIRA-BRETT, 2008), bem como investigar o mecanismo de ação dos danos oxidativos causados ao DNA. Entretanto, nada tem sido descrito na literatura sobre o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA para investigação direta da interação da MC-LR com o ácido nucléico.

Este trabalho realizou um estudo sobre o comportamento eletroquímico da MC-LR e da sua degradação em meio aquoso, assim

como um estudo eletroanalítico dessa toxina e investigação *in situ* da sua interação com o DNA.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Este trabalho teve o propósito de estudar o comportamento eletroquímico da MC-LR e de seus produtos de degradação em solução aquosa, desenvolver um método eletroanalítico de determinação dessa toxina e investigar *in situ* a sua interação com DNA.

1.1.2 Específicos

- Investigar as propriedades eletroquímicas da MC-LR, utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ);
- Estudar as propriedades eletroquímicas da MC-LR degradada utilizando VC, VPD e VOQ;
- Investigar a ocorrência da degradação da MC-LR por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Detectar os sítios eletroativos da MC-LR;
- Propor os mecanismos de oxidação da MC-LR e dos seus produtos de degradação;
- Propor um método eletroanalítico para determinação da MC-LR, estabelecendo os limites de detecção e quantificação;
- Investigar a interação *in situ* da MC-LR com DNA utilizando biossensores eletroquímicos de *dsDNA* e soluções incubadas dessa toxina com *dsDNA*.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações gerais sobre cianobactérias

As cianobactérias ou "algas azuis" constituem um grupo diversificado de bactérias fotossintéticas oxigênicas que habitam uma grande variedade de ambientes aquáticos e terrestres, e mostram grande diversidade morfológica (PEARSON *et al.*, 2010). Pertencem a um antigo grupo de microorganismos presentes no planeta há três bilhões de anos e apresentam uma combinação de características encontradas tanto em algas como em bactérias.

Em condições naturais, as cianobactérias vivem em equilíbrio com os demais grupos de algas. No entanto, em situações de enriquecimentos nutricionais, ou seja, eutrofização do corpo d'água e condições hidrológicas estáveis, pode ocorrer o aumento de abundância das espécies de cianobactérias, dando origem à florações.

As florações das cianobactérias causam impactos sociais, econômicos e ambientais, não apenas por sua biomassa contribuir para problemas estéticos como alterações na coloração da água (as "natas" verdes na superfície) e odor desagradável, mas também, por alterar o sabor da água tratada para abastecimento. A decomposição das florações de algas leva a desoxigenação, alterando a química da água e afetando a capacidade de sobrevivência dos organismos aquáticos. As florações de cianobactérias tóxicas comprometem a disponibilidade hídrica para os usos mais nobres como abastecimento público, dessedentação animal, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças, aquicultura e pesca, dentre outros (DEBERDT, NETO e AGUJARO, 2001).

Atualmente, há cerca de 150 gêneros de cianobactérias, das quais 40 são conhecidas como produtoras de toxinas – as cianotoxinas (SAKER, THOMAS e NORTON, 1999). No Brasil, os gêneros mais comuns de cianobactérias formadoras de florações são *Microcystis*, *Nodularia*,

Cylindrospermopsis, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix* (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000).

2.1.1 Cianotoxinas

As cianotoxinas são conhecidas como toxinas produzidas por cianobactérias. Constituem um amplo grupo de produtos naturais tóxicos.

Em ambientes aquáticos, as cianotoxinas normalmente permanecem contidas nas células de cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre durante a fase de senescência (morte natural), estresse celular ou uso de algicidas, como sulfato de cobre ou cloração (MAGALHÃES, SOARES e AZEVEDO, 2001).

A produção desses metabólitos secundários bioativos, com altas propriedades tóxicas pode afetar direta ou indiretamente a saúde de muitos animais, inclusive a do homem (DEBERDT, NETO e AGUJARO, 2001).

As toxinas de cianobactérias constituem um grupo quimicamente heterogêneo, apresentando assim, diferentes propriedades toxicológicas.

Elas podem ser divididas em três grupos principais, com base na estrutura química: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (SIVONEN e JONES, 1999).

Comumente, as cianotoxinas são classificadas em categorias distintas relacionadas aos efeitos tóxicos provocados nos organismos afetados. Do ponto de vista toxicológico, as cianotoxinas abrangem quatro classes principais, as quais são bastante diversificadas estruturalmente: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (toxinas irritantes) (PEARSON *et al.*, 2010).

As principais e mais perigosas toxinas produzidas pelos gêneros de cianobactérias mais comuns são: microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas (PEARSON *et al.*, 2010).

Grande parte dos envenenamentos por cianobactérias envolve hepatotoxicidade aguda causada por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, podendo causar mortes num intervalo de poucas horas a poucos dias (CARMICHAEL, 1994).

Dentre essas hepatotoxinas, as MCs constituem o grupo mais comum e com maior incidência de acidentes por contaminação de humanos e animais.

2.1.1.1 Microcistinas

As MCs foram as primeiras hepatotoxinas identificadas, isoladas do gênero *Microcystis aeruginosa* (BISHOP, ANET e GORHAM, 1959). São as cianotoxinas mais largamente encontradas nas florações de cianobactérias de água doce (CARMICHAEL, 1994), usualmente encontradas em lagos, reservatórios de água e áreas recreacionais (YAN, OZSOZ e SADIK, 2000).

As hepatotoxinas MCs são as toxinas mais comuns produzidas por alguns gêneros de cianobactérias tais como, *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (FERRÃO-FILHO, KOZLOWSKY-SUZUKI e AZEVEDO, 2002). Constituem uma família de toxinas que têm recebido atenção considerável, devido a sua potente atividade hepatotóxica (HUMBLE, GADD e CODD, 1997). Essa forte toxicidade implica graves problemas ecológicos e um risco à saúde dos seres humanos e animais (VELA *et al.*, 2008).

As MCs são de particular preocupação, uma vez que casos agudos de intoxicação por essas toxinas podem causar morte rápida em humanos e outros animais (JOCHIMSEN *et al.*, 1998). Elas têm causado mortalidade em animais domésticos e selvagens, doenças em seres humanos (CARMICHAEL, 1994; CARMICHAEL e FALCONER, 1993), e quando expostos por meio de hemodiálise, até mesmo a morte (JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Tem sido relatado que as MCs são as toxinas específicas do fígado em condições *in vitro* e *in vivo* (MIRURA *et al.*, 1989; PACE *et al.*, 1991). Essas toxinas agem por inibição das proteínas fosfatases 1 (PP1A) e 2A (PP2A), o que leva a fosforilação de proteínas (MACKINTOSH *et al.*, 1990; CARMICHAEL, 1994). As consequências são a lesão do citoesqueleto, necrose hepática e hemorragia no fígado (HOOSER *et al.*, 1989; CARMICHAEL, 1994). Mais importante, as MCs são potentes promotoras de tumor no fígado (NISHIWAKI-MATSUSHIMA, 1992) e há uma indicação de que elas também podem agir como iniciadores do tumor (ITO *et al.*, 1997).

A revelação de que hepatotoxinas de cianobactérias causam a inibição de proteínas fosfatases levantou a possibilidade inquietante de que a exposição humana a doses não letais desses compostos podem contribuir para o desenvolvimento do câncer (YOSHIAWA *et al.*, 1990; NISHIWAKI *et al.*, 1991). Vários estudos laboratoriais indicaram que a exposição crônica à microcistina pode realmente promover tumores na pele e fígado de ratos e camundongos (FALCONER, 1991; NISHIWAKI-MATSUSHIMA, 1992). Dados epidemiológicos sugerem que os mesmos efeitos a longo prazo, podem ocasionar carcinoma hepatocelular em seres humanos (YU, 1995; YU, 1989).

Assim, as MCs são um grupo de toxinas melhor conhecido e mais extensivamente estudado (FALCONER, 1999; FASTNER *et al.*, 1999). As MCs compõem o maior grupo de toxinas de cianobactérias e o mais diverso estruturalmente. Há cerca de 90 isoformas de MCs identificadas (SIVONEN e JONES, 1999; WELKER e VON DOHREN, 2006), as quais compartilham a mesma estrutura, ciclo (D-Alanina-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-Glu-Mdha), onde X e Y são os L-aminoácidos variáveis, MeAsp é o ácido metilaspártico, Glu é o ácido glutâmico, Adda e Mdha são os aminoácidos incomuns (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico) e N-metildehidroalanina, respectivamente. As MCs são nomeadas de acordo

com os L-aminoácidos variáveis que elas contêm, formando uma série de variantes da molécula. A mais comum, mais tóxica e, conseqüentemente, mais amplamente estudada é a MC-LR que apresenta os L-aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições variáveis (LAWTON e ROBERTSON, 1999). Conseqüentemente, esforços significativos de investigação têm sido dirigidos para a identificação e erradicação das MCs em águas naturais, principalmente, a MC-LR, objeto de estudo desse trabalho.

2.1.1.1.1 Microcistina-LR

A MC-LR, com estrutura química cíclica (D-Alanina-L-Leucina-D-MeAsp-L-Arginina-Adda-D-Glu-Mdha), Figura 2.1, é uma hepatotoxina produzida principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa*, mas também pelas *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii* e *Nostoc sp* (SHORT e EDWARDS, 1990; HARADA e TSUJI, 1998).

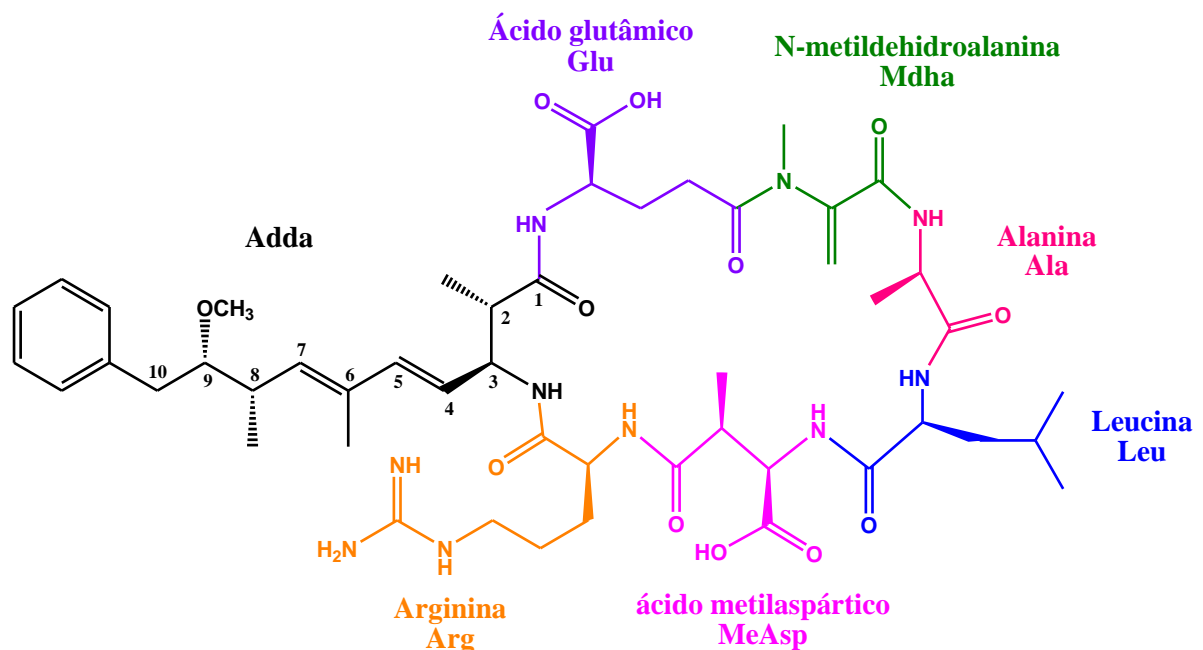


Figura 2.1. Estrutura molecular da MC-LR.

Essa hepatotoxina é altamente solúvel em água (HARADA e TSUJI, 1998), é a toxina peptídica mais investigada, pois está frequentemente presente em florações de cianobactérias e é a mais tóxica das MCs (CÂMPAS *et al.*, 2007). Essas florações ocorrem em rios, lagos, lagoas e reservatórios no mundo inteiro e estão associadas a estagnação de água, temperatura e eutrofização das águas (SHORT e EDWARDS, 1990; DAWSON, 1998; HARADA e TSUJI, 1998; WATANABE *et al.*, 1992). Causas antropogênicas do aumento da concentração de nutrientes na água incluem os esgotos, poluição industrial, utilização de detergentes e escoamento de fertilizantes e resíduos animais (DAWSON, 1998).

A MC-LR é liberada quando as cianobactérias morrem ou são destruídas. As pessoas são expostas a essas toxinas com mais frequência através da ingestão de água potável ou durante atividades de lazer, quando a água é ingerida (GROSSE *et al.*, 2006).

A toxicidade da MC-LR tem como órgão alvo o fígado, devido à presença do sistema de transporte de ácidos biliares. A MC-LR liga-se e inibe as fosfatases protéicas serina/treonina tipos 1A e 2A, que estão presentes em todos os tecidos de mamíferos. A carbonila alfa, beta-insaturadas do resíduo Mdha da microcistina liga-se covalentemente a cisteína-273 da fosfatase tipo 1A. A inibição da fosfatase é mediada pela cadeia lateral Adda e o grupo carboxila glutamil (BISCHOFF, 2001).

A hiperfosforilação que ocorre na intoxicação por microcistina devido à inibição de proteínas fosfatases causa desmontagem de proteínas do citoesqueleto, incluindo os filamentos intermediários, especialmente citoqueratinas 8, 9 e 13 de microfilamentos de actina e microtúbulos. Danos no citoesqueleto levam a bolhas e arredondamento dos hepatócitos. Os danos estruturais nos hepatócitos e a consequente perda de adesão célula-célula provoca danos à estrutura hepática e colapso das sinusóides hepáticas. O fígado torna-se cheio de sangue. Na intoxicação

aguda por microcistina, a morte é devido ao choque hemorrágico (BISCHOFF, 2001).

O fígado também é o órgão alvo para a promoção de tumor pelos efeitos da MC-LR. A inibição das PP1A e PP2A é uma via de promoção de tumor. A formação de tumores está provavelmente associada com as mudanças morfológicas nos hepatócitos, devido à hiperfosforilação de citoqueratinas e de outras proteínas estruturais (BISCHOFF, 2001).

Recentemente, um estudo relatou que a MC-LR é capaz de induzir citotoxicidade nas células renais, apoiando a idéia de que outros órgãos, além do fígado, também podem ser afetados por essa toxina (ALVERCA *et al.*, 2009).

Os efeitos da toxicidade das MCs em humanos são diversos, entre eles estão: gastroenterites, náuseas, vômitos, febre, sintomas de gripe, dor de garganta, irritação nos ouvidos e olhos, erupções, mialgias, dores abdominais incluindo dores causadas por hepatomegalia, consolidação pulmonar, distúrbios visuais, cianose, danos hepáticos e hemorragias internas, convulsões e até morte (COOD, 2000; DUY *et al.*, 2000).

Embora a MC-LR cause grave hepatotoxicidade em mamíferos (HOOSER *et al.*, 1989; RAO *et al.*, 1995; BHATTACHARYA *et al.*, 1996), a sua genotoxicidade e carcinogenicidade são inconclusivas. Ding *et al.* (1999) relataram que extratos de cianobactérias derivados de *Microcystins* induziram significativamente mutações genéticas, independentemente de ativação metabólica, embora a MC-LR pura, não. Tsuji *et al.* (1995) e Tsuji *et al.* (1997) também não conseguiram demonstrar a genotoxicidade da MC-LR. Por outro lado, a MC-LR tem alguns efeitos genotóxicos em células mamíferas. Ding *et al.* (1999) observaram danos no DNA dos hepatócitos primários de ratos e Rao e Bhattacharya (1996) descobriram que a MC-LR poderia induzir fragmentação do DNA e quebras de fitas do DNA no fígado de rato *in vivo*. Dois estudos relataram a indução de aberrações cromossômicas e mutações genéticas em células de mamíferos

(SUZUKI *et al.*, 1998; REPAVICH *et al.*, 1990). Assim, segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer, essa toxina é classificada como, possivelmente, carcinogênica para humanos (IARC, 2006).

Vários estudos têm sido desenvolvidos na intenção de investigar a ação danosa dessa toxina ao DNA (GAUDIN, *et al.*, 2008; MAATOUKA *et al.*, 2004; ZEGURA, SEDMAK e FILIPIC, 2003).

Relatos têm mostrado o aumento da incidência de câncer de fígado em humanos (UENO *et al.*, 1996) e envenenamentos de animais (HALDEREN *et al.*, 1995) em diferentes países, quando as pessoas ou o gado haviam consumido água contaminada com MCs.

No Brasil, ocorreram dois casos graves de envenenamentos atribuídos a cianobactéria. No primeiro caso, uma floração de *Anabaena* e *Microcystins* ocorrida na Represa de Itaparica-BA foi responsável por 2000 gastroenterites, resultando em 88 mortes, a maioria de crianças (TEIXEIRA *et al.*, 1993). O segundo caso ocorreu no Instituto de Doenças Renais em Caruaru-PE, em 1996, causando a morte de 55 pacientes por intoxicação hepática devido à contaminação da água utilizada para hemodiálise com microcistina (JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Em algumas regiões do país, a situação é bastante alarmante, pois vários reservatórios e açudes utilizados para o abastecimento público apresentam freqüentes florações de algas tóxicas (MAGALHÃES, SOARES e AZEVEDO, 2001).

A alta toxicidade das cianotoxinas gera impacto sobre os aspectos ambiental, social e econômico da sociedade moderna (ANTONIOU *et al.*, 2008a). Devido ao forte efeito tóxico e a grande presença dessas cianobactérias em águas naturais, as MCs continuam representando um risco à saúde dos seres humanos através da água potável (MERILUOTO, 1997). Diante disso, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu o valor limite para MC-LR total em água potável como sendo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 1998).

Essas toxinas peptídicas podem sofrer degradação em água, elas decompõem-se rapidamente quando expostas a pigmentos de cianobactérias e devido à degradação bacteriana, dentre outras causas (DAWSON, 1998; HARADA e TSUJI, 1998; WATANABE *et al.*, 1992). Diluição e adsorção também contribuem para a detoxificação da MC-LR *in natura* (HARADA e TSUJI, 1998). A degradação total das microcistinas é dependente da sua concentração inicial, dos microorganismos presentes, da temperatura da água, do pH e das disponibilidades de outras fontes de carbono orgânico (ROBERTSON, LAWTON e CORNISH, 1999; PARK *et al.*, 2001). Assim, vários estudos têm sido citados na literatura sobre a degradação da MC-LR, como meios de investigação e inativação dessa toxina (ANTONIOU *et al.*, 2008a; ANTONIOU *et al.*, 2008b; DAVID *et al.*, 1996; MOMANI, SMITH e EL-DIN, 2008).

Uma vez que, a MC-LR constitui uma ameaça considerável para a saúde humana, torna-se de fundamental importância a aplicação de técnicas analíticas precisas e sensíveis para a sua investigação e monitoramento.

2.2 Métodos analíticos aplicados à análise de MC-LR

Dois métodos são geralmente empregados na análise de hepatotoxinas de cianobactérias: ensaios bioquímicos/biológicos e métodos físico-químicos (métodos analíticos) (MSAGATI, SIAME e SHUSHU, 2006).

Dentre os métodos bioquímicos/biológicos utilizados na detecção e identificação da MC-LR, os mais comuns são: ensaios *in vivo* e ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (SHENG, HE e SHI, 2007; LONG *et al.*, 2009).

Os métodos analíticos comumente utilizados na detecção, caracterização e/ou determinação da MC-LR, bem como na análise de seus produtos de degradação em água e na sua investigação com DNA,

constam a cromatografia líquida (CL) (ANTONIOU *et al.*, 2008a; ANTONIOU *et al.*, 2008b; SONG *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2005; MOMANI, SMITH e EL-DIN, 2008; DAVID *et al.*, 1996; SANCHES *et al.*, 2007; VELA *et al.*, 2008; DAI *et al.*, 2008; PYO *et al.*, 2005; SENGPRACHA, SUVANNACHAI e PHUTDHAWONG, 2006), cromatografia gasosa (CG) (TANAKA *et al.*, 1993; TSUJI *et al.*, 2001), eletroforese (E) (ZEGURA, SEDMAK e FILIPIC, 2003; GAUDIN *et al.*, 2008; BATEMAN *et al.*, 1995; GÁBOR *et al.*, 2006), ressonância magnética nuclear (RMN) (HARADA *et al.*, 1990; SANO *et al.*, 2005) e microscopia de força atômica (MFA) (ETCHEGARAY, BUENO e TESCHKE, 2010). No entanto, o método convencional de análise e detecção da MC-LR é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa com detecção UV-Vis em 238 nm (MERILUOTO *et al.*, 1998).

Alguns desses estudos com a MC-LR são mencionados abaixo:

- Bourne *et al.* (1996) ao investigarem a ação de enzimas hidrolíticas das *Sphingomonas* na degradação da MC-LR encontraram, identificaram e quantificaram dois produtos intermediários de degradação, utilizando CL com espectrometria de massa;
- Al Momani *et al.* (2005) verificaram a degradação eficaz da MC-LR e MC-RR em solução aquosa por processos oxidativos avançados (POA's) baseados em ozônio (O_3/H_2O_2 , $O_3/Fe(II)$), e tratamento Fenton), utilizando CL com detector UV-Vis;
- Song *et al.* (2006) analisaram os produtos de degradação da MC-LR e MC-RR formados durante a degradação induzida por ultrassom, utilizando CL com espectrometria de massa, e elucidaram os prováveis mecanismos de degradação dessas toxinas;
- Antoniou *et al.* (2008a, 2008b) observaram a degradação da MC-LR e identificaram estruturalmente os produtos intermediários de reação formados durante a degradação fotocatalítica da MC-LR com

- fotocatálise de TiO₂ imobilizado, utilizando CL com espectrometria de massa;
- Sengpracha, Suvannachai e Phutdhawong (2006) desenvolveram um método utilizando CLAE de fase reversa com detector UV-Vis para determinação de MC-LR em águas naturais;
 - Sanches *et al.* (2007) desenvolveram e validaram um método analítico utilizando CL com detector UV-Vis para a determinação da MC-LR em água utilizada para hemodiálise;
 - Dai *et al.* (2008) desenvolveram e validaram um método por CL com espectrometria de massa para determinação quantitativa simultânea da MC-LR e seus conjugados de glutathione (MC-LR-GSH) nos tecidos dos peixes;
 - Long *et al.* (2009) desenvolveram um método de detecção para MC-LR em amostras de água utilizando o método ELISA de fluorescência;
 - Zegura, Sedmak e Filipic (2003) investigaram a capacidade da MC-LR em induzir danos ao DNA em célula de hepatoma humano (HepG2) e os mecanismos moleculares desses danos, utilizando eletroforese de gel de célula única (teste do cometa). Foi observado que a MC-LR induziu a formação de espécies reativas de oxigênio que causaram danos ao DNA, pela quebra das cadeias da dupla hélice originada da excisão de adutos oxidativos ao DNA;
 - Vela *et al.* (2008) ao estudar em *in vitro* a interação da MC-LR com DNA utilizando CLAE, revelaram que essa hepatotoxina não apresentou afinidade por DNA nas condições experimentais testadas;
 - Gaudin *et al.* (2008) investigaram os efeitos da MC-LR sobre o DNA em vários órgãos utilizando o teste do cometa *in vivo* em camundongos e revelaram que essa toxina causou danos oxidativos

ao DNA principalmente no fígado, mas também foram relatados lesões nos rins, intestino e cólon intestinal.

Em geral, os métodos acima mencionados requerem um longo tempo nas etapas iniciais de preparação das amostras, utilizam grandes quantidades de reagentes e a instrumentação é geralmente dispendiosa, o que eleva o custo das análises. Assim, há necessidade de se disponibilizar métodos analíticos mais acessíveis e com baixos custos de manutenção e operação, proporcionando desta forma condições para o estabelecimento de métodos práticos para a análise de cianotoxinas. Uma boa alternativa para superar os inconvenientes das outras técnicas é o uso de métodos baseados em medidas eletroquímicas (SADIK e EMON, 1996).

Os métodos eletroquímicos permitem que se desenvolvam processos de medição simples, rápidos, seletivos e de baixo custo, além de demonstrarem ser um dos métodos de detecção mais sensíveis na análise de compostos orgânicos. Outra grande vantagem consiste na possibilidade de miniaturização dos eletrodos e células, assim como portabilidade do potenciostato (CÂMPAS, OLTEANU e MARTY, 2008). Todavia, até o momento, a literatura nada relata sobre um processo redox direto para a detecção e determinação de MC-LR, bem como a caracterização de seus produtos formados em água e sua interação com DNA. Assim, os métodos eletroquímicos para o estudo dessa toxina de cianobactéria em soluções aquosas têm sido menos frequentemente relatados (HUMBLE, GADD e CODD, 1997; MERILUOTO *et al.*, 1998; YAN, OZSOZ e SADIK, 2000; YAN *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2005; CÂMPAS *et al.*, 2007; CÂMPAS, OLTEANU e MARTY, 2008).

Alguns desses estudos voltamétricos da MC-LR, descritos na literatura, são relatados a seguir:

- Humble, Gadd e Codd (1997) investigaram de forma indireta as toxinas MC-LR, MC-LW e MC-LF em meio aquoso através da

complexação com cobre e zinco, utilizando palarografia de pulso diferencial;

- Meriluoto *et al.* (1998) desenvolveram um método de detecção da MC-LR através da CLAE com detector eletroquímico e relataram que nenhuma onda ou pico de oxidação pôde ser detectado por VC, indicando que uma baixa ou irreversível reação de transferência de carga tenha ocorrido. Resultados similares foram observados por Yan, Ozsoz e Sadik (2000) ao estudar a oxidação da MC-LR por VC. Em contrapartida, uma detecção indireta dessa toxina foi possível através da complexação com Hg^{2+} em eletrodo de ouro, utilizando voltametria de redissolução de pulso diferencial;
- Feng *et al.* (2005) estudaram o efeito da corrente sobre a taxa de degradação da MC-LR ao investigar a sua oxidação eletroquímica e sugeriram que a toxina pode ser decomposta completamente pela oxidação indireta durante a oxidação eletroquímica;
- Yan *et al.* (2001) desenvolveram um biossensor eletroquímico de ssDNA para detecção das espécies *Microcystis* spp. em solução usando azul de metileno e bipyridina de rutênio como indicadores eletroquímicos, utilizando VC.

2.3 Ácido desoxirribonucléico

O DNA é a molécula da hereditariedade, pois ela contém e transmite a informação genética às gerações seguintes (BRETT e SERRANO, 1995). A sua descoberta ocorreu em 1869 pelo médico suíço Johann Friedrich Miescher (CLARKE, 2003).

Essa molécula tem uma estrutura tridimensional de dupla hélice constituída por duas cadeias (fitas) polinucleotídicas, dispostas em direções opostas, enroladas em torno de um eixo comum, Figura 2.2.

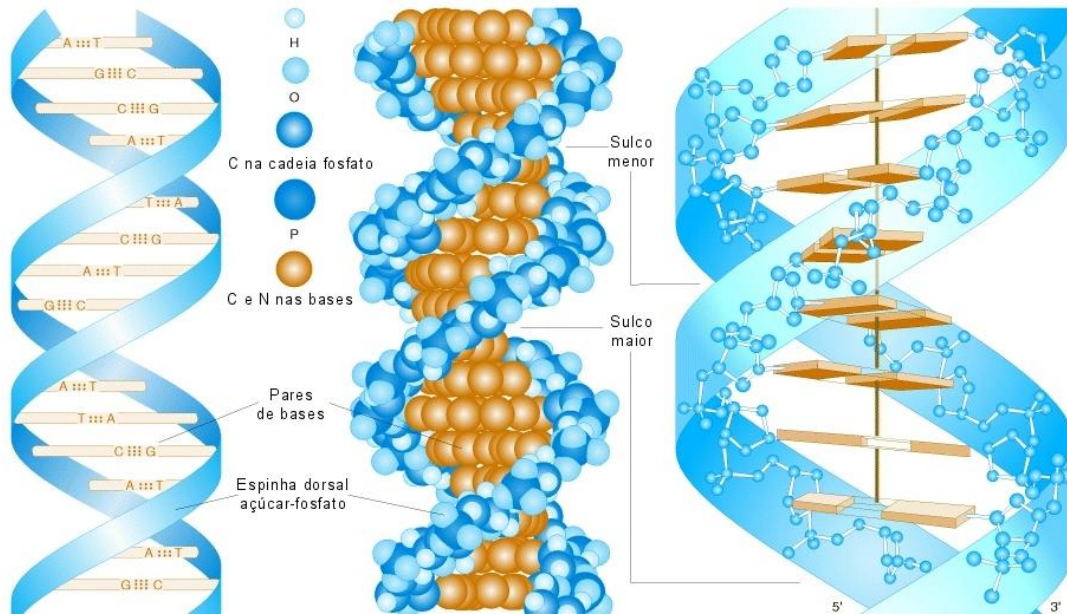


Figura 2.2. Representações da dupla hélice do DNA (Adaptado de [GRIFFITHS et al., 1999](#)).

A estrutura da cadeia é formada por grupos fosfato e pentoses, alternadamente ligados por pontes de fosfodiéster, as cadeias da dupla hélice são mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas purínicas, adenina (A) e guanina (G), e pirimidínicas, citosina (C) e timina (T), [Figura 2.3](#).

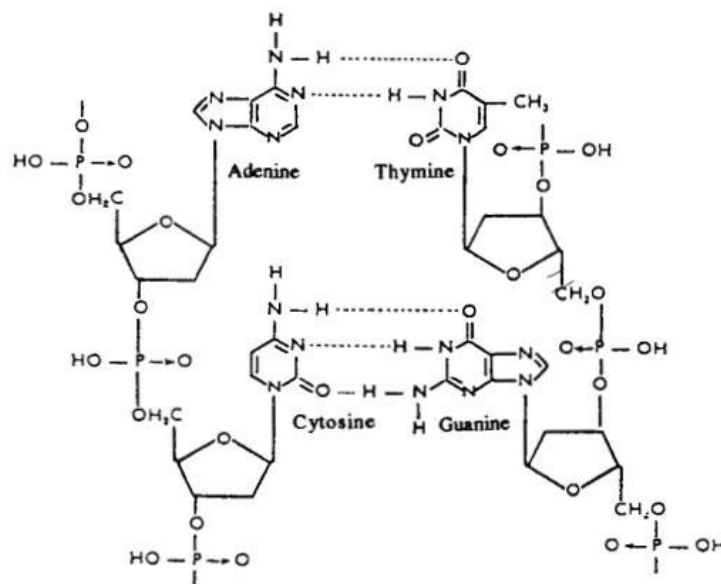


Figura 2.3. Estrutura química do DNA. Ligações de hidrogênio entre bases complementares em um fragmento de uma molécula de DNA (Fonte: [BRETT e SERRANO, 1995](#)).

Essas bases, adenina - timina e guanina - citosina, através da sua sequência e emparelhamento carregam toda a informação genética, enquanto o açúcar e o fosfato constituem apenas a espinha dorsal estrutural do DNA. Embora as duas cadeias do DNA sejam complementares, elas não são idênticas e são anti-paralelas. No entanto, as bases de purina e pirimidina estão no interior da hélice e os planos das bases são perpendiculares ao eixo da hélice (BRETT e SERRANO, 1995).

2.3.1 Danos ao DNA

O termo "dano ao DNA" refere-se a qualquer alteração na estrutura química do material genético resultante de interações com agentes físicos ou químicos externos (FOJTA, 2005). Esse dano também ocorre devido a ataques ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas *in vivo* (OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004b).

Os principais tipos de danos ao DNA incluem interrupções no esqueleto açúcar-fosfato (quebras de fita), liberação de bases devido à hidrólise de ligações N-glicosil (depurinação e depirimidação) e uma variedade de lesões nas bases (adutos), resultantes de reações de DNA com uma ampla variedade de oxidantes, agentes alquilantes, etc.

Os danos ao DNA podem afetar as funções celulares cruciais e podem, quando não reparados, dar origem a mutações, ou seja, modificações permanentes na estrutura do DNA que produzem falhas de informação genética durante a replicação do mesmo (LABUDA *et al.*, 2010).

Os danos ao DNA podem ser provocados diretamente através da sua interação com várias moléculas. Existem três tipos principais de interação entre as moléculas em geral e o DNA: atração eletrostática, ligação covalente de uma molécula em qualquer um dos sulcos do DNA e intercalação dos anéis aromáticos de uma molécula entre os pares de base do DNA. Enquanto os dois primeiros tipos de interação não

modificam a estrutura do DNA, a intercalação poderá induzir torções no esqueleto fosfato-açúcar de modo que os pares de bases adjacentes sejam separados. Os agentes que podem danificar o DNA podem atuar diretamente ou necessitar de ativação metabólica (POIRIER, WESTON e JOSEPH, 2002).

Acredita-se que a modificação do DNA (lesão do DNA) leva à carcinogênese (OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004a). Muitas das doenças hereditárias, que apresentam consequências letais, mutagênicas ou carcinogênicas, são oriundas de algum dano irreversível ao DNA (SÉQUARIS e VALENTA, 1987). O processo de carcinogênese é compreendido como decorrente de múltiplas mutações em genes críticos, e o risco de câncer é reduzido quando o dano potencialmente mutagênico é removido pelo processo de reparação do DNA (POIRIER, WESTON e JOSEPH, 2002).

Esses danos ocorrem principalmente nas bases purínicas e com maior frequência nos resíduos de guanina. A guanina é de todas as bases a mais facilmente oxidável, sendo por isso o alvo principal dos danos causados por oxidação do DNA dentro da célula, quer por agentes endógenos como as espécies reativas de oxigênio resultantes do metabolismo, quer por agentes exógenos como alguns antibióticos, cátions metálicos e fármacos com ação antineoplásica (HALLIWELL e GUTTERIDG, 1999).

O principal produto da oxidação da guanina é a 8-oxoguanina (8-oxoG). A formação de 8-oxoG no interior da dupla hélice de DNA origina mutações pontuais significativas, uma vez que, caso o dano não seja reparado por uma das enzimas reparadoras específicas, ocorre a incorporação errada de desoxiadenosina em vez de desoxicitidina no lado oposto ao dano oxidativo durante a replicação do material genético (HALLIWELL e GUTTERIDG, 1999; SHIBUTANI, TAKESHITA e GROLLMAN, 1991).

A modificação química de cada uma das bases do DNA provoca perturbação molecular para o material genético, levando à disfunção e, conseqüentemente, morte celular. Por exemplo, dano oxidativo no DNA por radicais livres e exposição à radiação ionizante gera dentro da dupla hélice, além da 8-oxo-G, outros produtos mutagênicos tais como, 2,8-oxoadenina, 5-formiluracil, 5-hidroxicitosina e 5,6-dihidroxitimina (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004). Esses produtos são considerados biomarcadores importantes dos danos oxidativos ao DNA, todos esses danos causam quebra nas fitas tanto do DNA de cadeia simples (ssDNA) como do DNA de cadeia dupla (dsDNA) e são letais para as células (PIEDADE *et al.*, 2006). Diante disso, foi estabelecido que a oxidação do DNA é uma importante fonte de instabilidade genômica, já que há evidências de que os produtos de oxidação das bases do DNA desempenham papéis importantes na mutagênese, carcinogênese, envelhecimento e doenças relacionadas à idade (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004).

A reatividade do DNA e os danos ao DNA são importantes do ponto de vista químico tanto quanto médico (OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004a). Assim, torna-se evidente a importância em desenvolver tecnologias e metodologias para efetuar análises de investigação da interação do DNA com diferentes moléculas e dos seus danos. A necessidade de utilização de ferramentas analíticas capazes de investigar esses danos causados no DNA de uma forma simples e menos dispendiosa tem impulsionado o desenvolvimento de diversos sensores eletroquímicos à base de DNA.

2.3.2 Eletroquímica do DNA

2.3.2.1 Propriedades eletroquímicas do DNA

A eletroquímica dos ácidos nucleicos foi descoberta há aproximadamente 40 anos. Durante os 15 primeiros anos a eletroquímica trouxe as primeiras evidências do polimorfismo da dupla hélice do DNA (PALECEK, 2002).

O DNA ao ser estudado eletroquimicamente sobre eletrodo de carbono vítreo apresentou dois picos de oxidação, Figura 2.4, os quais podem ser usados como sondas individuais dos pares de bases guanina-citosina e adenina-timina na dupla hélice do DNA (BRETT, SERRANO e PIEDADE, 1999; BRETT, 2005).

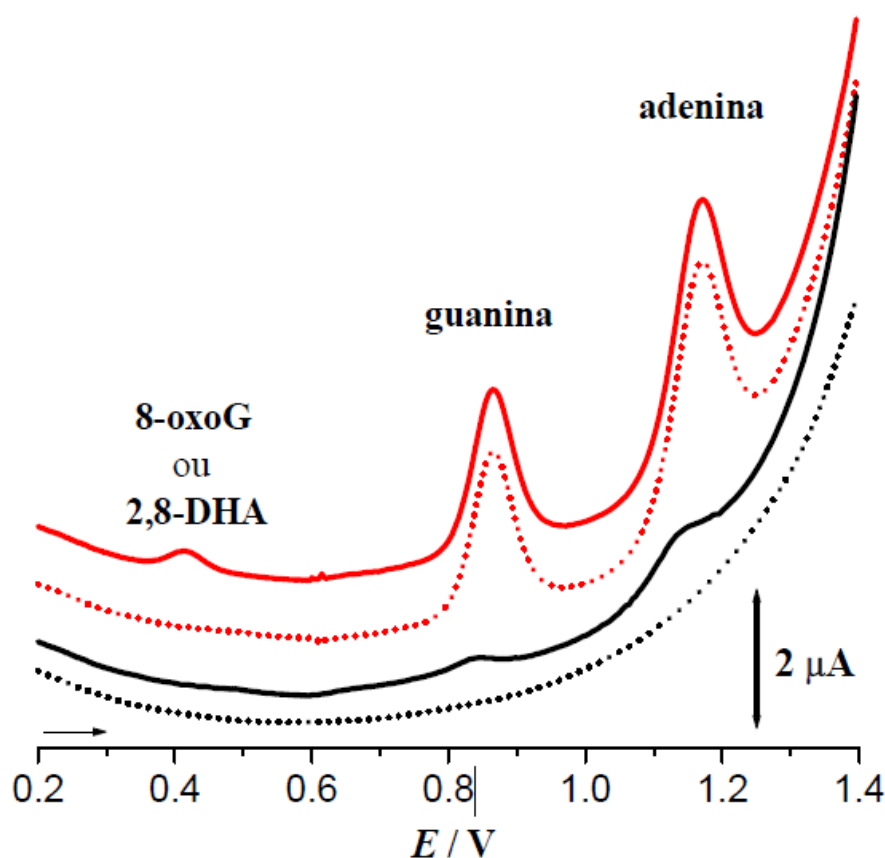


Figura 2.4. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 com: $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de ssDNA (---) 1ª e (—) 10ª varredura, e $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de dsDNA (---) 1ª e (—) 40ª varredura de potencial (Fonte: DICULESCU, 2004).

O primeiro pico em $E_{pa}^1 \approx + 0,85$ V está associado à oxidação de resíduos de guanina, enquanto que o segundo pico em $E_{pa}^2 \approx + 1,15$ V é devido à oxidação de resíduos de adenina, [Figura 2.4](#). Uma diferença nos sinais analíticos registrados para o DNA evidenciaram uma maior dificuldade da transferência de carga dos grupos adenina e guanina, que se encontram no interior da dupla hélice do *dsDNA* (forma mais rígida), em comparação com os sinais obtidos para o *ssDNA* (forma mais flexível), onde os resíduos de guanina e adenina se encontram nas proximidades da superfície do eletrodo ([BRETT, SERRANO e PIEDADE, 1999](#); [BRETT e SERRANO, 1994](#)).

Conforme já mencionado, como consequência da lesão oxidativa do DNA, a 8-oxoGua (base mais frequentemente alterada no DNA) é formada pela oxidação da guanina na posição C8 ([BRETT, PIEDADE e SERRANO, 2000](#)). No entanto, já foi sugerido que outras lesões podem ser tão importantes quanto a 8-oxoGua ([KAMIYA, 2003](#)). A oxidação da base adenina leva à formação de 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA), o principal produto de oxidação da adenina ([GOYAL, KUMAR e MITTAL, 1991](#)).

Por VPD, foi possível identificar a presença da 8-oxoG ([BRETT, PIEDADE e SERRANO, 2000](#)) e/ou 2,8-DHA ([DICULESCU, PIEDADE e BRETT, 2007](#)) no DNA, [Figura 2.4](#), após a sua oxidação prolongada. Isto indica que é possível detectar simultaneamente em um único ensaio voltamétrico se o DNA se encontra em cadeia simples ou dupla e se sofreu danos oxidativos. Em consequência, o estudo da eletroxidação do DNA sobre eletrodos de carbono está baseado no monitoramento de variações nas correntes das bases purínicas ou na detecção dos seus produtos de oxidação principais, 8-oxoGua ([BRETT, PIEDADE e SERRANO, 2000](#)) e/ou 2,8-DHA ([BRETT, SERRANO e PIEDADE, 1999](#); [DICULESCU, PIEDADE e BRETT, 2007](#)), indicadores biológicos de danos oxidativos ao DNA ([GRIFFITHS *et al.*, 1999](#); [BRETT, SERRANO e PIEDADE, 1999](#)).

O fato dos ácidos nucléicos poderem sofrer reações de oxidação e serem facilmente observados por técnicas eletroquímicas torna possível a determinação da interação do DNA e dos seus danos oxidativos provocados por vários tipos de agentes endógenos e exógenos (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2006).

O uso de técnicas eletroquímicas em conjunto com novos materiais de eletrodo, como por exemplo, carbono vítreo, pasta de carbono ou grafite pirolítico possibilitou o desenvolvimento de novos métodos voltamétricos com maior sensibilidade, assim como o desenvolvimento dos biossensores de DNA. Esses tipos de eletrodos modificados permitem o estudo do mecanismo de interação do DNA com metais, fármacos e poluentes, e conseqüentemente, uma vasta gama de aplicações analíticas e biotecnológicas podem ser desenvolvidas.

2.3.2.1 Biossensores eletroquímicos de DNA

O DNA é uma molécula extremamente estável e com uma adaptabilidade elevada, sendo uma molécula de reconhecimento biológico para a construção de dispositivos em nanotecnologia, tais como os biossensores de DNA (SEEMAN, 1998; FOJTA, 2002).

O biossensor eletroquímico de DNA é um bom modelo para avaliar os danos causados no ácido nucléico, bem como verificar o seu mecanismo de ação. Assim, a detecção eletroquímica é um método sensível e seletivo para a investigação de interações específicas entre DNA e variados tipos de compostos.

Quando as moléculas de DNA nativo ou sintético interagem com a superfície de um eletrodo ocorre um processo de adsorção (BRETT, *et al.*, 2007; PALECEK, 2002). O estudo da adsorção do DNA na superfície dos eletrodos é de interesse fundamental, uma vez que a interação do DNA com superfícies carregadas ocorre em sistemas biológicos.

O biossensor eletroquímico de DNA consiste em um transdutor eletroquímico (o eletrodo) com um filme de ácido nucléico, como elemento de reconhecimento biológico, imobilizado na sua superfície (a sonda) (BRETT e CHIORCEA, 2003a), que permite detectar simultaneamente os danos no DNA e os agentes causadores desses danos. A interação do DNA com o agente prejudicial é convertida, através de mudanças nas propriedades eletroquímicas do filme de DNA, em sinais elétricos mensuráveis (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2006).

Geralmente, existem dois modos de ligação bem caracterizados para pequenas moléculas com dsDNA: ligação covalente (modificação química de vários componentes do DNA) e não-covalente (ligação eletrostática externa ou intercalação) (LABUDA *et al.*, 2010).

A interação do composto com DNA pode ser irreversível, por causa de intercalação no DNA (BRETT *et al.*, 1997), causando desestabilização subsequente, quebra das ligações de hidrogênio e abertura da dupla hélice. Isto levará à exposição das bases purínicas do DNA, guanina e adenina. A quantificação desse processo permite a avaliação de danos no DNA (BRETT, BRETT e SERRANO, 1994).

O primeiro e o mais importante passo na preparação de biossensores de DNA consiste na imobilização e estabilização de moléculas de DNA na superfície do eletrodo. As diferentes estruturas e conformações que as moléculas de DNA podem assumir na superfície do eletrodo levam à diferentes tipos de interação e à modificação da acessibilidade dos compostos químicos aos sulcos do DNA (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2006).

As características do filme de DNA, a resposta eletroquímica ótima do biossensor de DNA, assim como uma investigação satisfatória da sua interação com várias moléculas dependem do pH, composição do tampão, força iônica, procedimento de imobilização, tempo de adsorção, condições de pré-tratamento e concentração do DNA (BRETT e CHIORCEA, 2003b).

Estudos realizados por microscopia de força atômica mostraram claramente as características morfológicas da superfície dos biossensores eletroquímicos de DNA, cujo substrato utilizado foi o HOPG (do inglês *High Oriented Pyrolytic Graphite*) (BRETT e CHIORCEA, 2003a; BRETT *et al.*, 2005; BRETT e CHIORCEA, 2003b; CHIORCEA e BRETT, 2004). Assim, na superfície do eletrodo de HOPG foi possível verificar as alterações topográficas após a modificação da sua superfície com filmes de DNA de várias espessuras, **Figura 2.5**, evidenciando que a metodologia de imobilização conduz à diferenças estruturais no filme molecular, e consequentemente, às diferenças na resposta do sensor.

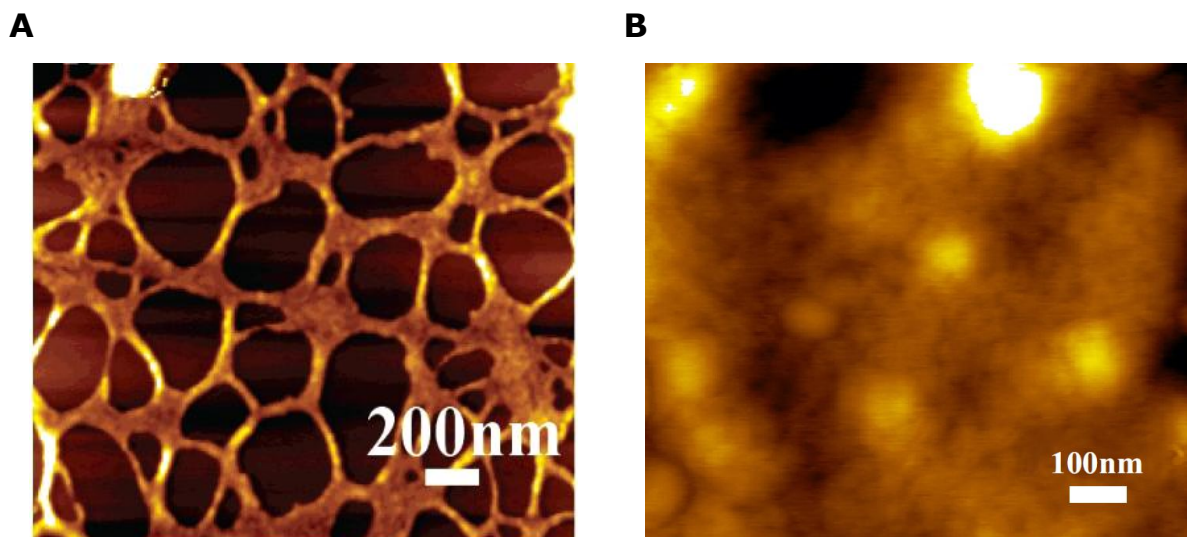


Figura 2.5. Imagens topográficas de dsDNA sobre HOPG obtidas por AFM. A) Filme fino de dsDNA obtido aplicando um $E = + 0,30$ mV (vs. fio de Ag) durante 3 min, numa solução de dsDNA $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ e B) Filme espesso de dsDNA preparado por evaporação a partir de uma solução de $37,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Adaptado de (A) BRETT e CHIORCEA, 2003a e (B) CHIORCEA e BRETT, 2004).

O filme fino de DNA adsorvido na superfície do HOPG encontra-se numa estrutura de rede, com poros que deixam à vista partes da superfície do eletrodo, enquanto que um filme espesso de DNA cobre completamente o eletrodo com uma multicamada uniforme e apresenta uma estrutura mais rugosa, **Figura 2.5**. A rede formada no eletrodo pela adsorção do filme fino de DNA separa diferentes áreas reativas da

superfície, que podem assim atuar como um sistema de micro e nanoeletrodos, no entanto, permitindo a difusão de moléculas a partir da solução e a adsorção não-específica das mesmas na superfície do eletrodo.

Para o estudo da interação de vários compostos com DNA é preciso evitar a adsorção não-específica, que conduz à dificuldade em discriminar o sinal eletroquímico proveniente do DNA modificado pela interação e o sinal da molécula adsorvida diretamente na superfície do eletrodo (BRETT *et al.*, 2002). Uma cobertura completa da superfície do eletrodo, como no caso do filme de multicamada de DNA, garante que a contribuição no sinal eletroquímico é devido apenas ao DNA modificado pela interação com a molécula de interesse.

Na construção de biossensores eletroquímicos com DNA geralmente são utilizados diferentes tipos de eletrodos de carbono, por exemplo, carbono vítreo ou pasta de carbono. Verificou-se nesses eletrodos que a interação, adsorção e o grau de cobertura da superfície por DNA são semelhantes ao HOPG. Como o DNA é um poli-ânion, a adsorção na superfície de um eletrodo é condicionada pela carga deste, ou seja, pelo potencial aplicado, Figura 2.6.



Figura 2.6. Orientação de uma dupla hélice de DNA na superfície de um eletrodo conforme o potencial aplicado (Adaptado de KELLEY *et al.*, 1998).

Verificou-se experimentalmente que o DNA adsorve reversivelmente na superfície de um eletrodo carregado positivamente e pode sofrer transições conformacionais consoante o potencial aplicado (BRETT, SERRANO e PIEDADE, 1999; BRETT, BRETT e SERRANO, 1994; KELLEY *et al.*, 1998).

Em um eletrodo de carbono vítreo sendo operado num intervalo de potencial positivo, o DNA está adsorvido de forma que o eixo maior da hélice encontra-se orientado numa posição paralela à superfície do eletrodo, [Figura 2.6](#). Os pares de bases estão orientados perpendicularmente à superfície de eletrodo, assim a espessura de uma monocamada de DNA em hélice dupla é de cerca de 2 nm (HUMPHREYS e PARSONS, 1977; IKEDA, SHIROTA e SAKURAI, 1990). A possibilidade de controlar a cobertura da superfície do eletrodo e de selecionar a orientação do DNA, através de pequenas variações no potencial aplicado, abre novas perspectivas para o desenvolvimento e aplicações de biossensores eletroquímicos com DNA.

Os biossensores eletroquímicos de DNA têm a vantagem de representar uma alternativa rápida, sensível, simples e de baixo custo na investigação de interações de moléculas com DNA. A vantagem mais importante de se utilizar biossensores eletroquímicos de DNA é a possibilidade da geração *in situ* de radicais intermediários reativos e a detecção da interação dos mesmos com o DNA. Esses biossensores têm contribuído de forma promissora para a compreensão da interação do DNA com inúmeras moléculas, principalmente carcinogências, ou íons, bem como a investigação do mecanismo de ação dos danos oxidativos ao DNA.

Particularmente, os biossensores eletroquímicos de DNA são utilizados nos estudos de interação cinética entre compostos biologicamente ativos e o DNA, através de técnicas tais como VC, VPD, VOQ, entre outras (OLIVEIRA-BRETT e SERRANO, 1995; OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 1998; LA-SCALEA, SERRANO e GUTZ, 1999).

Entre os estudos mais recentes, citam-se a investigação da interação do complexo paládio-ácido lipóico com o *dsDNA* e os seus danos oxidativos sobre eletrodo de carbono vítreo, utilizando VPD (CORDUNEANU *et al.*, 2009). Ao investigar a interação do *dsDNA* imobilizado na superfície do eletrodo de carbono vítreo com a talidomida, Oliveira *et al.* (2009) observaram uma condensação da estrutura do *dsDNA* e o surgimento do pico da 8-oxoGua e/ou 2,8 DHA nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos, indicativo de danos ao *dsDNA*. Corduneanu *et al.* (2010) investigaram a interação de quelatos de paládio com poliaminas biogênicas espermina e espermidina com *dsDNA*, sobre eletrodos de carbono vítreo, e revelaram que a estrutura da dupla hélice tornou-se condensada após interagir com os compostos em estudo, utilizando VPD.

2.4 Técnicas voltamétricas

As técnicas voltamétricas encontram larga aplicação em estudos nas mais diversas áreas do conhecimento como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental, físico-química e química analítica, objetivando tanto a obtenção de informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias orgânicas e inorgânicas, quanto o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A voltametria compreende um grupo de técnicas eletroquímicas, nas quais as informações sobre o analito se baseiam na medição da corrente resultante de uma oxidação ou redução na superfície de um eletrodo indicador ou de trabalho, durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; BRETT e BRETT, 1996).

Desde sua invenção em 1922 por Jaroslav Heyrovsky, a polarografia, que é um tipo particular de voltametria, chegou a ser a

primeira técnica eletroquímica a ser utilizada em análise química e, nos anos trinta e início dos anos quarenta a única técnica automática (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; BARD e FAULKNER, 2001.; BRETT e BRETT, 1996).

Dentre as técnicas voltamétricas mais aplicadas em estudos eletroquímicos e desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, destacam-se a VC, VPD e VOQ.

2.4.1 Voltametria cíclica

A VC é uma técnica muito usada para estudos eletroquímicos iniciais, cuja principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reação, para a identificação de espécies presentes em solução e para a análise semiquantitativa de velocidades de reações (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

Nesta técnica, o potencial aplicado ao eletrodo varia de forma linear a uma velocidade de varredura constante, $v = |dE/dt|$, entre um potencial inicial (E_i) e um potencial final (E_f), previamente escolhidos, Figura 2.7A.

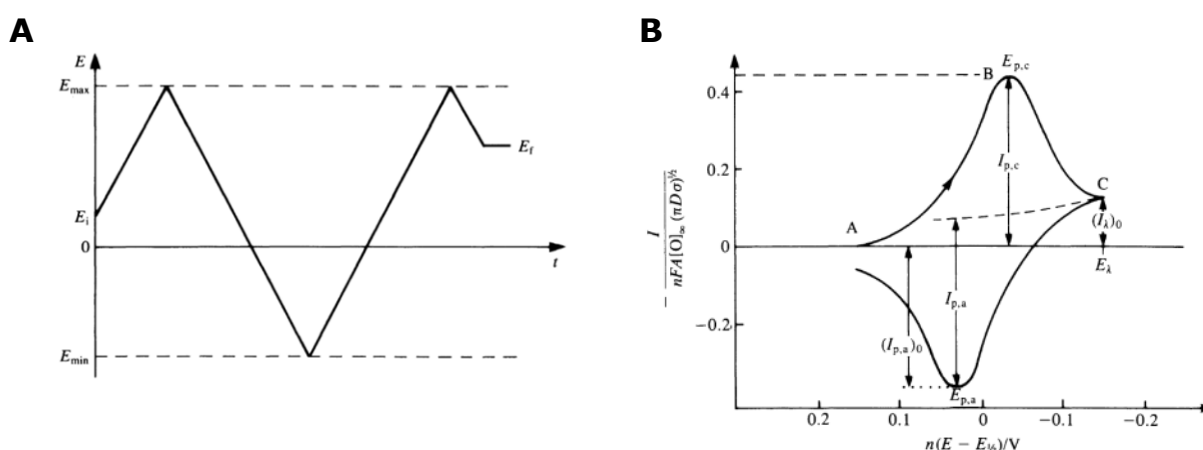


Figura 2.7. VC. (A) Esquema de aplicação de potencial. (B) Resposta típica para um sistema reversível. (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996).

Após o início da varredura de potencial e ao atingir $t = t_1$, a direção da varredura é invertida e variada até E_{min} , e depois invertida e variada

para E_{\max} , [Figura 2.7A](#), e assim sucessivamente, de uma forma cíclica. O sentido da varredura pode ser positivo ou negativo ([BRETT e BRETT, 1996](#)). Obtém-se, como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos (catódicos e anódicos), cujos parâmetros eletroquímicos mais importantes são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e o potencial de meia altura ($E_{p/2}$) ou potencial de meia onda ($E_{1/2}$), essenciais para caracterizar o processo eletródico ocorrido ([BRETT e BRETT, 1996](#); [BARD e FAULKNER, 2001](#); [SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002](#)). A [Figura 2.7B](#) ilustra a resposta típica para a VC de um sistema reversível (quando há picos direto e reverso). Para um sistema irreversível nenhum pico reverso aparece ao inverter a direção da varredura.

A dependência do potencial e da corrente de pico com a variação da velocidade de varredura, observada a partir de análise baseada em testes diagnóstico, permite obter informações importantes como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons, presença de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, além de poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico ([GREEF *et al.*, 1985](#)). Os testes diagnósticos para caracterização de cada tipo de processo redox estão descritos na [Tabela 2.1](#).

Tabela 2.1. Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis (Adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#) e [BARD e FAULKNER, 2001](#)).

Reversíveis	Irreversíveis	Quase-reversíveis
$I_p \propto v^{1/2}$	$I_{pc} \propto v^{1/2}$	I_{pc} aumenta com v
$ I_{pa}/I_{pc} = 1$	Ausência de pico reverso	$ I_{pa}/I_{pc} = 1$ se $\alpha = 0,5$
$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 57/n$ (mV)	$ dE_p/d \lg v = 29,6/(\alpha n^2)$ (mV)	$\Delta E_p = 58/n$ (mV) e aumenta com v
$ E_p - E_{p/2} = 56,6/n$ (mV)	$ E_p - E_{p/2} = 47,7/(\alpha n^2)$ (mV)	-
E_p independente de v	E_{pc} dependente de v	E_{pc} desloca negativamente com o aumento de v

2.4.2 Voltametria de pulso diferencial

A possibilidade de interfaciamento com equipamentos eletroquímicos para o controle digital da perturbação imposta ao eletrodo de trabalho, assim como da medida do sinal resultante, possibilitou o desenvolvimento das técnicas voltamétricas, em especial das técnicas de pulso que, na década de 50, começaram a substituir as técnicas polarográficas até então utilizadas (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). As técnicas de pulso são amplamente adotadas em química analítica para a determinação de espécies eletroativas devido às altas sensibilidades obtidas, particularmente na presença de correntes com ruídos de fundo, tal como aquelas que podem resultar da redução do oxigênio dissolvido. Nestas técnicas, a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/RC}$, onde t é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada elétrica, e a corrente faradáica é aproximadamente proporcional a $t^{-1/2}$, o decaimento da primeira, após a aplicação do pulso de potencial, é muito mais rápido que o da última (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Assim, as medidas de corrente somente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter sido minimizada, conforme, Figura 2.8.

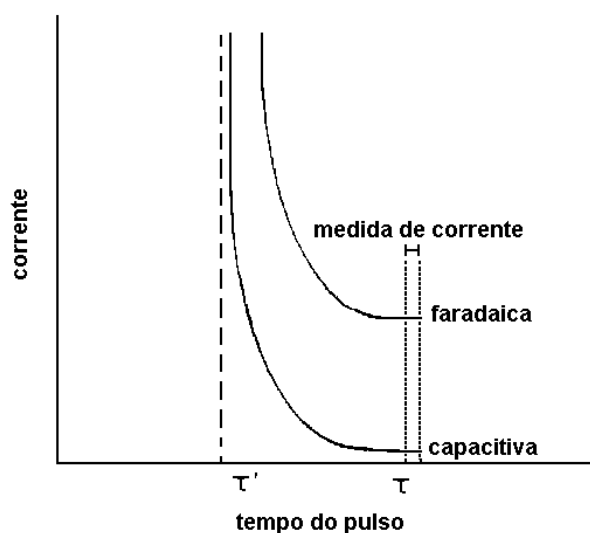


Figura 2.8. Variação da corrente faradáica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (Fonte: SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A [Figura 2.9A](#) apresenta o tipo de onda de potencial aplicado ao eletrodo de trabalho em VPD e a [Figura 2.9B](#), um voltamograma típico de pulso diferencial.

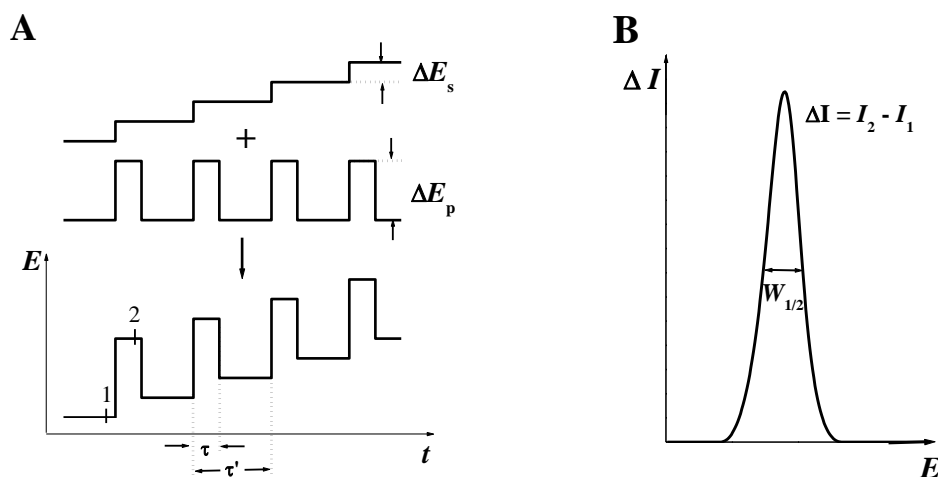


Figura 2. 9. VPD. (A) Esquema de aplicação de potenciais e (B) Resposta típica (Adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#)).

Em VPD aplicam-se pulsos de potencial sucessivos com uma amplitude ΔE_p (amplitude de pulso) em intervalos periódicos de tempo t , sobre uma rampa ou escada de potencial com incremento de ΔE_s . As medições de corrente são efetuadas em um certo tempo antes (I_1) e depois (I_2) da aplicação de pulso, [Figura 2.9A](#). A diferença entre estas correntes é o valor de corrente registrado num voltamograma de pulso diferencial, [Figura 2.9B](#).

O tempo τ durante o qual o pulso de potencial é aplicado define a largura do pulso. O tempo τ' é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de pulso, e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s a velocidade de varredura $v = \tau \Delta E_s$. Em VPD a v varia normalmente entre 1 e 10 mV s^{-1} .

A amplitude escolhida para o pulso de potencial ΔE_p , deve levar em consideração a reação em estudo e a sensibilidade exigida, uma vez que, grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem diminuir a possibilidade de detectar a corrente faradáica. Para pequenas

amplitudes de pulso, a largura a meia altura $W_{1/2}$ do pico de corrente é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($90/n$), o que permite caracterizar o mecanismo da reação de transferência de carga. A intensidade corrente de pico (I_p) é proporcional à concentração do analito, mas também depende da velocidade da reação eletroquímica (BRETT e BRETT, 1996).

2.4.3 Voltametria de onda quadrada

A VOQ foi inventada em 1952 por Barker, mas foi pouco usada nesse tempo devido a dificuldades com a eletrônica de controle. Com os progressos na instrumentação, tornou-se uma técnica analítica importante (BRETT e BRETT, 1996).

Na VOQ, o potencial aplicado é constituído por uma onda quadrada de amplitude constante (ΔE_p) sobreposta a uma escada de potencial com degraus de amplitude (ΔE_s) num período τ . Esse esquema de aplicação de potencial é representado na Figura 2.10A. Durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um pulso de potencial positivo é aplicado ao eletrodo durante a metade do ciclo a que se segue, na metade restante é aplicado um pulso de potencial negativo.

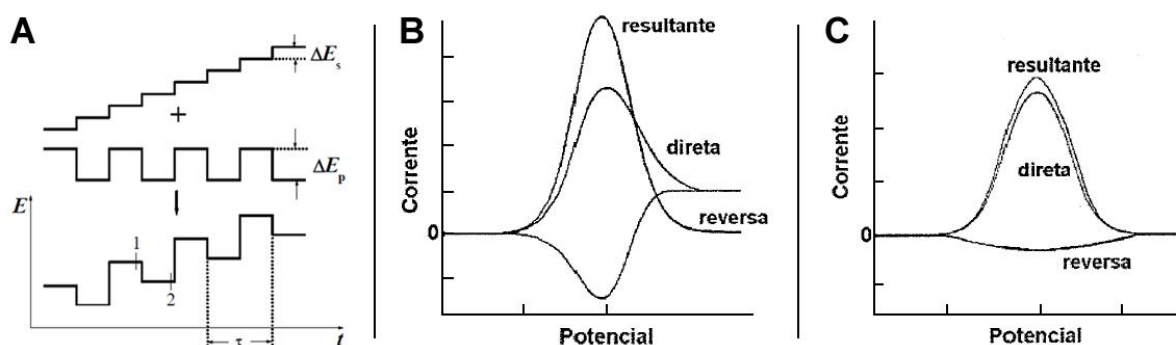


Figura 2. 10. VOQ. (A) Esquema de aplicação de potenciais; B) Resposta típica para um sistema reversível e C) para um sistema irreversível (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A corrente é medida antes do fim de ambos os pulsos, positivo e negativo, em cada ciclo (1 e 2), [Figura 2.10A](#). Nesta técnica o regime de amostragem permite obter como resposta três tipos de curvas: a corrente I_1 registrada no final do pulso de potencial direto – corrente direta (I_f – do inglês *forward current*), a corrente I_2 registrada no final do pulso reverso – corrente reversa (I_b – do inglês *backward current*) e a corrente total ou resultante (ΔI ou I_t) que corresponde à diferença entre essas duas. A corrente I_2 possui sinal contrário a I_1 . Assim, para sistemas reversíveis, $\Delta I = I_1 - I_2$ é maior do que I_1 ([O'DEA, OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1981](#); [OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1985](#); [O'DEA, RIBES e OSTERYOUNG, 1993](#)). Esse sinal de forma diferencial obtido apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas ([SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003](#)). As [Figuras 2.10B e C](#) representam os voltamogramas de onda quadrada para sistemas reversíveis e irreversíveis, com a separação das correntes direta, reversa e resultante.

Enquanto na VPD a v varia entre 1 e 10 mV s^{-1} na VOQ a mesma pode alcançar até 1 V s^{-1} . Este fato confere vantagens à VOQ como técnica analítica em termos de rapidez de análise, menor consumo de espécies eletroativas e diminuição de problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo. Outra vantagem é o fato de os resultados experimentais obtidos por esta técnica apresentarem uma sensibilidade maior, já que velocidades de varredura mais rápidas podem ser utilizadas. E além disso, como a amostragem da corrente é feita em ambos os pulsos, os picos correspondendo à oxidação ou à redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo podem ser obtidos num mesmo experimento ([BRETT e BRETT, 1996](#)).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

A MC-LR (pureza $\geq 95\%$) foi obtida da Alexis Biochemicals (Lausen/Suíça). O ácido sórbico (SA, pureza $\geq 99\%$), ácido 2-acetamidoacrílico (2-AAA, pureza $\geq 99\%$), *dsDNA* (Deoxyribonucleic acid, sodium salt from calf thymus), acetonitrila (grau HPLC), ácido fórmico e os aminoácidos L-Leucina (Leu), L-Arginina monohidroclorada (Arg), D-Alanina (Ala), Ácido L-glutâmico (Glu) e Ácido L-aspártico (Asp) foram adquiridos da Sigma. Todos os compostos foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

Para os experimentos eletroquímicos foram preparadas soluções estoque de: MC-LR ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), cada aminoácido (10 mmol L^{-1}), SA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) para VPD, SA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 mmol L^{-1}) para VPD e SA (5 mmol L^{-1}) para VC. Para o 2-AAA, soluções estoque de 1 mmol L^{-1} e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foram preparadas para os experimentos de VPD e VC, respectivamente. Todas as soluções padrão foram preparadas com água purificada obtida pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) e mantidas a 4°C , exceto as soluções padrão dos aminoácidos, até posterior utilização.

Após a realização das análises das soluções de MC-LR, SA e 2-AAA durante o dia, as soluções foram transferidas da célula eletroquímica para tubos de microcentrífuga de $0,65 \text{ mL}$ (Costar[®]) e mantidas a 4°C durante a noite, até a realização dos próximos experimentos.

A solução padrão de *dsDNA* foi preparada pela dissolução de $\approx 1,3 \text{ mg}$ do mesmo em 5 mL de água purificada em um microtubo de $1,5 \text{ mL}$ (Eppendorf[®]). A solução foi mantida a 4°C por 24 h para garantir a homogeneização e para evitar a sua degradação. Em seguida, foi determinada a concentração real dessa solução por espectrofotometria UV-Vis, através da multiplicação da absorbância encontrada

experimentalmente pelo fator de conversão ($1u A_{260nm} = 50 \mu g mL^{-1}$ de dsDNA) (FASMAN, 1975). As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão referidas no texto.

As soluções tampão de eletrólitos suporte de diferentes pH's foram preparadas com água purificada e reagentes de grau analítico, conforme a Tabela 3.1. As medidas de pH foram efetuadas utilizando um pH-metro Crison micropH 2001, Crison Instruments S.A. (Barcelona/Espanha) com um eletrodo de vidro combinado, Ingold.

Tabela 3.1. Tampões para eletrólitos suporte com diluição para 100 mL de água (Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2007).

pH	Composição (mL)	Força iônica
1,3	HCl $0,2 \mu mol L^{-1}$ (42,5) + KCl $0,2 \mu mol L^{-1}$ (25,0)	0,135
2,0	HCl $0,2 \mu mol L^{-1}$ (6,5) + KCl $0,2 \mu mol L^{-1}$ (25,0)	0,063
3,4	HAcO $0,2 \mu mol L^{-1}$ (46,3) + NaAcO $0,2 \mu mol L^{-1}$ (3,7)	0,100
4,4	HAcO $0,2 \mu mol L^{-1}$ (36,8) + NaAcO $0,2 \mu mol L^{-1}$ (13,2)	0,197
4,5	HAcO $1 \mu mol L^{-1}$ (12,5) + NaAcO $1 \mu mol L^{-1}$ (7,2)	0,100
5,3	HAcO $0,2 \mu mol L^{-1}$ (8,8) + NaAcO $0,2 \mu mol L^{-1}$ (41,2)	0,100
6,1	NaH ₂ PO ₄ $0,2 \mu mol L^{-1}$ (43,85) + Na ₂ HPO ₄ $0,2 \mu mol L^{-1}$ (6,15)	0,125
7,0	NaH ₂ PO ₄ $0,2 \mu mol L^{-1}$ (19,5) + Na ₂ HPO ₄ $0,2 \mu mol L^{-1}$ (30,5)	0,222
8,2	NaH ₂ PO ₄ $0,2 \mu mol L^{-1}$ (2,65) + Na ₂ HPO ₄ $0,2 \mu mol L^{-1}$ (47,35)	0,289
9,2	Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O $0,025 \mu mol L^{-1}$ (50,0) + NaOH $0,1 \mu mol L^{-1}$ (3,0)	0,040
10,3	Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O $0,025 \mu mol L^{-1}$ (50,0) + NaOH $0,1 \mu mol L^{-1}$ (22,7)	0,060
11,9	KCl $0,2 \mu mol L^{-1}$ (25,0) + NaOH $0,2 \mu mol L^{-1}$ (6,0)	0,062

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($25 \pm 1 ^\circ C$).

As soluções saturadas com gás nitrogênio (N₂) de elevada pureza (Air Liquide, França) foram desoxigenadas pela passagem de um fluxo constante desse gás durante 10 minutos, antes do início do ensaio voltamétrico. Durante as varreduras, um fluxo constante de N₂ foi

mantido sobre a superfície das soluções para evitar a presença de oxigênio.

3.2 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato μ Autolab Tipo II da Metrohm/Autolab, Utrecht, Holanda, funcionando no modo potenciostático, [Figura 3.1](#).

O controle dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos, foram efetuados por intermédio do *software* GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9, da Echo-Chemie, Utrecht, Holanda.

Os ensaios voltamétricos foram realizados em uma célula eletroquímica de compartimento único com capacidade volumétrica de 2 mL (Cypress System, Inc., USA). Um eletrodo de carbono vítreo (ECV, $\Phi = 1,5$ mm) foi utilizado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl ($\Phi_{\text{eixo}} = 2,0$ mm) como referência e um fio de platina ($\Phi = 0,5$ mm) como eletrodo auxiliar, todos da Cypress System, Inc., USA, [Figura 3.1](#).

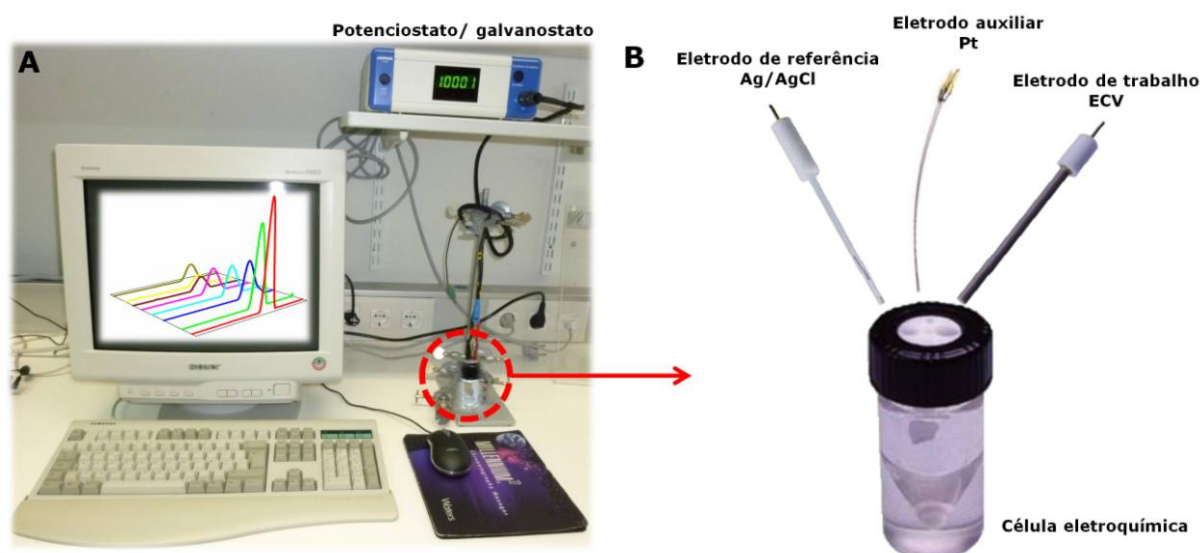


Figura 3.1. Sistema eletroquímico de trabalho: (A) Potenciostato/Galvanostato e (B) célula eletroquímica e eletrodos (Adaptado de [DICULESCU, 2004](#)).

As medidas espectrofotométricas foram efetuadas utilizando um espectrofotômetro UV-VIS SPECORD S100 da Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha, interfaciado ao *software* Aspect Plus Version 1.5 (Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha). As condições experimentais para a obtenção dos espectros de absorção foram: tempo de integração de 41 ms e acumulação de 10 pontos. Todos os espectros foram registrados numa faixa compreendida entre 200 e 500 nm em uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico.

Os experimentos cromatográficos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram realizados empregando um cromatógrafo (Separations Module HPLC da Waters 2690 Alliance™) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos - Photodiode Array Detection (PDA 996) - da Waters 996, Waters S.A. USA. Foi utilizada uma coluna C₁₈ de fase reversa Inertsil ODS-3V da Inertsil. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (35:65, v/v), com ácido fórmico 0,05% (v/v), pH ≈ 2,8, método isocrático. Uma solução de MC-LR $6,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foi preparada em tampão acetato pH 3,4, uma vez que a MC-LR também degrada-se facilmente nesse meio, e alíquotas dessa solução foram injetadas na fase móvel. A absorbância UV-Vis foi monitorada em 239 nm e o volume da amostra injetada foi de 50 µL.

3.3 Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas

Os parâmetros experimentais para as medidas eletroquímicas foram: incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV e velocidade de varredura (ν) de 100 mV s⁻¹ para VC; amplitude de pulso (ΔE_p) de 50 mV, largura de pulso (ΔE_t) de 70 ms e velocidade de varredura (ν) de 5 mV s⁻¹ para VPD; e frequência de pulso (f) de 50 Hz, incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV e amplitude de pulso (ΔE_p) de 50 mV para VOQ.

3.4 Tratamento dos dados voltamétricos

Os voltamogramas de pulso diferencial apresentados foram suavizados através da função *Savitsky-Golay smooth (level: 4)*, a fim de eliminar o ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico, e em seguida, corrigidos a linha de base através da função *moving average* com um *step window* de 2 mV, ambas disponíveis no *software* GPES versão 4.9. Esse tratamento matemático realizado nos voltamogramas melhorou a visualização e identificação dos picos em relação à linha de base sem a introdução de qualquer artefato, embora a corrente de pico em alguns casos seja reduzida (< 10%) em relação a da curva voltamétrica não tratada. Os valores das correntes de pico foram obtidos a partir dos voltamogramas originais, utilizando-se somente a correção da linha de base.

3.5 Preparação da superfície do ECV

Antes de cada medida voltamétrica a superfície do ECV foi limpa mecanicamente e, em seguida, eletroquimicamente. Na limpeza mecânica, a superfície do eletrodo foi polida com spray de grão de diamante (tamanho da partícula = 1 μm) da Kemet International Ltd, UK, e em seguida, lavada rigorosamente com água purificada. Para a limpeza eletroquímica, o eletrodo foi colocado numa solução de H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} e, em seguida, foram efetuadas 10 varreduras sucessivas por VC numa faixa de potencial entre - 1,0 V e + 1,3 V e $v = 500 \text{ mV s}^{-1}$.

O condicionamento eletroquímico da superfície do eletrodo foi efetuado, após a limpeza mecânica/eletroquímica, através do registro de vários voltamogramas no eletrólito suporte e na técnica a serem utilizados, a fim de obter uma linha de base estável.

3.6 Testes de adsorção dos compostos

Para verificar efeitos de adsorção da MC-LR, SA ou 2-AAA na superfície eletródica, foram realizados dois testes para cada um desses compostos, conforme os procedimentos descritos a seguir:

- 1 - Após efetuar várias medidas na solução de cada composto para todos os pH's, sem limpeza da superfície do ECV, o eletrodo foi lavado com um jato de água deionizada, em seguida, transferido para uma nova solução eletrolítica e registrados os voltamogramas.
- 2 - Após a imersão do ECV na solução de cada composto para todos os pH's por 10 minutos, o eletrodo foi lavado com um jato de água deionizada, em seguida, transferido para uma nova solução eletrolítica e registrados os voltamogramas.

Para investigar a adsorção dos produtos de oxidação formados na superfície do eletrodo, somente o procedimento 1 foi realizado.

3.7 Detecção dos centros eletroativos da microcistina-LR

Com o intuito de detectar os centros eletroativos da MC-LR sobre o ECV, a oxidação eletroquímica dos cinco aminoácidos comuns constituintes dessa toxina, Leu, Arg, Ala, Glu e Asp, foi inicialmente investigada.

Uma vez que os aminoácidos incomuns Mdha e Adda, presentes na MC-LR, não são oferecidos comercialmente, dois outros compostos foram também testados eletroquimicamente. Tratam-se do 2-AAA e SA, [Figura 3.2](#), os quais possuem similaridade estrutural aos grupos funcionais alvo. O 2-AAA e o SA simulam estruturalmente o aminoácido raro Mdha e a cadeia lateral Adda do anel peptídico, respectivamente ([GRETCHEN, 2007](#)).

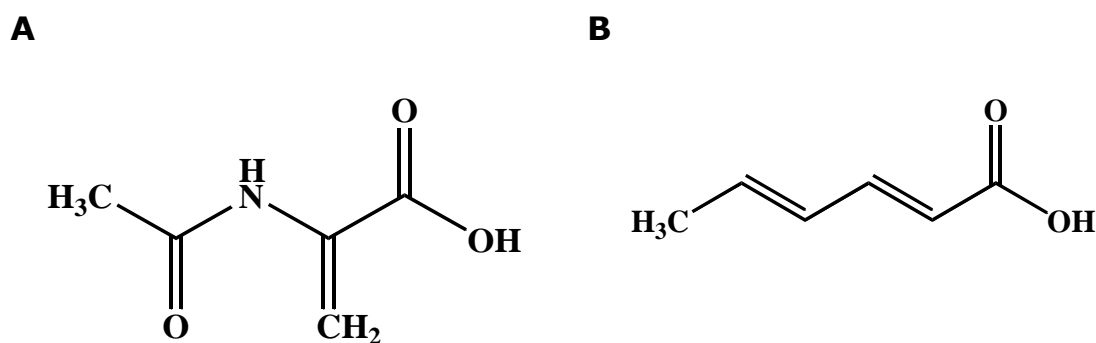


Figura 3.2. Estrutura química: (A) ácido 2-acetamidoacrílico e (B) ácido sórbico.

O procedimento de investigação voltamétrica de cada composto estudado é descrito a seguir.

3.7.1 Teste dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp

O comportamento eletroquímico dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp foi investigado em uma faixa de potencial entre 0,00 V à + 1,45 V.

Os testes foram efetuados em uma solução de cada aminoácido nas concentrações de 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em soluções tampão pH 5,3 e 7,0, utilizando DPV. Os voltamogramas foram registrados logo após a adição da solução de cada aminoácido nos tampões e após 5, 24 e 29 horas de incubação.

3.7.2 Teste dos compostos 2-AAA e SA

O comportamento eletroquímico dos compostos 2-AAA e SA foi estudado em uma ampla faixa de potencial entre 0,00 V e + 1,5 V, utilizando VC e VPD para o primeiro composto e VC, VPD e VOQ para o segundo.

Os voltamogramas do 2-AAA e SA foram registrados logo após a adição da solução de cada um desses aminoácidos nos tampões e após 24

e 48 horas de incubação para o 2-AAA e após 5, 24, 48, 96 horas, 7 e 14 dias de incubação para o SA.

3.8 Construção da curva analítica

Para obtenção da curva analítica para a MC-LR, uma solução estoque de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada. A partir dessa solução, uma alíquota foi adicionada a oito células eletroquímicas distintas contendo eletrólito suporte pH 1,3, num volume total de 100 μL . Esse procedimento foi empregado devido à rápida degradação da MC-LR nesse pH. A faixa de concentração investigada foi de 2,5 a 35 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As medidas foram realizadas por VPD e, entre cada adição, a superfície do ECV foi sempre polida a fim de garantir uma superfície limpa e evitar a adsorção dos produtos de oxidação da MC-LR.

3.8.1 Limites de detecção e quantificação

Através dos dados obtidos das medidas do branco e da curva analítica I_p vs [MC-LR] estimaram-se as figuras de mérito, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), a fim de verificar a possibilidade do desenvolvimento de uma metodologia para a determinação da MC-LR em águas naturais.

O LD é a menor concentração do analito a ser detectada e é responsável por um sinal que é igual a três vezes o nível de ruído da linha de base, não sendo necessariamente quantificado. Já o LQ consiste na menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições em que foram estabelecidos os ensaios, onde se considera que o limite do equipamento ainda não tenha sido atingido. Assim, a sensibilidade do método será avaliada pelo cálculo do LD e LQ, conforme as Equações (3.1) e (3.2), respectivamente (MOCAK *et al.*, 1997).

$$LD = \frac{3S_b}{b} \quad (3.1)$$

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad (3.2)$$

onde S_b é o desvio-padrão das medidas do branco em eletrólito puro e “ b ” a inclinação da curva analítica, ou seja, o coeficiente angular em um nível de significância de 95% de confiança.

Em uma curva analítica, o intervalo linear compreende uma faixa de concentração que se estende desde a menor concentração, a qual se pode realizar uma medida quantitativa (LQ), até a concentração na curva analítica que se desvia da linearidade (Limite de Linearidade - LL), (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002), conforme se observa na [Figura 3.3](#).

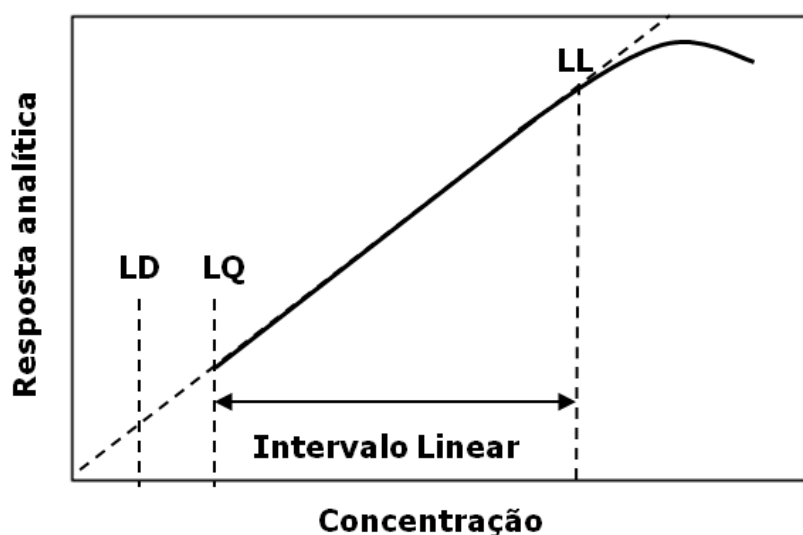


Figura 3.3. Intervalo linear de um método analítico (Adaptado de [SKOOG, 2002](#))

3.9 Condições experimentais para a investigação voltamétrica *in situ* da interação da microcistina-LR com *dsDNA*

A interação da MC-LR com o *dsDNA* foi inicialmente investigada por VPD, conforme os parâmetros experimentais mostrados na [Seção 3.3](#) e os procedimentos apresentados a seguir.

3.9.1 Preparação do biossensor eletroquímico de *dsDNA* e procedimento de incubação

Para o estudo voltamétrico inicial da interação da MC-LR com o *dsDNA*, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado pela imobilização de *dsDNA* na sua superfície, levando à construção de um biossensor eletroquímico de *dsDNA*.

A imobilização do filme multicamada de *dsDNA* na superfície do ECV, previamente limpa e condicionada em eletrólito suporte ([Seção 3.5](#)), foi obtida pela deposição de 5 μL de uma solução de *dsDNA* 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (previamente preparada em água, [Seção 3.1](#)) diluída em tampão acetato pH 4,5. Após a secagem dessa primeira camada de *dsDNA*, o mesmo procedimento foi repetido duas vezes, [Figura 3.4A](#). Esse filme multicamada de *dsDNA* preparado garante que o sinal eletroquímico obtido seja devido apenas ao *dsDNA* modificado na superfície e não pela adsorção não-específica do composto, uma vez que a superfície do eletrodo encontra-se completamente coberta com o filme de *dsDNA* ([OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004b](#)).

Após a modificação, o eletrodo foi lavado com um jato de água deionizada para remover as fitas de *dsDNA* não adsorvidas ([OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004b](#)). Em seguida, o biossensor foi incubado na solução de MC-LR, [Figura 3.4B](#). Após a incubação, o eletrodo foi lavado com água deionizada para remover as moléculas não adsorvidas e

transferido para o tampão acetato pH 4,5. Este procedimento foi utilizado para avaliar as interações de curto tempo da MC-LR com o *dsDNA*.

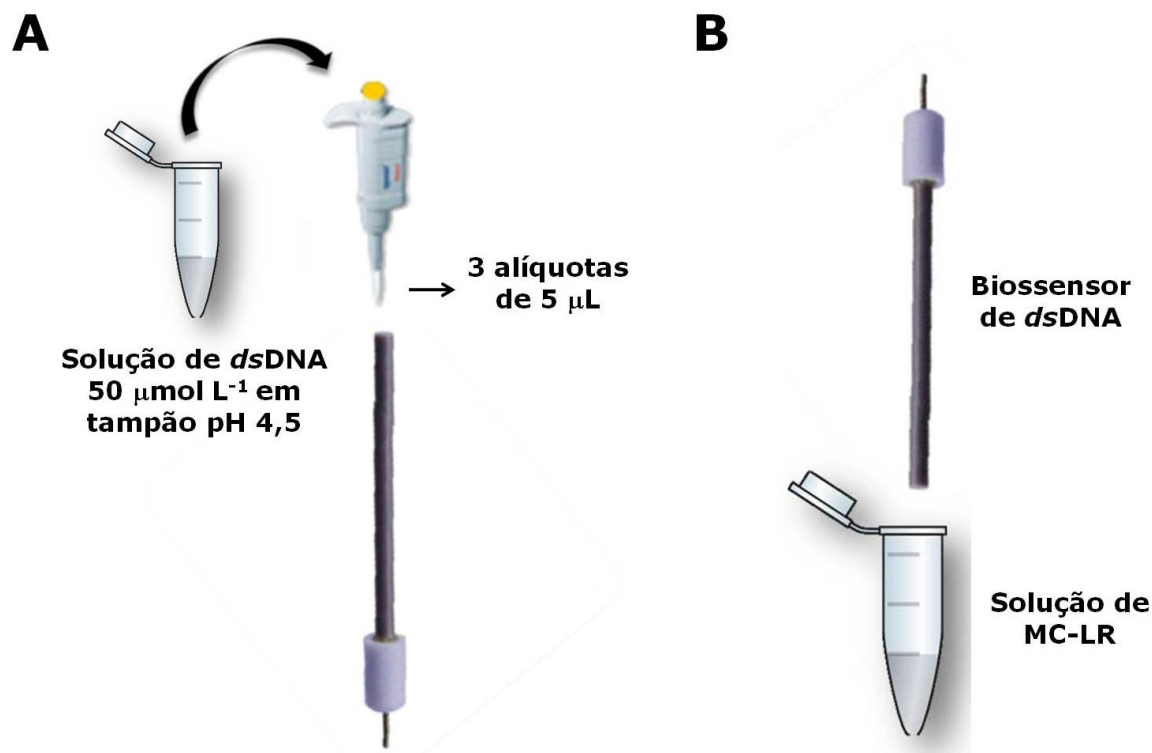


Figura 3.4. (A) Preparação do biossensor eletroquímico de *dsDNA*. (B) Incubação do biossensor de *dsDNA* na solução de MC-LR.

Em paralelo, foram realizados experimentos de controle com os biossensores de *dsDNA* seguindo as mesmas etapas acima descritas e nos mesmos tempos de incubação utilizados para o analito, porém na ausência da MC-LR.

As concentrações das soluções de MC-LR utilizadas nas incubações com os biossensores de *dsDNA* estão descritas ao longo deste trabalho, assim como os tempos de incubação estudados.

3.9.2 Preparação das soluções de *dsDNA* incubadas

Para uma avaliação direta da interação da MC-LR com o *dsDNA*, soluções de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (previamente preparada em água, Seção 3.1) foram diluídas em tampão acetato pH 4,5 e incubadas (OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004a) com a MC-LR, Figura 3.5. A sua interação foi analisada pela detecção no ECV, previamente limpo e condicionado (Seção 3.5), diretamente na solução. Esse procedimento permite investigar as interações de longos tempos de incubação.

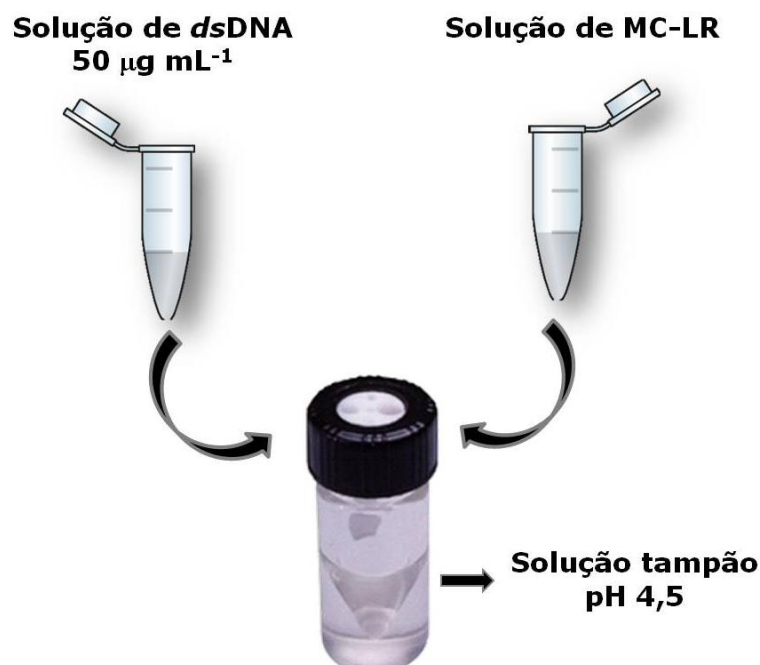


Figura 3.5. Preparação das soluções de *dsDNA* incubadas com MC-LR.

Soluções de controle de *dsDNA* foram preparadas em tampão pH 4,5, armazenadas nas mesmas condições descritas acima, porém na ausência de MC-LR, e analisadas nos mesmos períodos de tempo que as soluções incubadas com essa toxina.

As concentrações das soluções de MC-LR utilizadas nas incubações com soluções de *dsDNA* estão descritas ao longo deste trabalho, assim como os tempos de incubação estudados.

3.10 Condições experimentais para a investigação espectrofotométrica *in situ* da interação da microcistina-LR com *dsDNA*

A interação da MC-LR com o *dsDNA* foi também investigada por espectrofotometria UV-Vis, conforme os parâmetros experimentais mostrados na [Seção 3.2](#) e o procedimento descrito a seguir.

Uma solução de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (previamente preparada em água, [Seção 3.1](#)) foi diluída em tampão acetato pH 4,5 e incubada com a MC-LR ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$). A sua interação foi analisada pelo monitoramento dos espectros de absorção de *dsDNA* na ausência e presença de MC-LR.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento eletroquímico da microcistina-LR

O estudo eletroquímico da MC-LR foi realizado sobre ECV, em vários eletrólitos suporte com diferentes valores de pH, utilizando as técnicas de VC, VPD e VOQ. Inicialmente, o comportamento voltamétrico da MC-LR foi investigado por VC em uma solução recém-preparada de MC-LR $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0, saturada com gás N_2 .

Os voltamogramas foram registrados durante a varredura de potencial iniciada em + 0,00 V e entre um potencial positivo limite de + 1,40 V e um potencial negativo limite de - 1,00 V. Independentemente da direção da varredura inicial somente um pequeno pico anódico foi observado, [Figura 4.1](#), indicando que a MC-LR sofre somente oxidação na superfície do ECV. Por esta razão todos os experimentos foram realizados na faixa de potencial característica da região anódica.

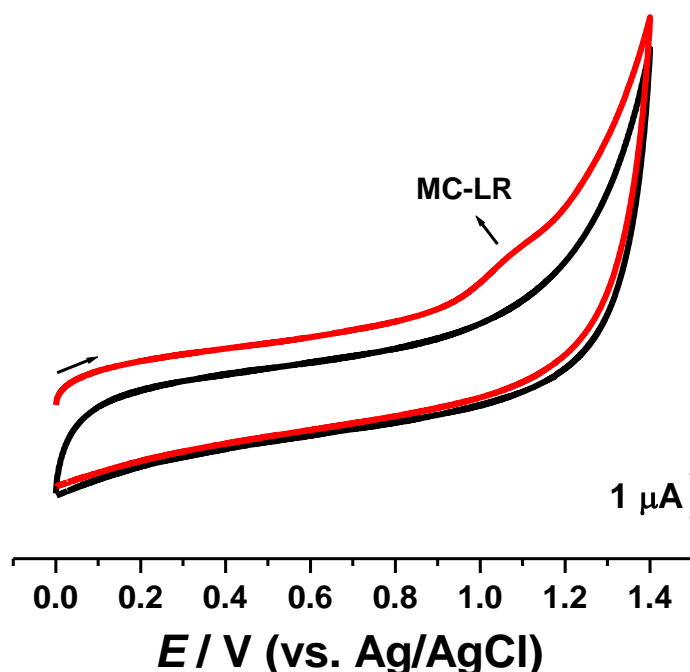


Figura 4.1. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de MC-LR $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0, na ausência (—) e presença de MC-LR (—). $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

4.1.1 Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos obtidos imediatamente após a adição da solução de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4, mostraram o pico de oxidação da MC-LR, pico 1_a , em $E_{pa}^1 = + 1,21\text{V}$, porém com a corrente de pico ligeiramente maior que a do voltamograma obtido para o pH 7,0 (Seção 4.1), Figura 4.2. Ao mudar o sentido da varredura nenhum pico catódico foi observado, mostrando que a oxidação da MC-LR é um processo irreversível, Figura 4.2. As varreduras sucessivas obtidas na mesma solução, sem a limpeza da superfície do eletrodo, não mostraram nenhum novo pico de oxidação, demonstrando que o processo de oxidação da MC-LR não envolve a formação de nenhum produto de oxidação eletroativo. Por outro lado, a diminuição da corrente do pico 1_a visualizada nas segunda e terceira varreduras ocorreu devido à adsorção da MC-LR e/ou seus produtos de oxidação não-eletroativos na superfície do eletrodo.

O mesmo comportamento eletroquímico da MC-LR foi observado nos voltamogramas cíclicos registrados em vários valores de pH's.

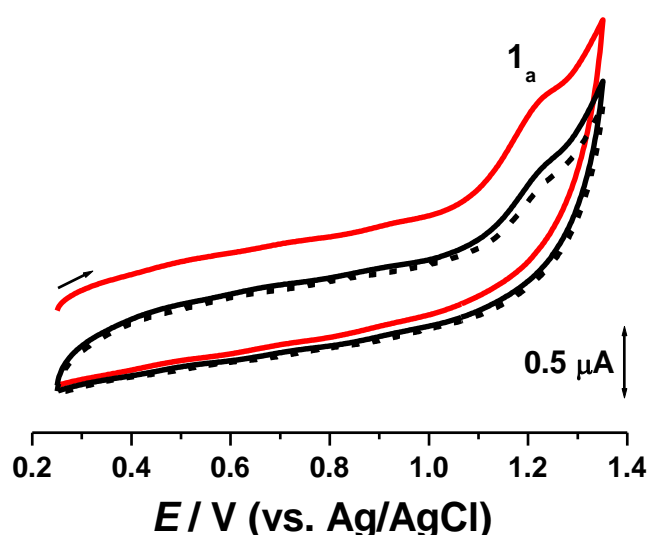


Figura 4.2. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4: (—) 1^a , (—) 2^a e (--) 3^a varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O efeito da velocidade de varredura sobre a corrente do pico 1_a foi estudado em uma solução recém-preparada de MC-LR $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0. Os voltamogramas foram registrados em diferentes velocidades de varredura, entre 25 e 200 mV s^{-1} . Para garantir que a superfície do ECV permanecesse sempre limpa e evitasse possíveis problemas de adsorção da MC-LR e/ou seus produtos de oxidação não-eletoativos na sua superfície, o eletrodo foi sempre polido entre as medidas.

Com o aumento da velocidade de varredura foi observado um deslocamento do pico 1_a para potenciais mais positivos, tanto como o aumento da corrente capacitiva. O módulo da diferença entre o potencial de pico e o potencial de meia altura de pico ($|E_{pa}^1 - E_{p/2a}^1|$) encontrado foi igual a 43 mV. Uma vez que, para um sistema irreversível controlado por difusão a equação é $|E_{pa}^1 - E_{p/2a}^1| = 47,7 \text{ mV}/(\alpha_a n')$, onde α_a é o coeficiente de transferência de carga anódica e n' o número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade (BRETT e BRETT, 1996), o valor de $\alpha_a n' = 1,11$ foi determinado.

Ao aumentar a velocidade de varredura a corrente do pico 1_a aumentou linearmente com a raiz quadrada da velocidade, indicando uma oxidação controlada por difusão das espécies em solução.

A corrente de pico em ampéres para um sistema irreversível controlado por difusão é dada pela Equação (4.1):

$$I_{pa}(A) = 2,99 \times 10^5 n(\alpha_a n')^{1/2} A[\text{MC-LR}]_{\infty} D_{\text{MC-LR}}^{1/2} \nu^{1/2} \quad (4.1)$$

onde n' é o número de elétrons transferidos durante a oxidação da MC-LR ($n' = 1$), determinado por VPD (Seção 4.1.2), A é a área do eletrodo em cm^2 , $D_{\text{MC-LR}}$ é o coeficiente de difusão da MC-LR em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, $[\text{MC-LR}]_{\infty}$ é a concentração em mol cm^{-3} e ν é em V s^{-1} (BRETT e BRETT, 1996). O valor da inclinação da relação linear I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ encontrado foi

$5,32 \times 10^{-7} \text{ A}/(\text{V s}^{-1})$, logo o valor do coeficiente de difusão da MC-LR em tampão fosfato pH 7,0 foi determinado, $D_{\text{MC-LR}} = 7,62 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Para esse cálculo, a área eletroativa do ECV foi previamente determinada pela equação de Randles e Sevcik (BRETT e BRETT, 1996) como sendo $A = 1,02 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. Foi utilizada uma solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0, onde o coeficiente de difusão do hexacianoferrato de potássio é $7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (HAYNES, 2011).

4.1.2 Voltametria de pulso diferencial

A influência do pH na oxidação eletroquímica da MC-LR foi estudada em uma ampla faixa de pH, entre 1,3 e 11,9, utilizando VPD. Os voltamogramas foram registrados em soluções recém-preparadas de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte.

Os voltamogramas foram obtidos imediatamente após a adição da MC-LR em cada solução tampão. Para $1,3 < \text{pH} < 8,2$, os resultados obtidos na primeira varredura mostraram o aparecimento de somente um pico anódico, pico 1_a , em $E_{\text{pa}}^1 \approx + 1,06 \text{ V}$, Figura 4.3A. Para $\text{pH} > 8,2$, o pico 1_a não apareceu.

O potencial do pico 1_a não variou com o pH, indicando que o processo de oxidação da MC-LR é independente do pH, Figura 4.3B, e o seu mecanismo envolve somente a transferência de elétrons e nenhum próton (SMITH, 2006). O número de elétrons envolvidos na reação foi determinado pelo valor da largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) encontrado para o pico 1_a em todos os pH's, obtendo-se um valor de $W_{1/2} = 89,25 \pm 11,77 \text{ mV}$ a 95% de confiança. O valor encontrado é próximo do valor teórico, dado pela Equação (4.2), que corresponde a uma reação eletroquímica envolvendo a transferência de um elétron (BRETT e BRETT, 1996). Consequentemente, o processo de oxidação da MC-LR ocorre com a transferência de somente um elétron.

$$W^{1/2} = 3,52RT / nF \quad (4.2)$$

A variação da corrente do pico 1_a com o pH mostrou um máximo de corrente em pH 1,3, e com o aumento do pH houve um decréscimo contínuo dessa intensidade de corrente, [Figura 4.3B](#).

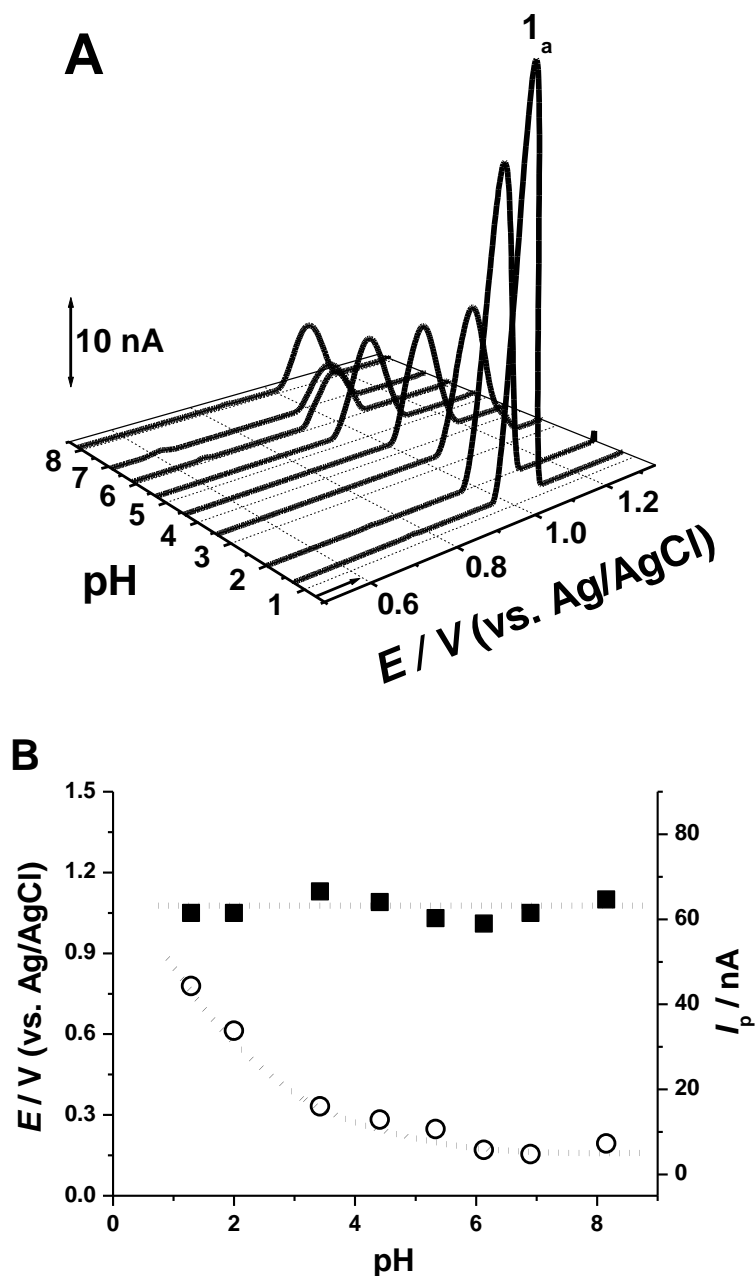


Figura 4.3. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1^a varredura sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de MC-LR 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no tampão em função do pH. (B) Relação dos E_p (■) e I_p (○) do pico 1_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Para todos os pH's estudados, foram realizadas varreduras voltamétricas sucessivas, sem efetuar a limpeza da superfície do eletrodo, a fim de confirmar o comportamento do pico 1_a observado na VC.

Nas segunda e terceira varreduras foi observado um decréscimo progressivo da corrente do pico 1_a e o seu potencial foi deslocado para valores mais positivos, em todos os tampões. Esse efeito foi causado pela diminuição da área eletroativa disponível na superfície do eletrodo, devido à adsorção da MC-LR e/ou seus produtos de oxidação não-eletoativos. No entanto, nenhum novo pico foi obtido nos segundo e terceiro voltamogramas consecutivos, mostrando, assim como na VC, que o mecanismo de oxidação da MC-LR não envolve a formação de qualquer produto redox eletroativo. A [Figura 4.4](#) mostra os voltamogramas obtidos para MC-LR em tampão pH 5,3.

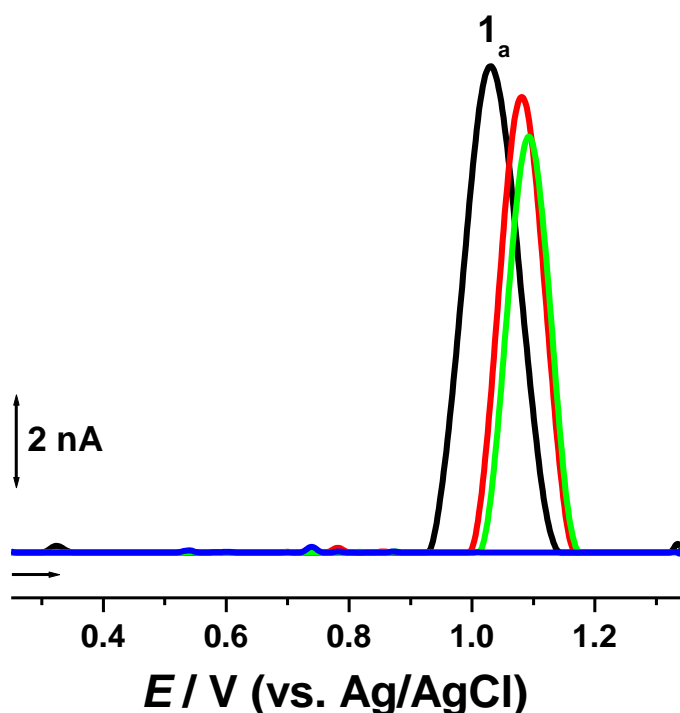


Figura 4.4. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 5,3. (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Logo em seguida, foi realizado o teste de adsorção para a MC-LR em todos os pH's, conforme os procedimentos descritos na [Seção 3.6](#). Os voltamogramas obtidos nessas condições não apresentaram nenhum pico voltamétrico. Isso significa que a MC-LR não adsorve na superfície do eletrodo. A [Figura 4.4](#) mostra o voltamograma obtido para o teste de adsorção da MC-LR em tampão pH 5,3 (procedimento 1 da [Seção 3.6](#)).

4.1.3 Voltametria de onda quadrada

Experimentos de VOQ foram realizados em solução recém-preparada de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólitos com diferentes valores de pH. Todos os resultados obtidos nessas condições apresentaram resposta eletroquímica semelhante à dos voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial.

No primeiro voltamograma registrado em tampão acetato pH 5,3 obtido imediatamente após a adição de MC-LR, o pico 1_a , em $E_{pa}^1 = +1,19 \text{ V}$, foi observado, [Figura 4.5](#).

Uma das vantagens mais importantes da VOQ é que com essa técnica o caráter reversível da reação de transferência de elétrons pode ser observado durante a varredura. Como a corrente medida pode ser amostrada em ambos os sentidos de aplicação dos pulsos, positivo e negativo, os picos correspondentes à oxidação ou a redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo podem ser obtidos no mesmo experimento ([GHICA e BRETT, 2005](#)).

Diante disso, a irreversibilidade da reação referente ao pico 1_a foi confirmada pela obtenção das componentes de corrente direta e reversa da corrente total, onde a componente direta mostrou o pico 1_a no mesmo potencial e com a mesma intensidade de corrente que a componente total obtida. Na componente reversa nenhum pico catódico apareceu, o que evidenciou o caráter irreversível da oxidação do pico 1_a , [Figura 4.5](#).

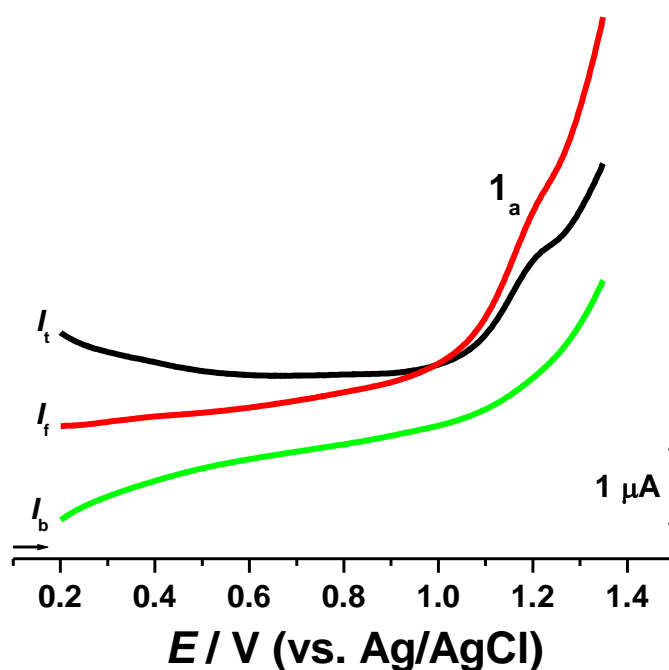


Figura 4.5. Voltamogramas de onda quadrada sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 5,3: 1ª varredura; I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa. $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $v_{\text{eff}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2 Comportamento eletroquímico de oxidação da microcistina-LR degradada

As mesmas soluções de MC-LR em tampão inicialmente estudadas foram deixadas em incubação por vários períodos de tempo. Com o passar do tempo, essas soluções foram novamente analisadas e verificaram-se a diminuição da intensidade de corrente do pico da MC-LR e o aparecimento de um novo pico de oxidação em um valor de potencial menor. Esse comportamento atribui-se à uma degradação da toxina em solução com a formação homogênea de produto(s) de degradação (*pd*MC-LR) eletroativo(s).

Desse modo, o processo de degradação química da MC-LR em todos os tampões e o comportamento eletroquímico do(s) produto(s) gerado(s) durante essa degradação foram investigados em detalhes por VC, VPD e VOQ.

4.2.1 Voltametria cíclica

Os experimentos iniciais sobre o comportamento de degradação da MC-LR foram realizados em tampão acetato pH 3,4, utilizando VC. Os voltamogramas foram registrados em uma solução de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 96 horas de incubação, [Figura 4.6](#).

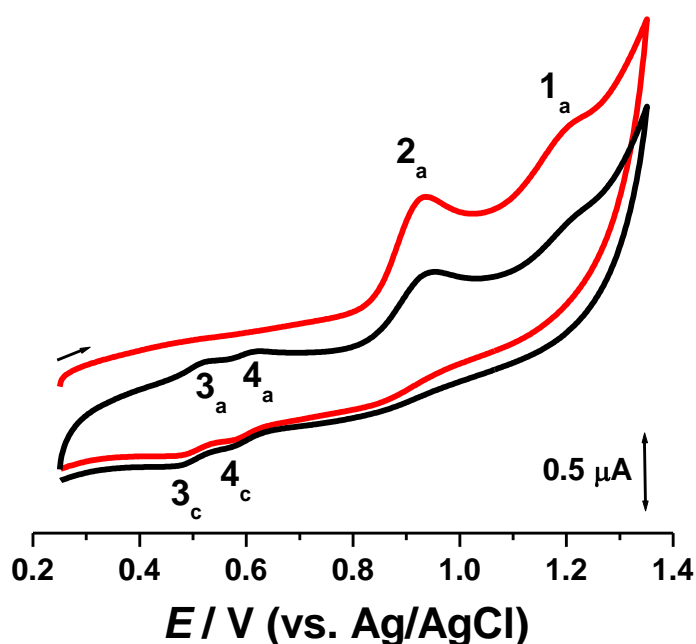


Figura 4.6. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos após 96 h de incubação de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4. (—) 1ª e (—) 2ª varreduras entre + 0,25 V e 1,35 V. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Na varredura efetuada no sentido positivo do primeiro voltamograma, o pico 1_a ocorreu em $E^1_{pa} = + 1,21 \text{ V}$, porém um novo pico anódico surgiu, pico 2_a , em $E^2_{pa} = + 0,94 \text{ V}$, indicando a oxidação do(s) *pdMC-LR* formado(s) em solução, [Figura 4.6](#). Ao mudar a direção da varredura do primeiro voltamograma para o sentido inverso, dois picos de redução, pico 4_c , em $E^4_{pc} = + 0,58 \text{ V}$, e pico 3_c , $E^3_{pc} = + 0,47 \text{ V}$, ocorreram, [Figura 4.6](#). Esses dois picos indicam a redução dos produtos de oxidação do(s) *pdMC-LR* formados na superfície do eletrodo durante a varredura anódica. No segundo voltamograma obtido na mesma solução,

sem a limpeza da superfície do ECV, os picos de oxidação 3_a , em $E^3_{pa} = + 0,52$ V, e 4_a , $E^4_{pa} = + 0,62$ V, ocorreram, **Figura 4.6**, evidenciando o comportamento reversível dessas duas reações. Além disso, ainda na segunda varredura as correntes dos picos 1_a e 2_a decresceram, devido à adsorção desses produtos de oxidação na superfície do eletrodo.

A fim de verificar que o pico 2_a levou a formação dos produtos de oxidação correspondentes aos picos 3_a e 4_a , os voltamogramas foram registrados sob as mesmas condições acima, com a superfície do eletrodo limpa. Porém a direção da varredura anódica foi invertida imediatamente após a varredura do pico 2_a e antes do pico 1_a . Como os picos 3_a e 4_a ocorreram nessas condições, **Figura 4.7**, isso revela que eles são os produtos de oxidação formados pela reação inerente ao pico 2_a .

O mesmo comportamento eletroquímico da MC-LR degradada e de seus produtos de oxidação foi observado em diferentes eletrólitos suporte.

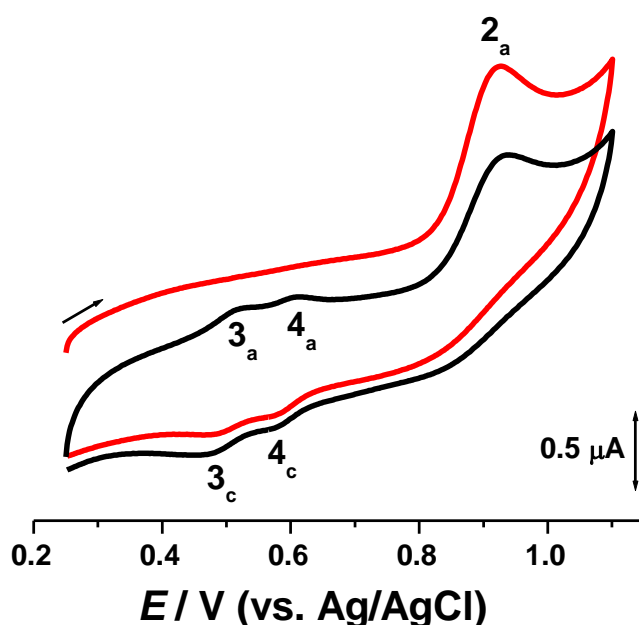


Figura 4.7. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos após 96 h de incubação de MC-LR $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4. (—) 1^a e (—) 2^a varreduras entre + 0,25 V e 1,10 V. $\Delta E_s = 2$ mV e $\nu = 100$ mV s^{-1} .

4.2.2 Voltametria de pulso diferencial

O comportamento de oxidação da MC-LR degradada e de seus produtos de oxidação foi estudado em uma ampla faixa de pH compreendida entre 1,3 e 11,9, usando VPD. As análises foram realizadas em soluções de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, após 5, 24 e 29 horas de incubação. Entre os experimentos, a superfície do ECV foi sempre limpa.

Os voltamogramas obtidos para a MC-LR em tampão acetato pH 5,3 após 5 horas de incubação, mostraram a ocorrência do pico 2_a , em $E_{pa}^2 = + 0,76 \text{ V}$, [Figura 4.8C](#). Os resultados obtidos na mesma solução, porém após longos períodos de incubação, ou seja, 24 e 29 horas, mostraram um aumento progressivo da corrente do pico 2_a com o aumento do tempo de incubação. Simultaneamente, ocorreu um decréscimo da corrente do pico 1_a e o deslocamento do seu potencial, [Figura 4.8C](#). Esse mesmo comportamento para ambos os picos foi observado em todos os eletrólitos suporte com diferentes valores de pH, [Figuras 4.8A, B e D](#).

Os experimentos acima mostram que durante a incubação da toxina em tampão houve modificações estruturais na molécula com o aumento do tempo de incubação. O decréscimo da corrente do pico 1_a com o tempo de incubação corresponde ao decréscimo da concentração da MC-LR, atribuído à degradação da toxina. O deslocamento de potencial observado para esse pico é provavelmente devido à uma isomerização da molécula da toxina. Segundo o estudo de degradação da MC-LR induzida ultrassonicamente realizado por Antoniou *et al.* (2008b), a oxidação e a isomerização das ligações dieno da cadeia Adda da MC-LR ocorreram simultaneamente. Em contrapartida, o aparecimento e o aumento da corrente do pico 2_a indicam a oxidação do(s) *pd*MC-LR formados em solução e o aumento da sua concentração com o tempo, respectivamente.

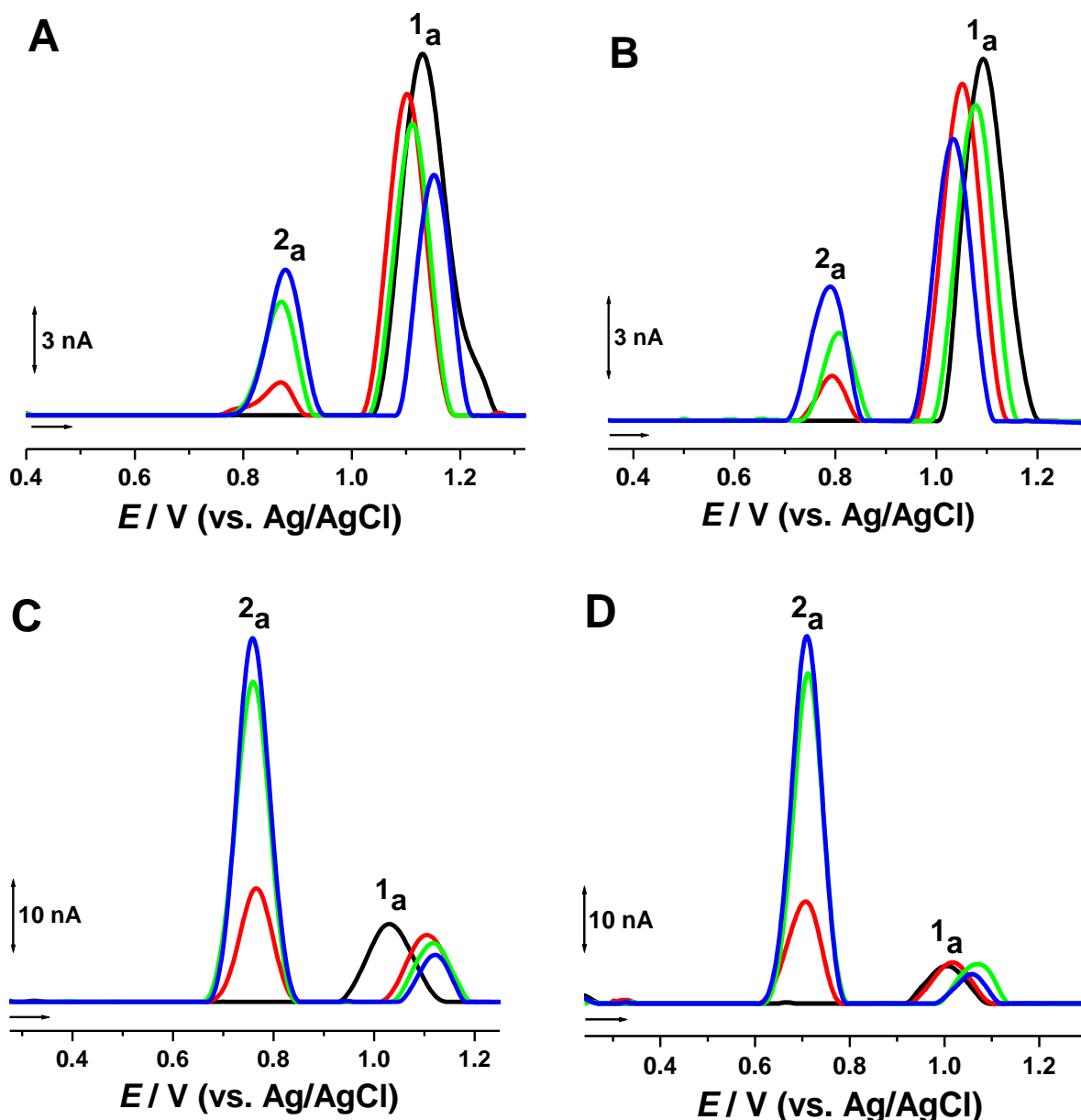


Figura 4.8. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada em tampão: (A) pH 3,4, (B) pH 4,4, (C) pH 5,3 e (D) pH 6,1. (—) 1ª varredura imediatamente após adição de MC-LR ao tampão e após (—) 5 h, (—) 24 h e (—) 29 h de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Para todas as soluções tampão, a diminuição da corrente do pico 1_a com o aumento do tempo de incubação foi mais acentuada em pH's 1,3 e 2,0 e com o aumento do pH essa diminuição foi mais lenta, [Figura 4.9](#). Isso mostra claramente que a degradação da MC-LR foi mais rápida em pH's muito ácidos. A influência do pH na degradação da MC-LR está em

concordância com aquela observada nos estudos de degradação por indução dessa toxina apresentados por Shi *et al.* (2005), Song *et al.* (2006) e Antoniou *et al.* (2008a), que encontraram uma maior taxa de degradação para essa toxina sob condições ácidas.

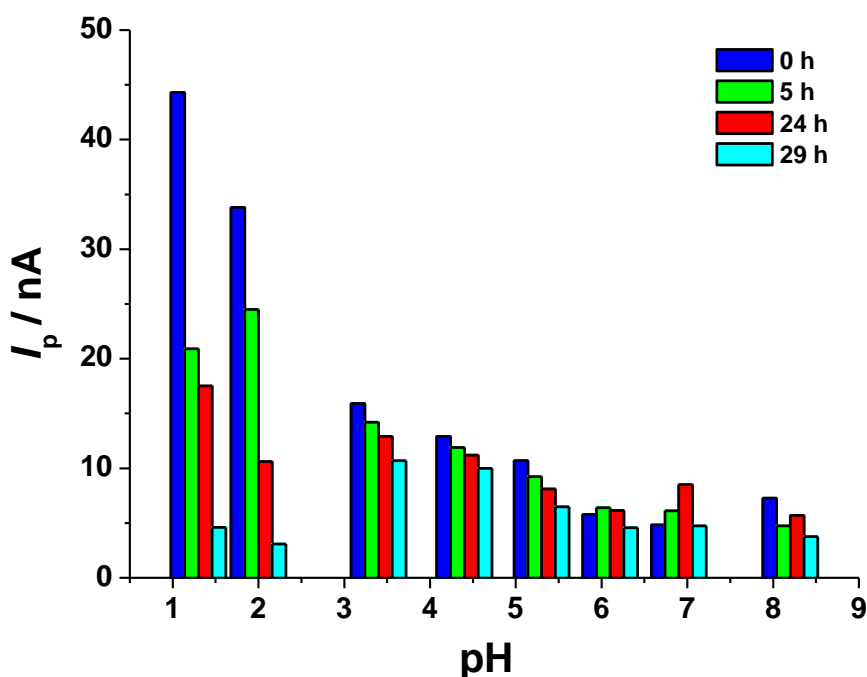


Figura 4.9. Variação da corrente do pico 1_a para 0, 5, 24 e 29 h de incubação em tampão em função do pH.

Os voltamogramas sucessivos registrados na solução de MC-LR incubada em tampão acetato pH 5,3 por 29 horas, mostraram na primeira varredura o pico 1_a , em $E^1_{pa} = + 1,09$ V, e o pico 2_a , em $E^2_{pa} = + 0,76$ V, [Figura 4.10B](#). Nas segunda e terceira varreduras, dois novos picos de oxidação foram observados em $E^3_{pa} = + 0,38$ V e $E^4_{pa} = + 0,48$ V, correspondentes aos picos 3_a e 4_a , respectivamente, [Figura 4.10B](#), os quais adsorvem na superfície do eletrodo. Esses dois picos foram apresentados anteriormente por VC. Como já mencionado, esses dois picos são relativos à oxidação dos produtos de oxidação do(s) *pdMC-LR* formados na superfície do eletrodo durante a primeira varredura de potencial. Devido a esse processo adsorptivo e, conseqüentemente,

diminuição da área eletroativa, as correntes dos picos 1_a e 2_a decresceram gradativamente nas varreduras consecutivas. As Figuras 4.10A e C apresentam os voltamogramas obtidos para a MC-LR em soluções tampão pH 3,4 e 6,1, nas mesmas condições acima.

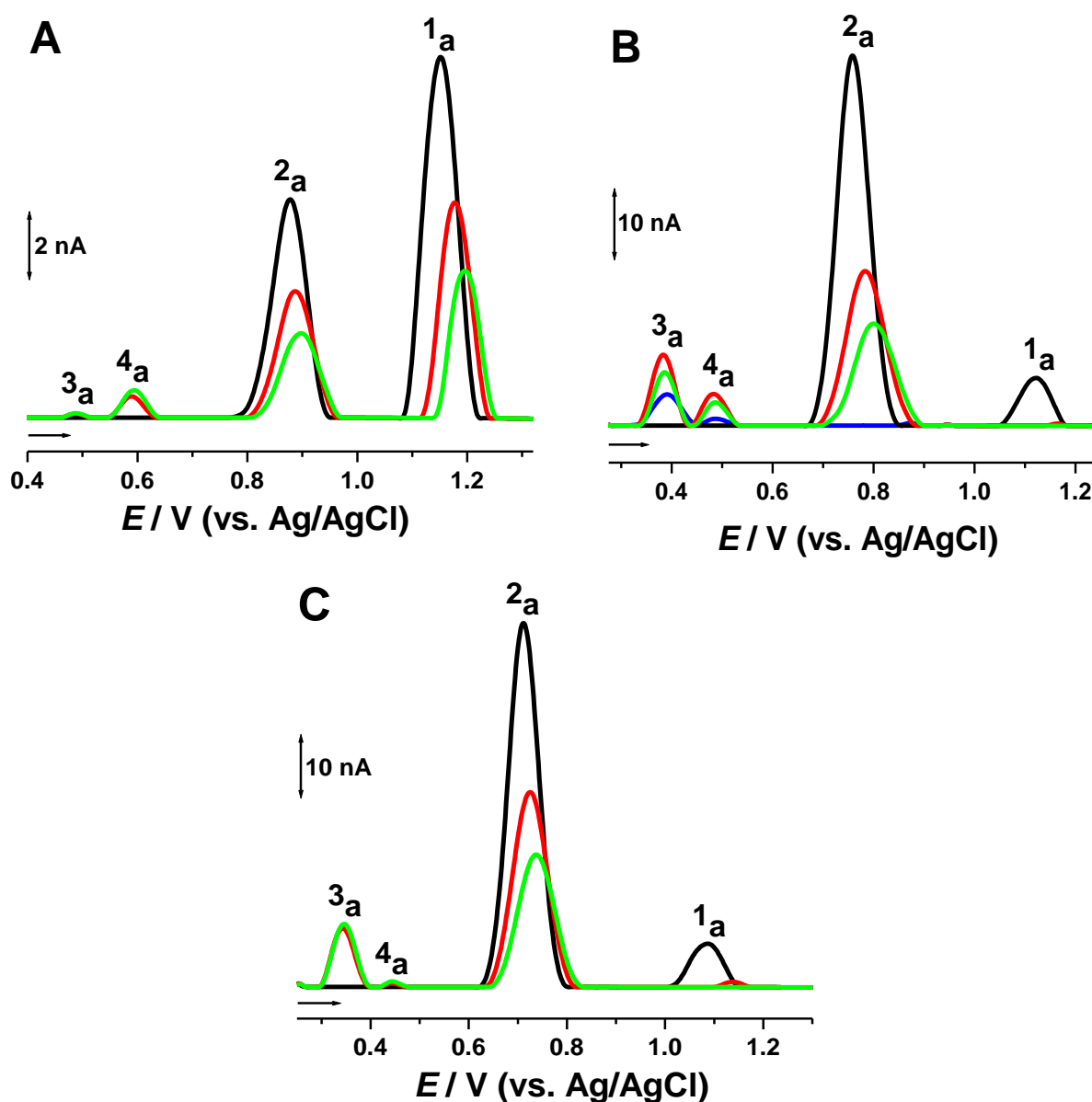


Figura 4.10. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos após 29 h de incubação de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão: (A) pH 3,4, (B) pH 5,3 e (C) pH 6,1. (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A adsorção dos produtos de oxidação do(s) *pdMC-LR* na superfície do ECV foi confirmada logo após efetuar o teste de adsorção (Seção 3.6). O resultado obtido apresentou somente os picos 3_a e 4_a , Figura 4.10B. Isso confirma que esses produtos de oxidação adsorvem fortemente, contudo nem a MC-LR nem o(s) *pdMC-LR* adsorvem na superfície eletródica. Além disso, os voltamogramas obtidos sucessivamente nas mesmas condições mostraram um decréscimo contínuo, porém lento, das correntes dos picos 3_a e 4_a devido ao consumo dos produtos formados.

A Figura 4.11 apresenta os voltamogramas obtidos em uma faixa de potencial menor, onde aparecem somente os picos 2_a , 3_a e 4_a , após 29 horas de incubação da MC-LR em tampão. Ao delimitar a faixa logo após o aparecimento do pico 2_a e ao efetuar varreduras seguidas, verificou-se que ambas as correntes dos picos 3_a e 4_a aumentaram, devido à formação de mais produtos de oxidação do(s) *pdMC-LR* na superfície do ECV. As varreduras foram realizadas sem a limpeza da superfície do eletrodo. Isso foi verificado em todos os pH's estudados.

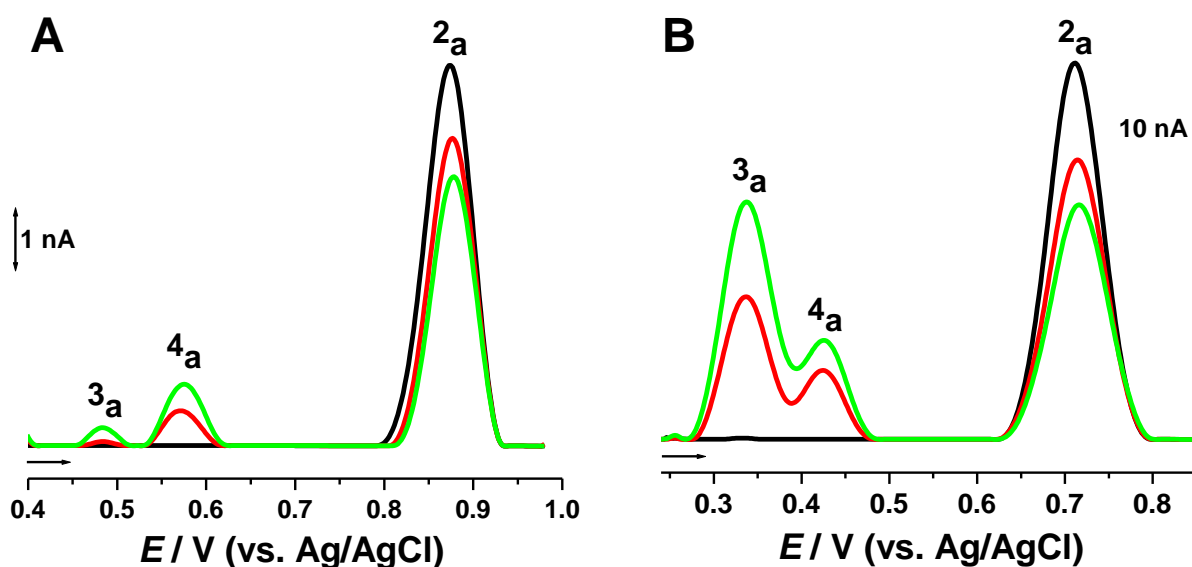


Figura 4.11. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos após 29 h de incubação de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão: (A) pH 3,4 e (B) pH 6,1: (—) 1ª, (—) 2ª e (—) 3ª varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

A dependência do pH com o(s) *pdMC-LR* e de seus produtos de oxidação foi estudada em soluções de MC-LR incubadas em eletrólitos com diferentes valores de pH após 29 horas de incubação.

Os resultados mostram que na primeira varredura efetuada, o pico 2_a apareceu em todos os eletrólitos suporte, exceto em pH 1,3. Para $1,3 < \text{pH} < 9,2$, o potencial do pico 2_a foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, [Figura 4.12A](#), seguindo a relação $E_{pa}^2 \text{ (V)} = 1,081 - 0,059 \text{ pH}$, [Figura 4.12B](#). A inclinação da reta, 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo de oxidação para essa reação envolve o mesmo número de elétrons e prótons ([SMITH, 2006](#)). Levando em consideração que a largura a meia altura do pico 2_a encontrada em todos os pH's foi $W^{1/2} = 73,67 \pm 2,66 \text{ mV}$ a 95% de confiança, o processo de oxidação envolvido ocorre com a transferência de um elétron e um próton.

Para as medidas realizadas nos pH's 10,3 e 11,9, o potencial do pico 2_a foi independente do pH, [Figura 4.12B](#), indicando um mecanismo envolvendo a transferência de apenas um elétron e nenhum próton e atribuindo que o produto de oxidação da MC-LR degradada sofre desprotonação química em eletrólitos mais alcalinos ([PONTINHA, OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2008](#)). O valor do $\text{pKa} \approx 9,2$ foi atribuído para o(s) *pdMC-LR*.

A corrente do pico 2_a aumentou com o aumento do tempo de incubação em todos os meios estudados, confirmando que o processo de degradação da MC-LR ocorreu de forma homogênea em solução. A variação da corrente do pico 2_a com o tempo de análise em diferentes eletrólitos é representada na [Figura 4.13](#). Foi observado que, para todos os períodos de incubação, a corrente do pico 2_a foi maior em eletrólitos com $5,3 < \text{pH} < 6,1$ e para eletrólitos muito ácidos e alcalinos foram observadas pequenas intensidades de corrente. Isso mostra que nesse intervalo de pH a reação de formação do(s) produto(s) de degradação da MC-LR foi favorecida.

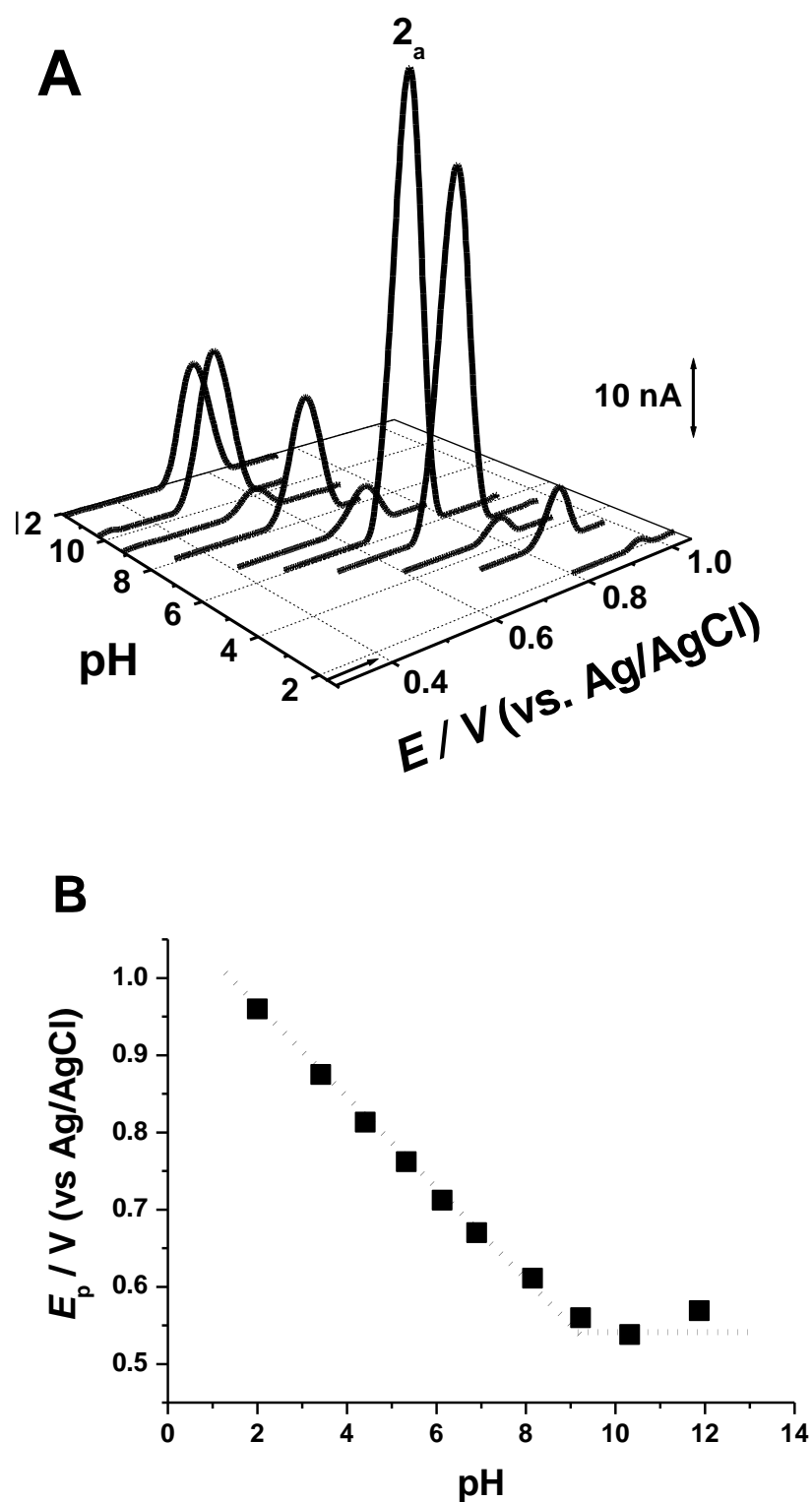


Figura 4.12. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, após 29 h de incubação, em função do pH. (B) Relação do (■) E_p do pico 2_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

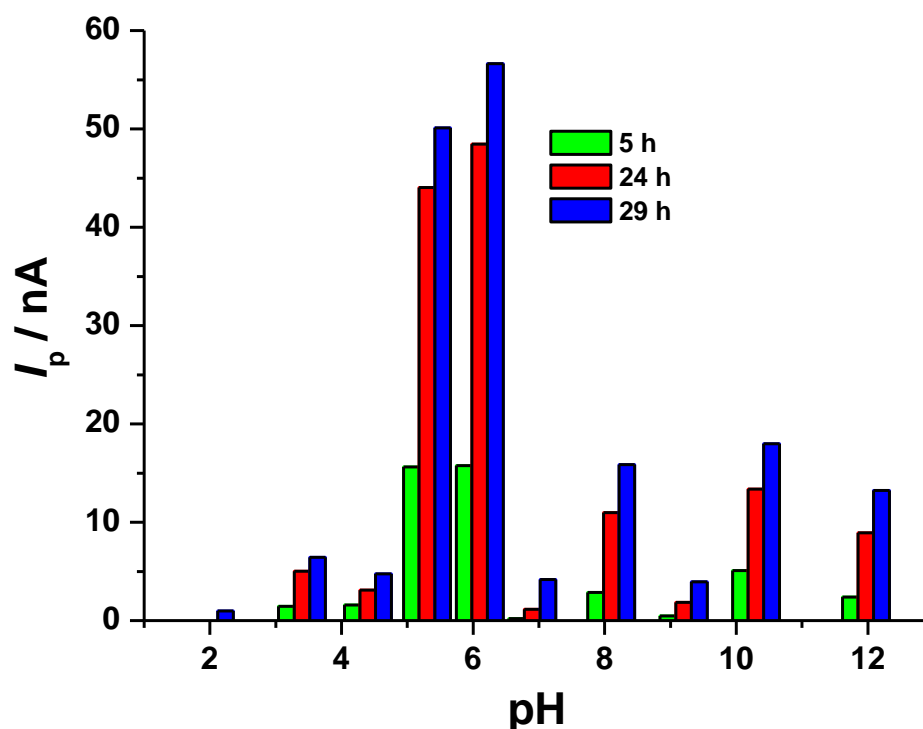


Figura 4.13. Variação da corrente do pico 2_a para 5 h, 24 h e 29 h de incubação em tampão em função do pH.

Na segunda varredura registrada nas mesmas condições descritas previamente, apareceram os picos 3_a e 4_a , [Figura 4.14A](#). O aumento do pH do meio até pH 9,2 levou a um decréscimo no potencial desses picos, [Figura 4.14B](#). A dependência foi linear e a inclinação da reta, 59 mV por unidade de pH, mostrou que o mecanismo de oxidação para cada reação, correspondente a cada pico 3_a e 4_a , envolve o mesmo número de elétrons e prótons. Os valores encontrados em todos os pH's para $W^{1/2} = 48,4 \pm 8,85$ mV do pico 3_a e $W^{1/2} = 44 \pm 4,59$ mV do pico 4_a a 95% de confiança, mostram que cada um desses processos de oxidação envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons.

Para as medidas realizadas nos pH's 10,3 e 11,9, os potenciais dos picos 3_a e 4_a foram independentes do pH, [Figura 4.14B](#), indicando um mecanismo de reação envolvendo a transferência de apenas dois elétrons e nenhum próton. As correntes desses picos variaram com o pH, atingindo um máximo de corrente em $5,3 < \text{pH} < 6,1$, cada, [Figura 4.14](#).

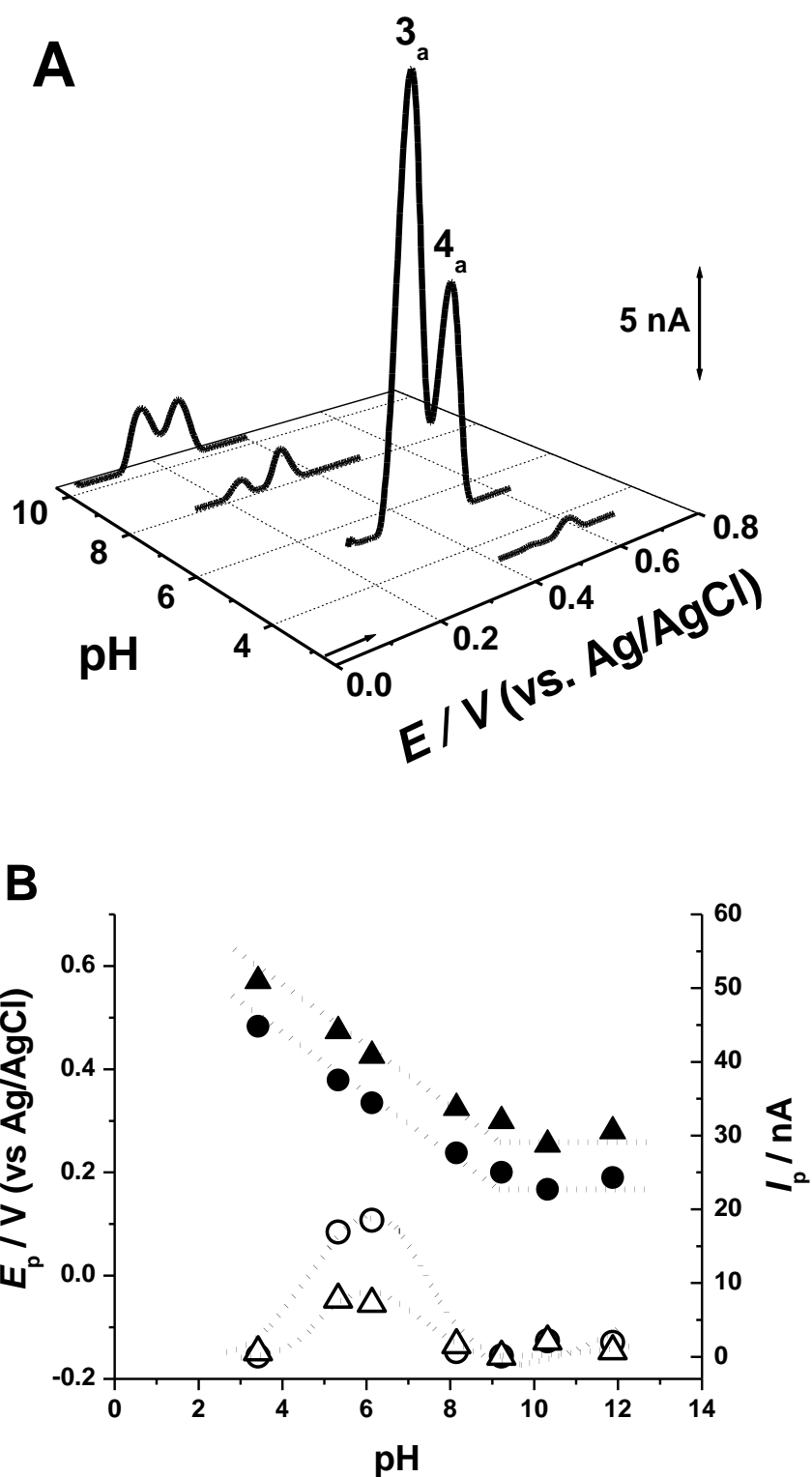


Figura 4.14. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 2ª varredura sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, após 29 h de incubação, em função do pH. (B) Relação do E_p dos picos (●) 3_a e (▲) 4_a e I_p dos picos (○) 3_a e (△) 4_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.3 Voltametria de onda quadrada

Para melhor verificar o comportamento dos produtos obtidos durante a degradação química da MC-LR em solução quanto a sua reversibilidade, voltamogramas de onda quadrada em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes tampões foram registrados, após 53 horas de incubação.

A primeira varredura realizada na solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 5,3, mostrou o pico 2_a , em $E_{pa}^2 = + 0,78 \text{ V}$, [Figura 4.15A](#). A irreversibilidade dessa reação foi confirmada mediante a obtenção das componentes de corrente direta e reversa da corrente total, onde a componente direta apresentou o pico de oxidação no mesmo potencial e com a mesma intensidade de corrente que a componente total obtida. Porém, na componente reversa nenhum pico catódico ocorreu, afirmando a irreversibilidade da reação de oxidação do(s) *pd*MC-LR.

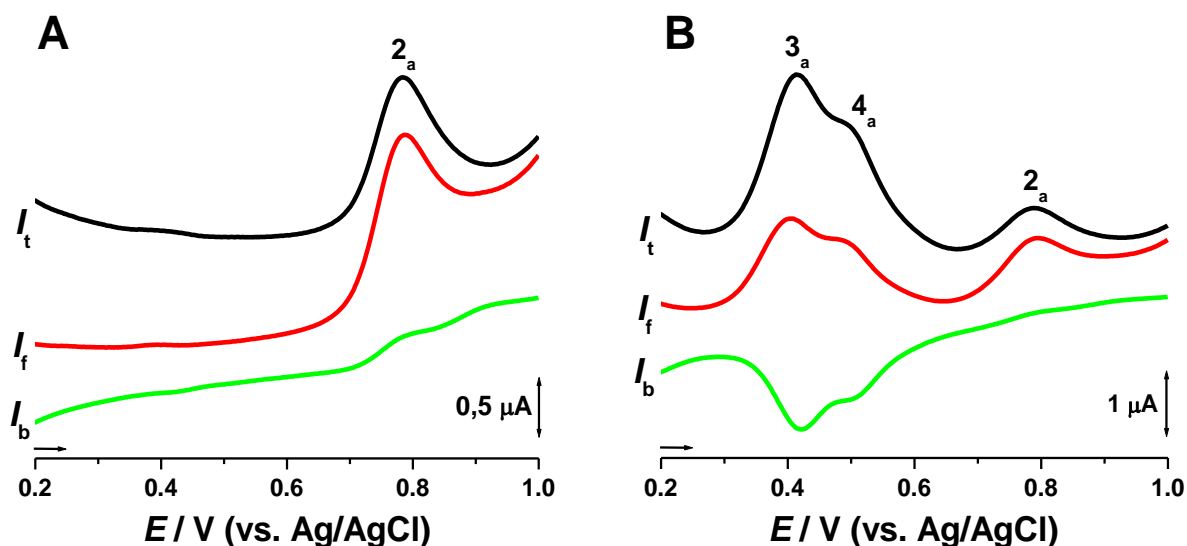


Figura 4.15. Voltamogramas de onda quadrada sobre ECV obtidos em solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada após 53 h em tampão pH 5,3: (A) 1ª e (B) 2ª varreduras; I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa. $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $v_{eff} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Na segunda varredura realizada nas mesmas condições acima, sem a limpeza da superfície eletródica, os produtos de oxidação, picos 3_a e 4_a, apareceram em $E^3_{pa} = + 0,41 \text{ V}$ e $E^4_{pa} = + 0,51 \text{ V}$, respectivamente. A reversibilidade dessas reações foi confirmada pela obtenção das componentes de corrente direta e reversa da corrente total de ambos os picos, onde as intensidades de corrente de oxidação e redução para cada pico foram iguais, [Figura 4.15B](#). Ademais, os mesmos valores de potencial obtidos para cada um dos picos, 3_a e 4_a, nas suas componentes de corrente direta e inversa são um indicativo da adsorção desses produtos de oxidação na superfície do eletrodo ([OLIVEIRA et al., 2007](#)).

O mesmo comportamento voltamétrico em termos de reversibilidade para os processos redox dos picos 2_a, 3_a e 4_a foi observado em todos os pH's estudados.

4.3 Análise cromatográfica da microcistina-LR

Para confirmar a degradação da MC-LR em meio aquoso observada nos estudos voltamétricos, experimentos cromatográficos foram realizados.

O cromatograma obtido para a solução recém-preparada de MC-LR $6,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ mostrou somente um pico referente a MC-LR obtido em $\lambda = 239 \text{ nm}$, com um tempo de retenção de 7,6 minutos, [Figura 4.16](#). Esse resultado está de acordo com a literatura ([SHI et al., 2005](#)).

Após 1 mês de incubação, a mesma solução de MC-LR foi novamente testada e os resultados apresentaram três picos, [Figura 4.16](#). O pico da MC-LR apareceu no mesmo tempo de retenção, porém com menor valor de absorbância, e os outros dois novos picos surgiram com tempos de retenção de 5,7 e 10,3 minutos, com máximos de absorbâncias em $\lambda = 271 \text{ nm}$ e $\lambda = 209 \text{ nm}$, respectivamente. Isso mostra que a degradação da MC-LR em meio aquoso e nas condições experimentais estudadas, sem a utilização de qualquer processo de indução, ocorre com

a quebra da molécula em duas partes, levando a formação dos produtos de degradação. Esses resultados estão em concordância com aqueles observados nos estudos de degradação induzida da MC-LR por Bourne *et al.* (1996), Song *et al.* (2006) e Antoniou *et al.* (2008a). Esses autores observaram o aparecimento de produtos de degradação dessa toxina nos cromatogramas obtidos.

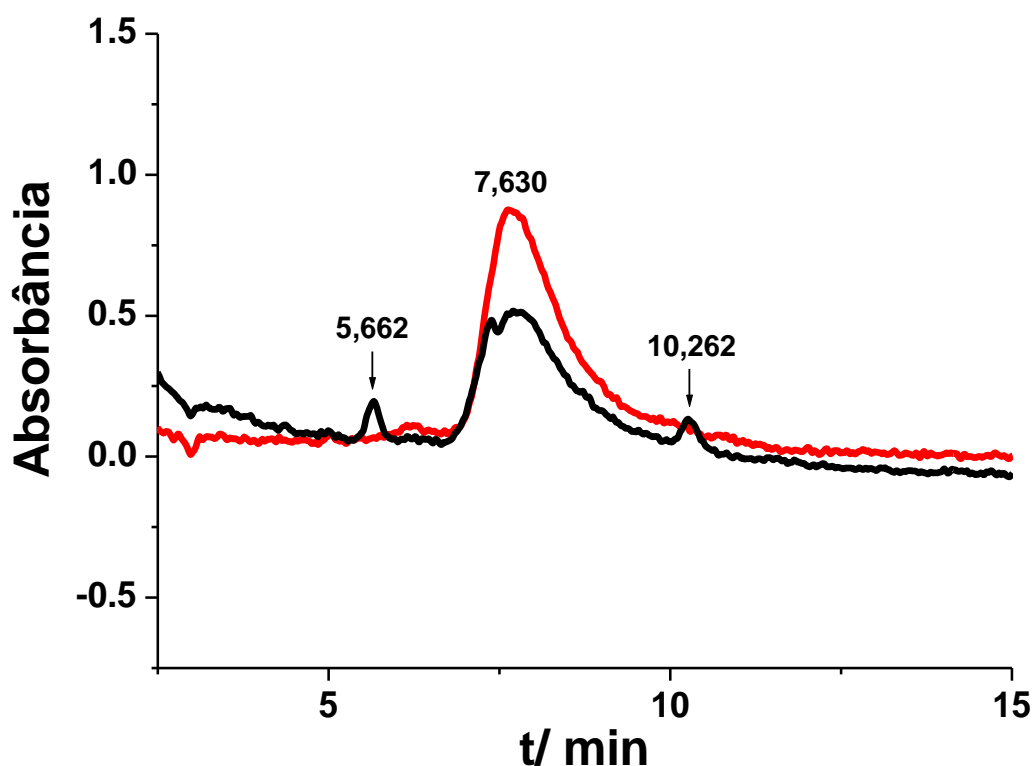


Figura 4.16. Cromatogramas da solução de MC-LR $6,3 \times 10^{-7} \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4: (—) imediatamente após a adição da MC-LR no tampão e (—) após 1 mês de incubação no tampão.

Os experimentos cromatográficos aqui apresentados confirmam a ocorrência da degradação da MC-LR observada pelas técnicas voltamétricas.

4.4. Estudo voltamétrico dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp

Com o intuito de detectar os centros eletroativos da MC-LR sobre o ECV, a oxidação eletroquímica dos aminoácidos Leu, Arg, Ala, Glu e Asp, foi inicialmente investigada.

Os voltamogramas registrados para cada aminoácido nas concentrações de 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0, 5, 24 e 29 horas de incubação, utilizando VPD, não mostraram nenhuma resposta eletroativa para o grupo de aminoácidos estudados.

4.5 Estudo voltamétrico do ácido 2-acetamidoacrílico

Para estudar a eletroatividade do 2-AAA e a sua possível correlação com os sítios eletroativos da MC-LR, esse composto também foi investigado eletroquimicamente.

A oxidação do composto 2-AAA foi estudada e os resultados estão descritos a seguir.

4.5.1 Voltametria cíclica

Voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução recém-preparada de 2-AAA 750 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0. O primeiro voltamograma apresentou o pico de oxidação do 2-AAA, pico 1_a, em $E_{pa}^1 = + 1,37 \text{ V}$, [Figura 4.17](#). Ao mudar a direção da varredura nenhum pico catódico foi observado, mostrando que esse processo de oxidação é um processo irreversível, [Figura 4.17](#). As varreduras sucessivas obtidas na mesma solução, sem a limpeza da superfície do eletrodo, não mostraram nenhum novo pico de oxidação, demonstrando que o processo de oxidação do 2-AAA não envolve a formação de nenhum produto de oxidação eletroativo. Em contrapartida, a diminuição da corrente do pico 1_a visualizada nas segunda e terceira varreduras ocorreu devido à

adsorção do 2-AAA e/ou seus produtos de oxidação não-eletoativos na superfície do eletrodo.

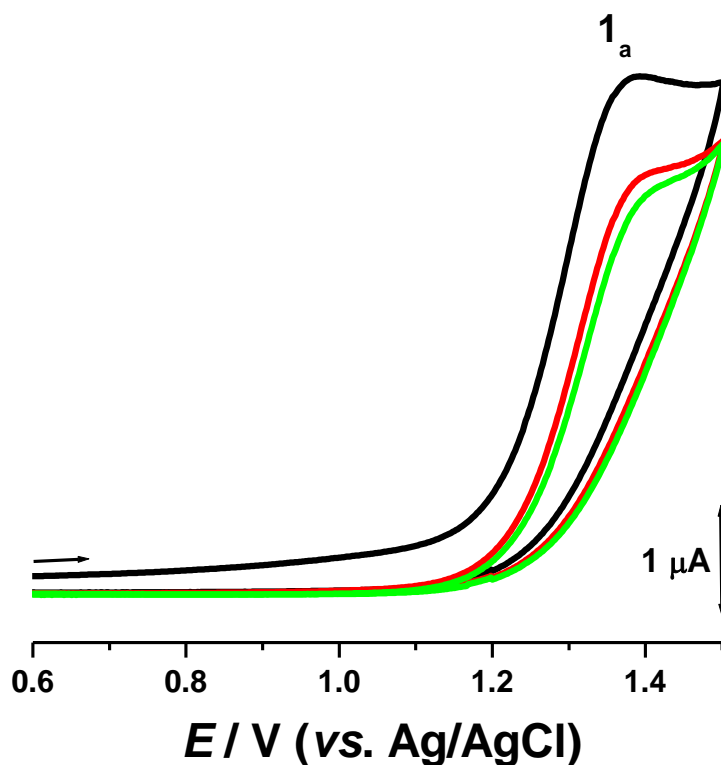


Figura 4.17. Voltamogramas cíclicos com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de 2-AAA $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0: (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.5.2 Voltametria de pulso diferencial

Voltamogramas de pulso diferencial também foram registrados para o 2-AAA. Os experimentos foram realizados em solução recém-preparada de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, [Figura 4.18](#).

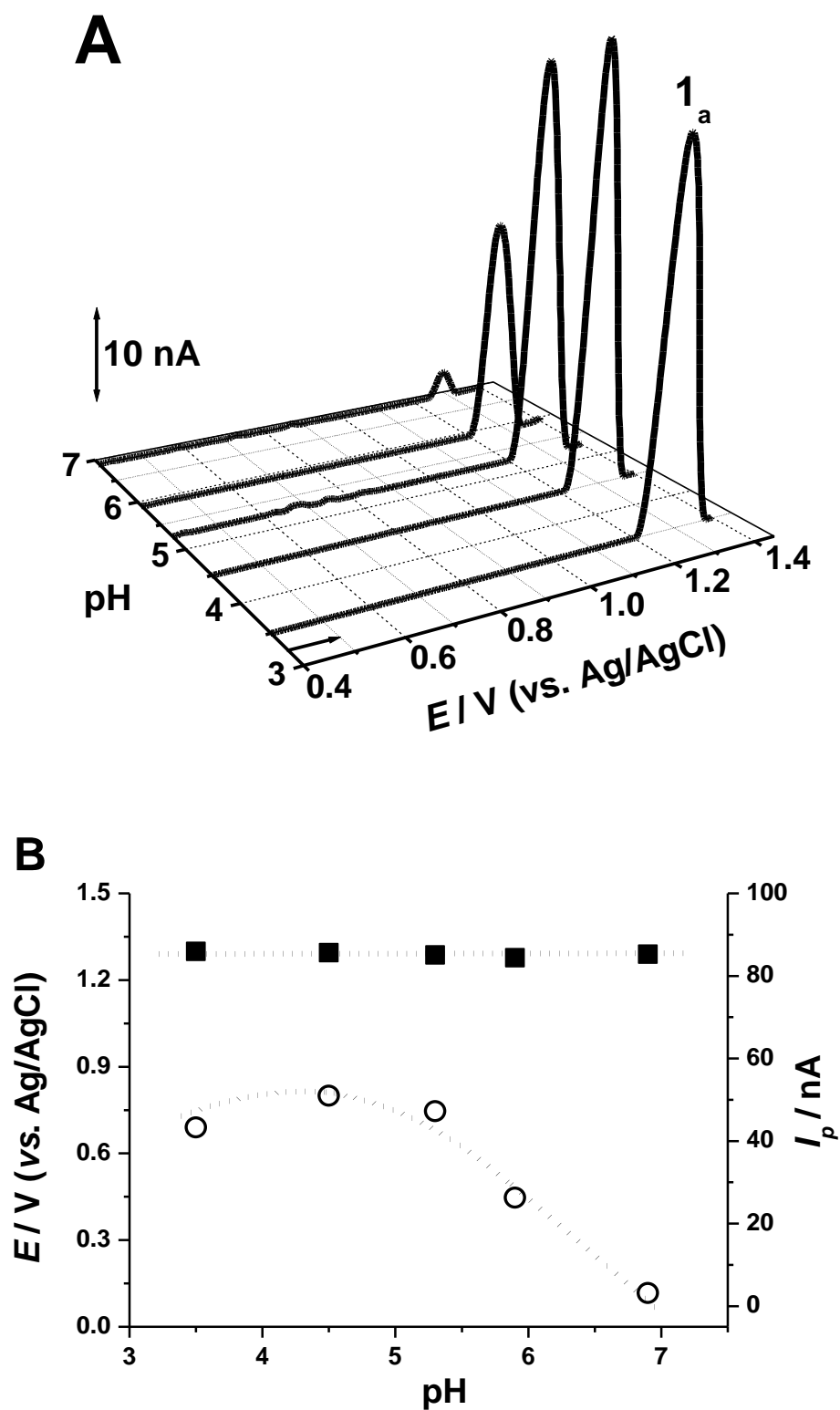


Figura 4.18. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura, sobre ECV, obtidos imediatamente após a adição de uma solução de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ no tampão em função do pH. (B) Relação dos (■) E_p e (○) I_p do pico 1_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Os resultados mostram um pico referente à oxidação do 2-AAA, pico 1_a , em $E_{pa}^1 \approx + 1,30$ V, [Figura 4.18A](#). Para $\text{pH} > 8,2$, o pico 1_a não apareceu. O potencial do pico 1_a não variou com o pH , indicando que o processo de oxidação do 2-AAA é independente do pH , [Figura 4.18B](#), e o seu mecanismo envolve somente a transferência de elétrons e nenhum próton ([SMITH, 2006](#)).

A largura a meia altura do pico 1_a encontrado nos voltamogramas registrados para todos os pH 's foi de $W_{1/2} = 77 \pm 11,32$ mV a 95% de confiança, correspondendo a uma reação de oxidação envolvendo a transferência de um elétron ([BRETT e BRETT, 1996](#)). Assim, o processo de oxidação do 2-AAA ocorre com a transferência de somente um elétron.

A influência do pH na corrente do pico 1_a , apresentada na [Figura 4.18B](#), mostrou que a intensidade de corrente tende a diminuir com o aumento do pH .

Voltamogramas sucessivos foram registrados nas mesmas condições acima, em todos os pH 's. Nas segunda e terceira varreduras efetuadas, em cada eletrólito suporte, a corrente do pico 1_a diminuiu consecutivamente, porém nenhum novo pico foi observado. A [Figura 4.19](#) apresenta os voltamogramas obtidos para o 2-AAA em pH 4,5. Esse comportamento foi causado, possivelmente, devido à adsorção do 2-AAA e/ou seus produtos de oxidação na superfície do eletrodo. Todavia, o mecanismo de oxidação do 2-AAA não envolve a formação de nenhum produto de oxidação eletroativo. Esses resultados confirmam os obtidos por VC.

Pelo teste de adsorção ([Seção 3.6](#)) realizado para todos os pH 's, nenhum pico de oxidação foi observado nos voltamogramas obtidos, indicando que o 2-AAA não adsorve na superfície eletródica. A [Figura 4.19](#) mostra o voltamograma obtido para o teste de adsorção do 2-AAA em tampão pH 4,5 (procedimento 1 da [Seção 3.6](#)).

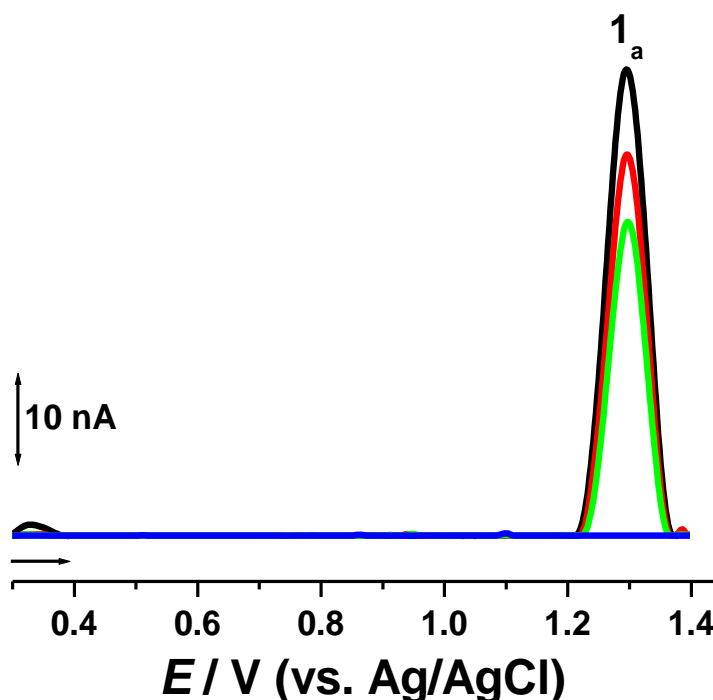


Figura 4.19. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 4,5. (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

As mesmas soluções de 2-AAA em tampão utilizadas nos experimentos anteriores foram armazenadas e em seguida, analisadas após 24 e 48 horas de incubação. Os resultados mostram apenas uma diminuição da corrente do pico 1_a, sem o aparecimento de um novo pico de oxidação, [Figura 4.20](#). Isso indica que o composto 2-AAA sofreu degradação em solução sem apresentar nenhum produto de degradação eletroativo.

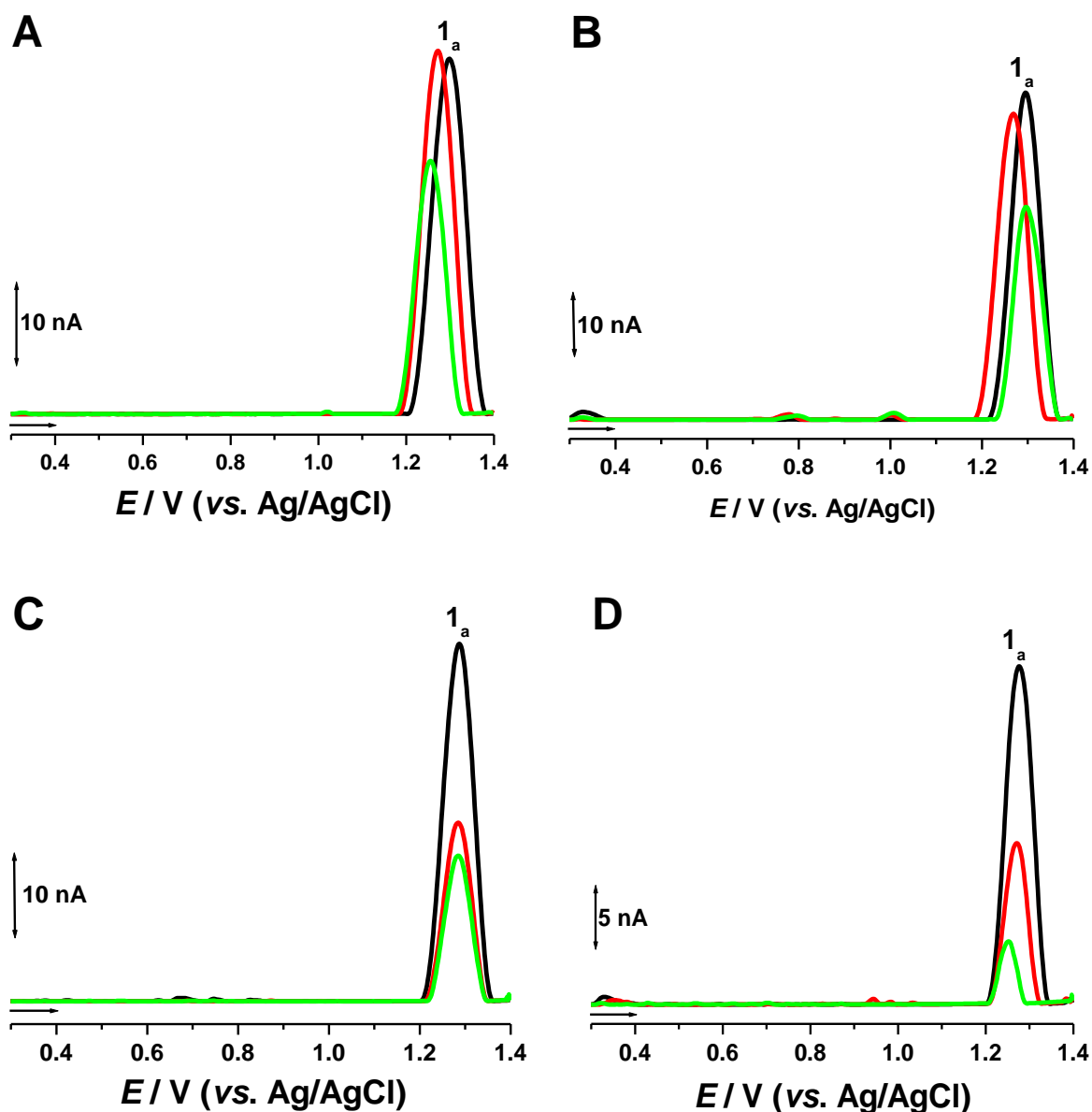


Figura 4.20. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos em solução de 2-AAA $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada em tampão: (A) pH 3,5, (B) pH 4,5, (C) pH 5,3 e (D) pH 6,0. (—) 1ª varredura imediatamente após adição de 2-AAA ao tampão e após (—) 24 h e (—) 48 h de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

4.6 Estudo voltamétrico do ácido sórbico

Estudos eletroquímicos para o SA também foram realizados visando investigar os centros eletroativos da MC-LR. Assim, o comportamento de oxidação eletroquímica do SA e de seus produtos de degradação em solução aquosa foi investigado conforme descrito a seguir.

4.6.1 Voltametria cíclica

O comportamento voltamétrico do SA foi inicialmente investigado em uma solução recém-preparada de SA $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0.

O voltamograma obtido mostrou somente um pico anódico, pico 1_a , em $E_{pa}^1 \approx + 1,38 \text{ V}$, [Figura 4.21](#). A irreversibilidade dessa reação de oxidação foi observada ao inverter o sentido da varredura de potencial para valores menos positivos, visto que nenhum pico catódico foi observado. Ao efetuar mais duas varreduras seguidas, sem a limpeza da superfície do ECV, observou-se que nenhum novo pico de oxidação apareceu demonstrando que o processo de oxidação do SA não envolve a formação de nenhum produto eletroativo. Contudo, o decréscimo consecutivo da corrente do pico 1_a foi decorrente da adsorção do SA e/ou seus produtos de oxidação não-eletroativos na superfície eletródica.

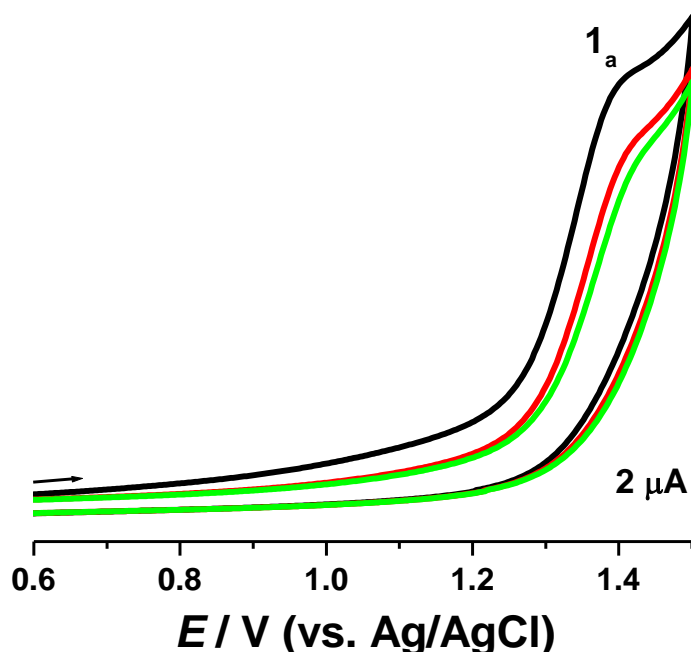


Figura 4.21. Voltamogramas cíclicos sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de SA $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0: (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.6.2 Voltametria de pulso diferencial

A oxidação eletroquímica do SA em função do pH foi estudada utilizando soluções recém-preparadas de SA $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, entre pH's 3,4 e 11,9, utilizando VPD.

Para pH's $< 8,2$, verificou-se o aparecimento do pico 1_a, em $E_{pa}^1 \approx +1,36 \text{ V}$, [Figura 4.22A](#). O potencial do pico é independente do pH, logo o mecanismo de oxidação do SA envolve somente a transferência de elétrons. O valor determinado igual a $W_{1/2} = 86,5 \pm 8,37 \text{ mV}$ a 95% de confiança para o pico 1_a, em todos os pH's, evidencia que a reação de oxidação do SA ocorre com a transferência de um único elétron e nenhum próton está envolvido.

O gráfico da corrente do pico 1_a em função do pH mostra que a corrente decresce com o aumento do pH, apresentando maior intensidade de corrente em pH 3,4, [Figura 4.22B](#).

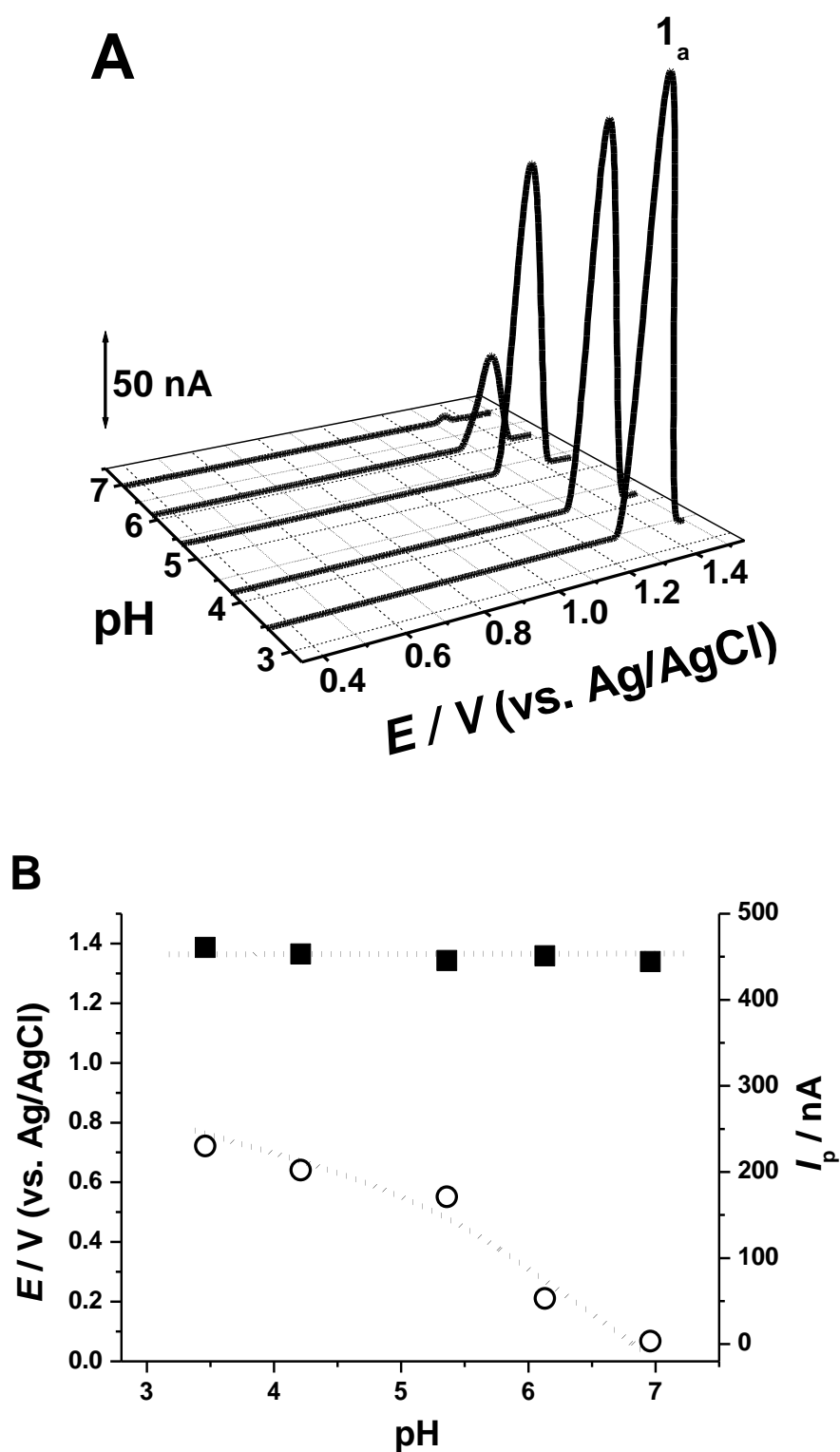


Figura 4.22. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura sobre ECV obtidos imediatamente após a adição de uma solução de SA $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ no tampão em função do pH. (B) Relação dos (■) E_p e (○) I_p do pico 1_a com o pH. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Voltamogramas sucessivos foram registrados em cada solução de tampão, a fim de confirmar os resultados obtidos por VC. Os resultados mostram somente um decréscimo contínuo da corrente do pico 1_a , nenhum novo pico voltamétrico foi observado durante as varreduras. A [Figura 4.23](#) apresenta os voltamogramas obtidos para o SA em tampão pH 4,2.

Logo em seguida, foi realizado o teste de adsorção para todos os pH's ([Seção 3.6](#)). Os voltamogramas resultantes mostraram a presença do pico 1_a , porém com intensidade de corrente muito menor. Isso significa que o SA adsorve na superfície do eletrodo. A [Figura 4.23](#) mostra o voltamograma obtido para o teste de adsorção do SA em solução tampão pH 4,2 (procedimento 1 da [Seção 3.6](#)).

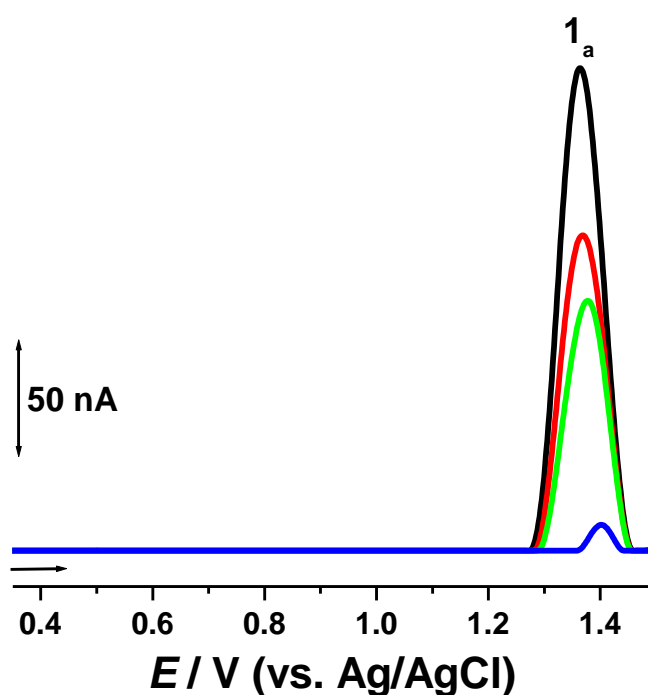


Figura 4.23. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos imediatamente após adição de uma solução de SA $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 4,2. (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

4.6.3 Estudo voltamétrico do ácido sórbico degradado

Soluções de SA em eletrólitos suporte de diferentes valores de pH foram deixadas em incubação por vários períodos de tempo. Ao serem analisadas foram observados a diminuição da intensidade de corrente do pico do SA e o surgimento de um novo pico de oxidação em valor de potencial mais baixo, para todos os casos. Isso indica que a molécula de SA sofreu degradação ao longo do tempo, com a formação homogênea de produto(s) de degradação (*pdSA*) eletroativo(s) em solução aquosa. O processo de degradação química do SA em tampão e o comportamento de oxidação do(s) produto(s) de degradação gerado(s) foram investigados utilizando VPD e VOQ, conforme apresentados a seguir.

4.6.3.1 Voltametria de pulso diferencial

Os experimentos iniciais sobre o comportamento de degradação do SA foram realizados em tampão acetato pH 3,4. Os voltamogramas foram obtidos após diferentes tempos de incubação em soluções de SA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Entre as medidas a superfície do ECV foi sempre polida.

Os voltamogramas registrados após 5 horas de incubação mostram a ocorrência de um novo pico de oxidação, pico 2_a , $E_{pa}^2 = + 0,83 \text{ V}$, correspondente ao(s) *pdSA* em solução, [Figura 4.24A](#). Os voltamogramas obtidos na mesma solução após longos tempos de incubação, 24, 48, 96 horas, 7 e 14 dias, mostram um aumento progressivo da corrente do pico 2_a com o aumento do tempo. Ao mesmo tempo, a diminuição e, conseqüentemente, o desaparecimento do pico 1_a foram observados, [Figura 4.24A](#). Esse comportamento voltamétrico de ambos os picos foi verificado em todos os eletrólitos suporte estudados. A [Figura 4.24B](#) apresenta os voltamogramas resultantes para o pH 5,3.

Esses resultados mostram que o ácido sórbico sofre modificações estruturais com o tempo quando incubado em soluções tampão. O

decréscimo da corrente do pico 1_a com o aumento do tempo de análise corresponde ao decréscimo da concentração do SA, atribuído à sua degradação. Por outro lado, o surgimento e o aumento do pico 2_a indicam a oxidação do(s) *pdSA* formados em solução eletrolítica e o aumento da sua concentração com o tempo, respectivamente. Esses resultados estão em concordância com os da literatura (HILDEGARD e SEBALITSCHKA, 1965, ARYA, 1980; ARYA e THAKUR, 1988; CAMPOS, ROJAS E GERSCHENSON, 1996; YARRAMRAJU *et al.*, 2007), onde os autores relatam que o SA em solução aquosa sofre decomposição formando produtos de degradação.

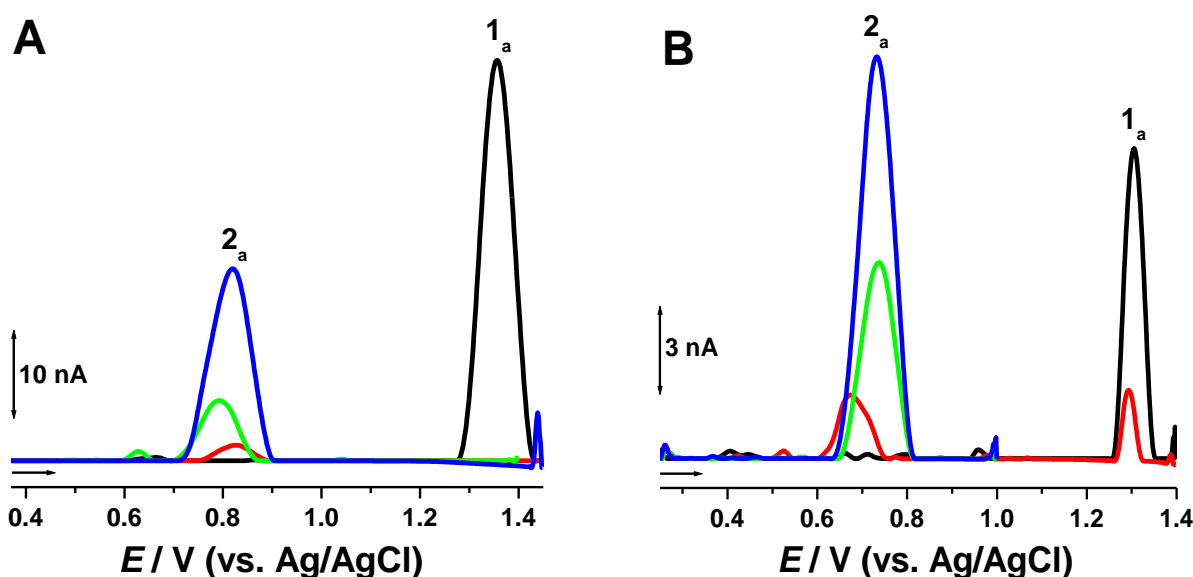


Figura 4.24. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos em solução de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada em tampão: (A) pH 3,4 e (B) pH 5,3. (—) 1ª varredura imediatamente após adição de SA ao tampão e após (—) 5 h, (—) 48 h e (—) 14 dias de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Uma vez que, o pico 1_a não foi observado nos voltamogramas registrados após os períodos de incubação acima citados, exceto após 5 horas de incubação do SA em tampão pH 5,3, a taxa de degradação do SA em meio aquoso foi avaliada somente pelo pico 2_a .

Os voltamogramas sucessivos também foram registrados na solução de SA em tampão acetato pH 3,4, após 14 dias de incubação, [Figura 4.25](#). Na primeira varredura, o pico 2_a ocorreu em $E_{pa}^2 = + 0,82$ V. Na segunda varredura dois novos picos de oxidação, picos 3_a , em $E_{pa}^3 = + 0,48$ V, e 4_a , em $E_{pa}^4 = + 0,57$ V, foram observados. Esses dois picos correspondem à oxidação dos produtos de oxidação do(s) *pdSA* formados na superfície do eletrodo.

Os resultados obtidos para o teste de adsorção ([Seção 3.6](#)) desses produtos na superfície do mesmo, apresentaram os picos 3_a e 4_a , [Figura 4.25](#), mostrando que esses dois produtos adsorvem fortemente na superfície do ECV.

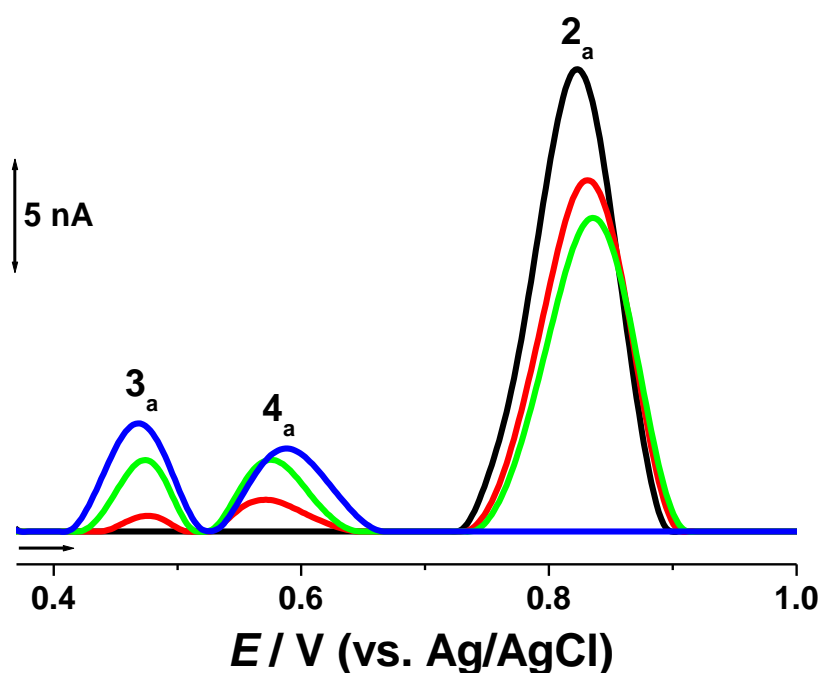


Figura 4.25. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida sobre ECV obtidos após 14 dias de incubação de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 3,4: (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras e (—) 1^a varredura após transferência do eletrodo ao tampão. $\Delta E_s = 2$ mV, $\Delta E_t = 70$ ms e $\nu = 5$ mV s⁻¹.

O comportamento eletroquímico de oxidação do(s) *pdSA* e de seus produtos de oxidação foi estudado na faixa de pH $3,4 < \text{pH} < 11,9$, e os

voltamogramas foram registrados em soluções de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubadas em diferentes eletrólitos, após 14 dias.

A ocorrência do pico 2_a foi observada para $\text{pH} < 11,9$. Para eletrólitos com $3,4 < \text{pH} < 9,2$, o potencial do pico 2_a foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH, [Figura 4.26A](#). A relação é linear e segue a equação $E_{pa}^2 \text{ (V)} = 1,03 - 0,059 \text{ pH}$, [Figura 4.26B](#). A inclinação da reta, 59 mV por unidade de pH, mostra que o mecanismo de oxidação do pico 2_a envolve o mesmo número de elétrons e prótons ([SMITH, 2006](#)). O valor determinado igual a $W_{1/2} = 72,88 \pm 10,45 \text{ mV}$ a 95% de confiança para o pico 2_a em todos os pH's evidencia que a reação de oxidação do *dSA* ocorre com a transferência de um único elétron, conseqüentemente, também um próton. Para $\text{pH} > 9,2$, o potencial do pico 2_a tende a ser independente do pH, [Figura 4.26B](#), indicando um sistema de reação envolvendo a transferência de um único elétron e nenhum próton e atribuindo que o produto de oxidação do SA degradado sofre desprotonação química em eletrólitos mais alcalinos ([PONTINHA, OLIVEIRA e OLIVEIRA-BRETT, 2008](#)). O valor do $\text{pK}_a \approx 9,2$ para o(s) *pdSA* foi atribuído. Para $\text{pH} > 10,3$ o pico 2_a não foi observado.

Durante os experimentos, em cada eletrólito, vários voltamogramas consecutivos foram obtidos. Na segunda varredura os picos 3_a e 4_a ocorreram, correspondendo à oxidação dos produtos de oxidação do(s) *pdSA* formados na superfície do eletrodo. Seu comportamento voltamétrico foi estudado em função do pH do eletrólito suporte. Foi observado que, ao aumentar o pH, um decréscimo do potencial de ambos os picos 3_a e 4_a ocorreu. A dependência foi linear e a inclinação da reta, 59 mV por unidade de pH, mostrou que o mecanismo de oxidação dos picos 3_a e 4_a envolve o mesmo número de elétrons e prótons. A largura a meia altura de ambos os picos, em todos os pH's, foi de $W_{1/2} = 54,67 \pm 11,47 \text{ mV}$ a 95% de confiança, logo esses processos de oxidação envolvem a transferência de dois elétrons e dois prótons. Para $\text{pH} > 9,2$,

os potenciais dos picos 3_a e 4_a tendem a ser independentes do pH, indicando um mecanismo de reação envolvendo a transferência de somente dois elétrons.

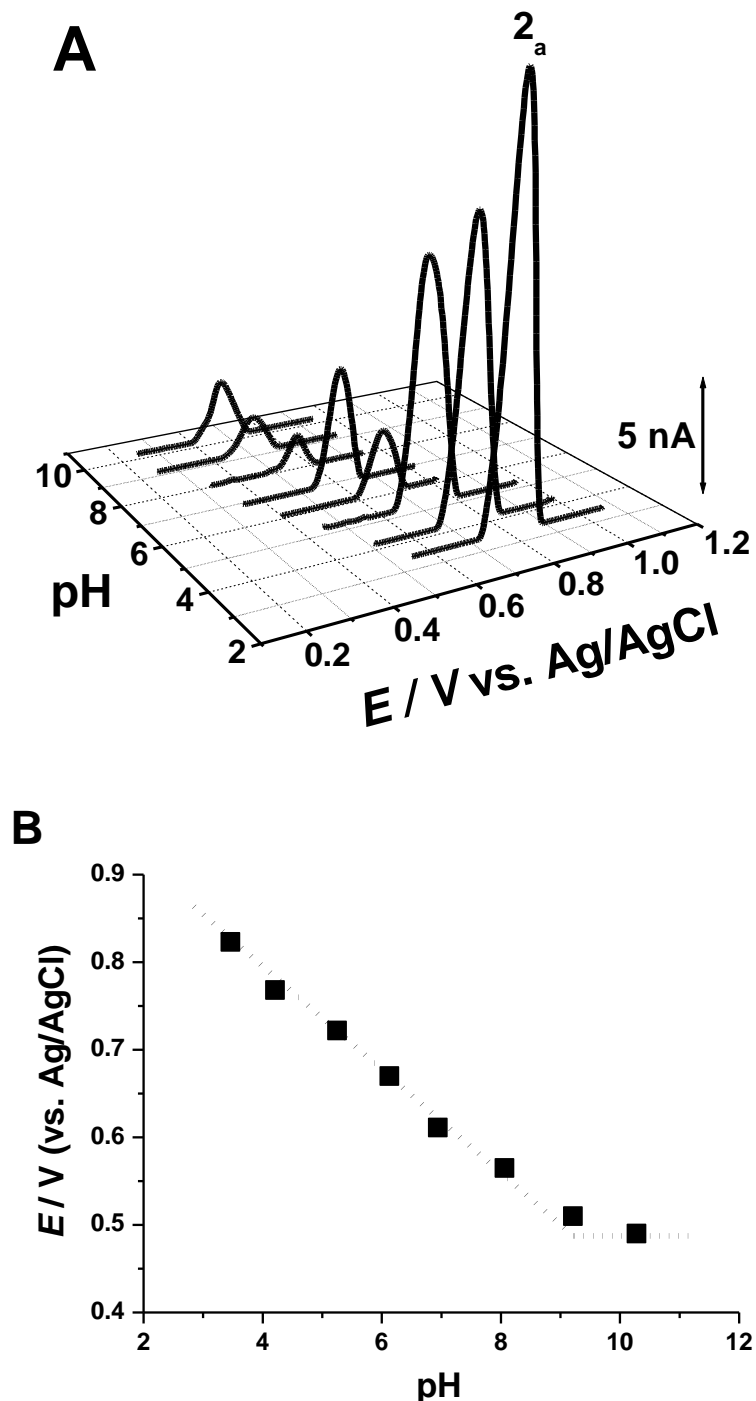


Figura 4.26. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1^a varredura sobre ECV obtidos em solução de SA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos, após 14 dias de incubação, em função do pH. (B) Relação do (■) E_p do pico 2_a com o pH. $\Delta E_s = 2$ mV, $\Delta E_t = 70$ ms e $v = 5$ mV s⁻¹.

Voltamogramas de pulso diferencial foram também registrados em todos os eletrólitos suporte após diferentes tempos de incubação, ou seja, 24, 48, 96 horas, 7 e 14 dias. A variação da corrente do pico 2_a com o tempo, [Figura 4.27](#), mostrou que a reação de formação do(s) produto(s) de degradação do SA foi favorecida em eletrólitos ácidos e diminuiu com o aumento do pH, tornando-se insignificante a partir de pH 6,0.

Esses resultados estão de acordo com a literatura ([ARYA, 1980](#)), que revelou que a degradação do SA em meio aquoso segue uma reação cinética de primeira-ordem ou pseudo-primeira-ordem e a taxa de reação é muito dependente da concentração de prótons. A taxa de reação de degradação decresce com o aumento do pH e torna-se insignificante em $\text{pH} > 5,0$. Uma vez que o pK_a do ácido carboxílico é 4,75, sugere-se que apenas as moléculas de SA não dissociadas são susceptíveis à degradação oxidativa em meio aquoso; moléculas ionizadas são degradadas de forma insignificante.

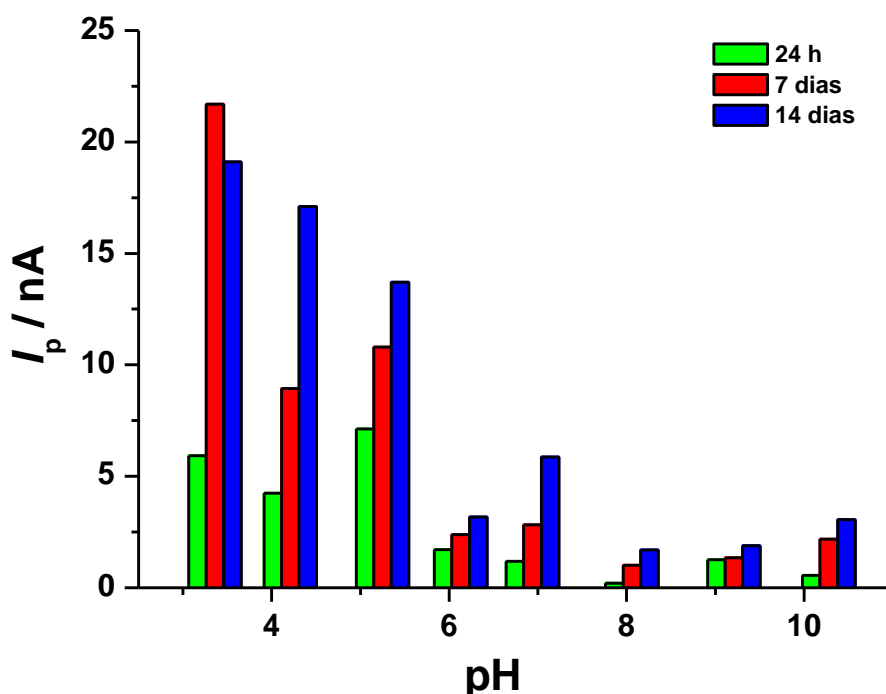


Figura 4.27. Variação da corrente do pico 2_a para 24 h, 7 e 14 dias de incubação em tampão em função do pH.

4.6.3.2 Voltametria de onda quadrada

Visando caracterizar os produtos obtidos durante o processo de degradação do ácido sórbico e compreender a reversibilidade de seu sistema, voltamogramas de onda quadrada foram registrados em diferentes eletrólitos suporte.

As varreduras voltamétricas realizadas em uma solução de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,4, após 20 dias de incubação, mostram o pico de oxidação 2_a , $E_{pa}^2 = + 0,87 \text{ V}$, [Figura 4.28A](#), na primeira varredura efetuada. A irreversibilidade dessa reação foi confirmada pela obtenção das componentes de corrente direta e reversa da corrente total, onde a componente direta mostrou o pico 2_a no mesmo potencial e com a mesma intensidade de corrente que a componente total obtida. A componente reversa não apresentou nenhum pico catódico, [Figura 4.28A](#).

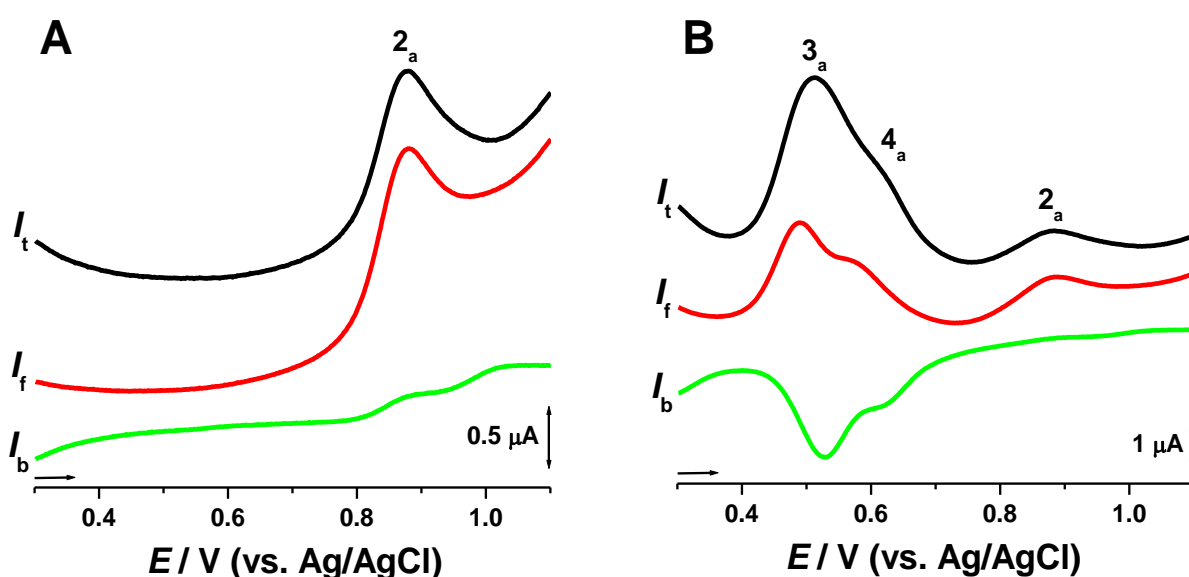


Figura 4.28. Voltamogramas de onda quadrada sobre ECV obtidos em solução de SA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada após 20 dias em tampão pH 3,4: (A) 1ª e (B) 2ª varreduras; I_t - corrente total, I_f - corrente direta, I_b - corrente reversa. $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, $v_{eff} = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A segunda varredura realizada apresentou os produtos de oxidação, pico 3_a , $E_{pa}^3 = + 0,51 \text{ V}$, e pico 4_a , $E_{pa}^4 = + 0,62 \text{ V}$, [Figura 4.28B](#). A

separação e demonstração da componente total de suas componentes direta e reversa confirmou a reversibilidade dessas duas reações, visto que as correntes e os potenciais de pico de oxidação e redução são iguais para ambas as reações, [Figura 4.28B](#).

4.6.3.3 Mecanismos de oxidação do ácido sórbico e dos seus produtos de degradação

Baseado nos resultados anteriormente descritos na VC, VPD e VOQ para o SA e sua degradação em solução aquosa, mecanismos de reação para a oxidação desse composto e dos seus produtos de degradação foram propostos.

Como já mencionado, a oxidação eletroquímica do SA, pico 1_a, [Figura 4.22](#), é um processo irreversível que ocorre em uma única etapa envolvendo a transferência de apenas um elétron. Esse processo não envolve a formação de nenhum produto de oxidação eletroativo.

A oxidação do SA tende a ocorrer nas duplas ligações entre C2 - C3 ou C4 - C5. Como a dupla ligação entre C2 - C3 se encontra próximo ao grupo carboxila, esse exerce um efeito protetor que dificulta o processo de oxidação e a dupla ligação entre C4 - C5 se torna mais susceptível. Portanto, o mecanismo de oxidação proposto para o SA, pico 1_a, [Figura 4.29](#), envolveu a quebra da dupla ligação entre C4 - C5 com a adição do grupo hidroxila na posição C5, pico 1_a, seguida pela desprotonação química do produto de oxidação ([LOPES et al., 2011](#)).

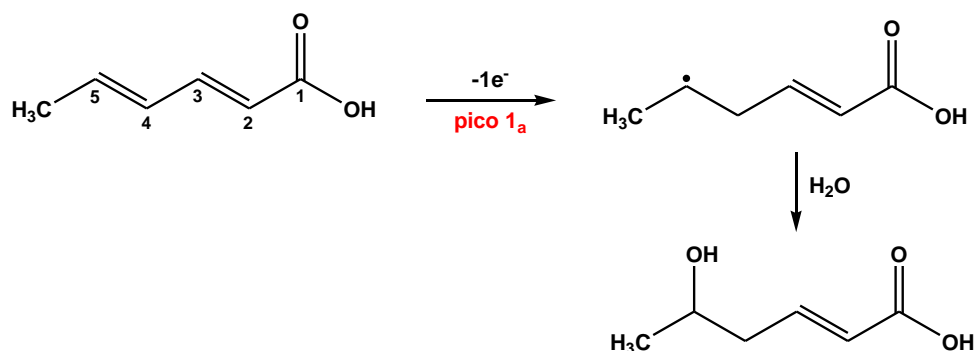


Figura 4.29. Mecanismo de oxidação proposto para o ácido sórbico.

Os resultados obtidos para o SA em solução tampão em vários tempos de incubação revelaram que essa molécula se degrada ao longo do tempo e a reação de formação do(s) produtos(s) de degradação eletroativo(s), pico 2_a, Figuras 4.24 e 4.27, foi favorecida em eletrólitos ácidos. Isso corrobora com o estudo apresentado por Arya (1980) sobre a estabilidade do SA em solução aquosa. Segundo a autora, após a incubação do SA em eletrólitos ácidos, a banda de absorção atribuída à dupla ligação conjugada do grupo carbonila na molécula do SA diminuiu com o aumento do tempo de incubação, indicando a degradação do SA. A taxa de degradação diminuiu com o aumento do pH e foi acompanhada pelo aumento simultâneo de carbonilas totais e o teor de malonaldeído. Como principais produtos de degradação dessa molécula em solução aquosa foram referidos o malonaldeído, crotonaldeído e acroleína (HILDEGARD e SABALITSCHKA, 1965; ARYA, 1980).

Diante disso, considera-se que o SA ao se degradar em solução tampão gera os produtos de degradação anteriormente mencionados. Uma vez que, a acroleína é uma molécula planar com os sistemas π das ligações duplas carbono-carbono e carbono-oxigênio sobrepostos, que aumentam a estabilidade do sistema conjugado, a sua oxidação exigiria uma quantidade de energia muito maior do que a do potencial aplicado ao ECV. Por essa razão, o pico 2_a foi considerado decorrente exclusivamente da oxidação eletroquímica do malonaldeído, que se encontra completamente enolizado em solução aquosa (MACDONALD e DUNFORD, 1989), e crotonaldeído.

Um mecanismo foi proposto para a oxidação do malonaldeído e crotonaldeído, pico 2_a, Figura 4.30. Esta reação envolveu a remoção de um elétron e um próton formando um íon radical, o qual reagiu com a água levando à formação de 2-hidroximalonaldeído (MARDER e SCHUERCH, 1959; MACDONALD e DUNFORD, 1989) e 2-hidroxicrotonaldeído, Figura 4.30. Esses produtos dihidroxilados sofreram

oxidação reversível, picos 3_a – 3_c e 4_a – 4_c, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons, [Figura 4.30 \(LOPES et al., 2011\)](#).

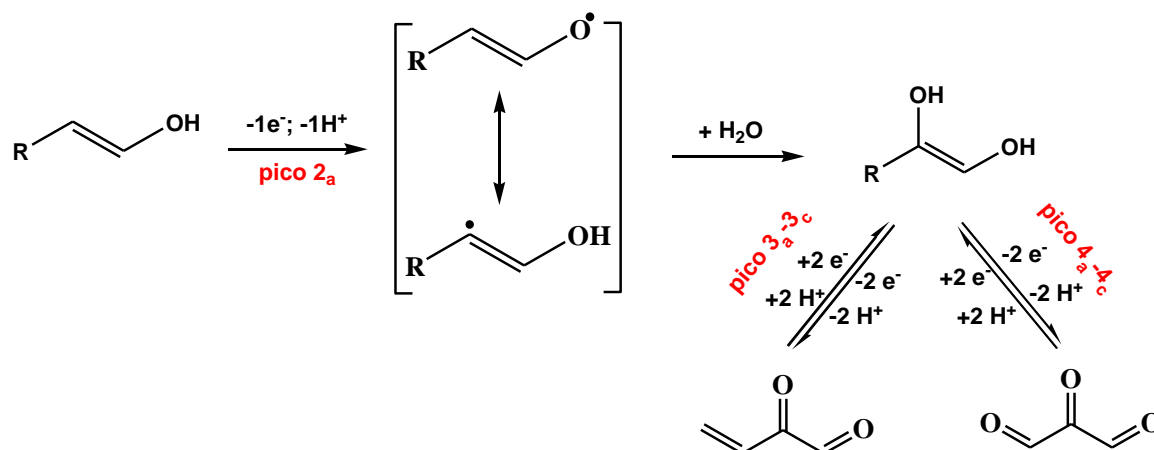


Figura 4.30. Mecanismo de oxidação proposto para os produtos de degradação do ácido sórbico: crotonaldeído (**R** é C = CH₂), malonaldeído (**R** é C = O).

4.7 Mecanismo de oxidação da MC-LR e dos seus produtos de degradação

Baseado nos resultados voltamétricos da MC-LR e sua degradação em solução aquosa, do 2-AAA e nos estudos voltamétricos e mecanísticos apresentados para o SA e os seus produtos de degradação em solução, mecanismos de reação para a oxidação da MC-LR e os seus produtos de degradação foram propostos.

Os experimentos realizados em soluções contendo os cinco aminoácidos comuns constituintes da MC-LR (Leu, Arg, Ala, Glu e Asp) não apresentaram resposta eletroquímica. Porém, os voltamogramas registrados em soluções de 2-AAA e SA (compostos de estruturas químicas similares aos aminoácidos Mdha e Adda, respectivamente) mostraram que ambos os compostos são oxidados eletroquimicamente em ECV. Desse modo, pôde-se concluir que os centros eletroativos da MC-LR correspondem a esses dois grupos.

Os potenciais de oxidação do 2-AAA e do SA, $E_{pa}^1 \approx 1,30$ V e $E_{pa}^1 \approx 1,36$ V, respectivamente ([Figuras 4.18 e 4.22](#)), foram ligeiramente

diferentes do potencial da MC-LR, $E_{pa}^1 \approx 1,06$ V (Figura 4.3), observados em DPV. Contudo, o comportamento eletroquímico dos três compostos foi similar. Conforme já relatado, a oxidação eletroquímica tanto da MC-LR, quanto do 2-AAA e SA, pico 1_a, é um processo irreversível ocorrido em uma única etapa, que envolve a transferência de um elétron e sem a formação de qualquer produto de oxidação eletroativo.

Baseado nesses resultados, mecanismos de oxidação da MC-LR em solução aquosa foram propostos, Figura 4.31.

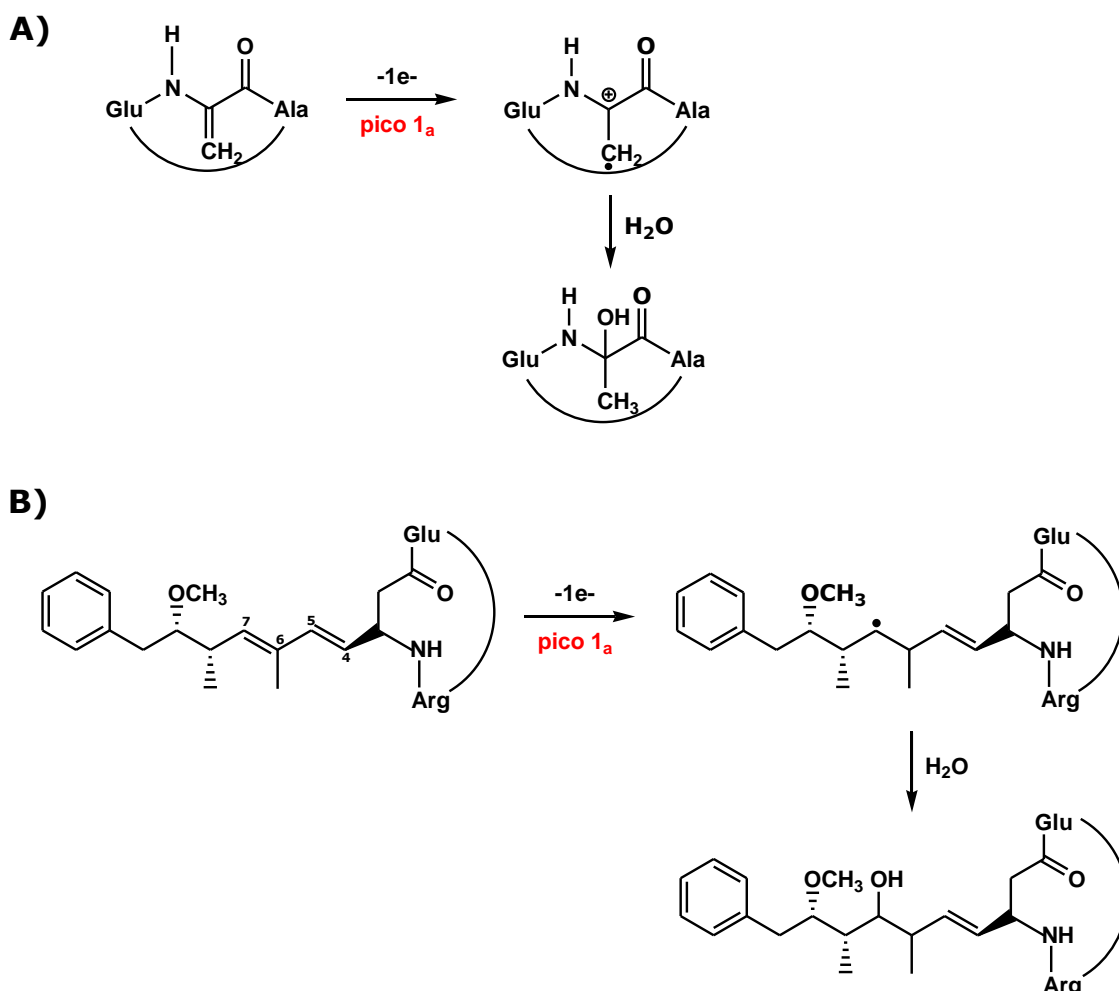


Figura 4.31. Mecanismos de oxidação propostos para a MC-LR: Oxidação nos aminoácidos Mdha (A) e Adda (B).

A oxidação do aminoácido Mdha, pico 1_a, ocorreu com a remoção de um elétron do grupo metileno, seguido pelo ataque nucleofílico direto da

água e a formação de um produto de oxidação hidroxilado, [Figura 4.31A](#). Por outro lado, a oxidação do aminoácido Adda, pico 1_a, baseada no mecanismo descrito para o SA ([Figura 4.29](#)), envolveu a quebra da dupla ligação entre C6 – C7 com a adição do grupo hidroxila na posição C7, seguida pela desprotonação química do produto de oxidação, [Figura 4.31B](#). Vale ressaltar a possibilidade de a transferência de elétron de ambos os centros eletroativos ter ocorrido simultaneamente, levando a formação de dois picos sobrepostos, ou seja, as duas reações de oxidação ocorreram ao mesmo tempo gerando um único pico (pico 1_a).

Os experimentos realizados em solução tampão após diferentes tempos de incubação mostraram que a MC-LR se degrada ao longo do tempo, com a formação de produto(s) de degradação, pico 2_a, [Figuras 4.8 e 4.12](#), que envolvem a transferência de um elétron e um próton. Além disso, a oxidação do(s) *pd*MC-LR envolve a formação de dois produtos de oxidação, picos 3_a e 4_a, que sofrem reações redox reversíveis com a transferência de dois elétrons e dois prótons, [Figuras 4.10 e 4.14](#).

Similarmente à MC-LR, o SA é conhecido por se degradar em solução aquosa ([ARYA, 1980; ARYA e THAKUR, 1988; HILDEGARD e SABALITSCHKA, 1965; YARRAMRAJU *et al.*, 2007](#)). Nos experimentos previamente descritos ([Seção 4.6](#)), o SA sofre degradação química em tampão com o tempo de incubação. Após a degradação química, o pico de oxidação do SA, pico 1_a, diminuiu, enquanto um novo pico ocorreu em valor de potencial mais baixo, pico 2_a, mostrando a formação homogênea de dois produtos de degradação. A oxidação dos produtos de degradação do SA levou à formação de duas espécies eletroativas, picos 3_a e 4_a, que como no caso da MC-LR sofrem reações redox reversíveis.

Dada a semelhança observada no comportamento eletroquímico dos dois compostos em estudo, o esquema de degradação da MC-LR e o mecanismo de oxidação de seus produtos de degradação em solução

foram propostos em conformidade com o mecanismo descrito para a oxidação dos produtos de degradação do SA apresentado na [Figura 4.30](#).

Diante disso, a [Figura 4.32](#) mostra o esquema proposto para a degradação da MC-LR em solução aquosa e o mecanismo de oxidação de seus produtos de degradação.

Após a incubação em soluções tampão, a cadeia lateral Adda da MC-LR foi separada da estrutura do anel peptídico. Esse processo pode ter ocorrido em dois diferentes lugares da cadeia, no C4 ou C6, dando origem a dois produtos de degradação eletroativos (1 e 2) contendo um grupo hidroxila, [Figura 4.32A](#), e a dois outros produtos de degradação (1' e 2'), consistentes com a MC-LR remanescente da estrutura do anel peptídico, [Figura 4.32A](#).

Isso é condizente com alguns trabalhos da literatura que revelaram que a degradação da MC-LR geralmente é iniciada no grupo Adda, principalmente nas duplas ligações conjugadas ([SONG *et al.*, 2006](#); [ANTONIOU *et al.*, 2008a](#); [ANTONIOU *et al.*, 2008b](#)). Segundo, [SONG *et al.*, 2006](#), o local mais susceptível à oxidação é nas duplas ligações conjugadas do grupo Adda, principalmente, por causa da sua posição na molécula da MC-LR. Um mecanismo proposto para a degradação fotocatalítica dessa toxina mostrou que a oxidação foi iniciada nas duplas ligações conjugadas do aminoácido Adda, formando MC-LR-enol *via* substituição por hidroxila no C7 e levando a remoção completa da cadeia Adda ([ANTONIOU *et al.*, 2008b](#)).

A formação do pico 2_a foi atribuído à oxidação dos produtos de degradação (1 e 2). Essa reação envolveu a remoção de um elétron e um próton formando um íon radical, o qual reagiu com a água levando à formação de produtos dihidroxilados, [Figura 4.32B](#). Esses produtos dihidroxilados sofreram oxidação reversível, picos 3_a – 3_c e 4_a – 4_c, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons, [Figura 4.32B](#).

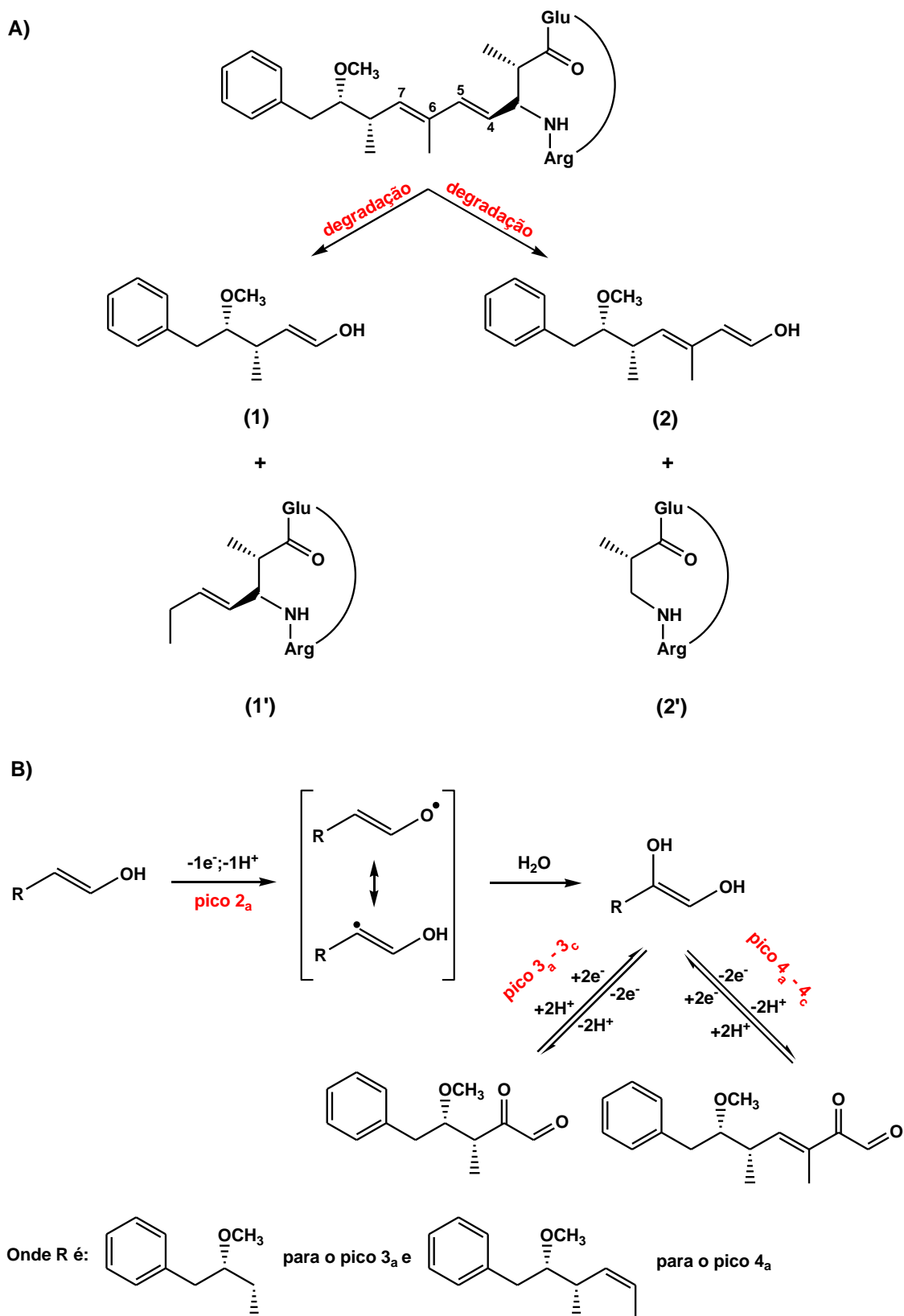


Figura 4.32. (A) Esquema proposto para a degradação química da MC-LR e (B) Mecanismo de oxidação proposto para os seus produtos de degradação em solução.

4.8 Estudo eletroanalítico da microcistina-LR

A detecção direta da MC-LR sobre um ECV, utilizando técnicas voltamétricas, pode ser uma maneira simples para determinar a presença desta toxina em águas naturais.

4.8.1 Curva analítica

Com o propósito de avaliar a possível aplicação do eletrodo de carbono vítreo como sensor voltamétrico para a detecção de MC-LR (pico 1_a), uma curva analítica foi obtida numa faixa linear de concentração de 5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 1,3 (procedimento descrito na [Seção 3.8](#)). Este eletrólito suporte foi escolhido devido a obtenção de maior sensibilidade para o pico da MC-LR.

A [Figura 4.33A](#) mostra os voltamogramas resultantes da adição das diferentes concentrações de MC-LR sobre ECV, onde é possível observar o aumento proporcional da corrente de pico com o aumento da concentração da toxina.

A dependência linear da I_p com a concentração da toxina em solução, [Figura 4.33B](#), mostrou que a curva de trabalho para a MC-LR sobre a superfície eletródica estudada pode ser expressa pela equação matemática:

$$\Delta I / nA = -8,36(\pm 1,44) + 1,62(\pm 0,09)[MC - LR] / \mu\text{molL}^{-1} \quad (3)$$

com um coeficiente de correlação $R = 0,9957$ para $N = 5$ e $SD = 1,37 \times 10^{-9}$.

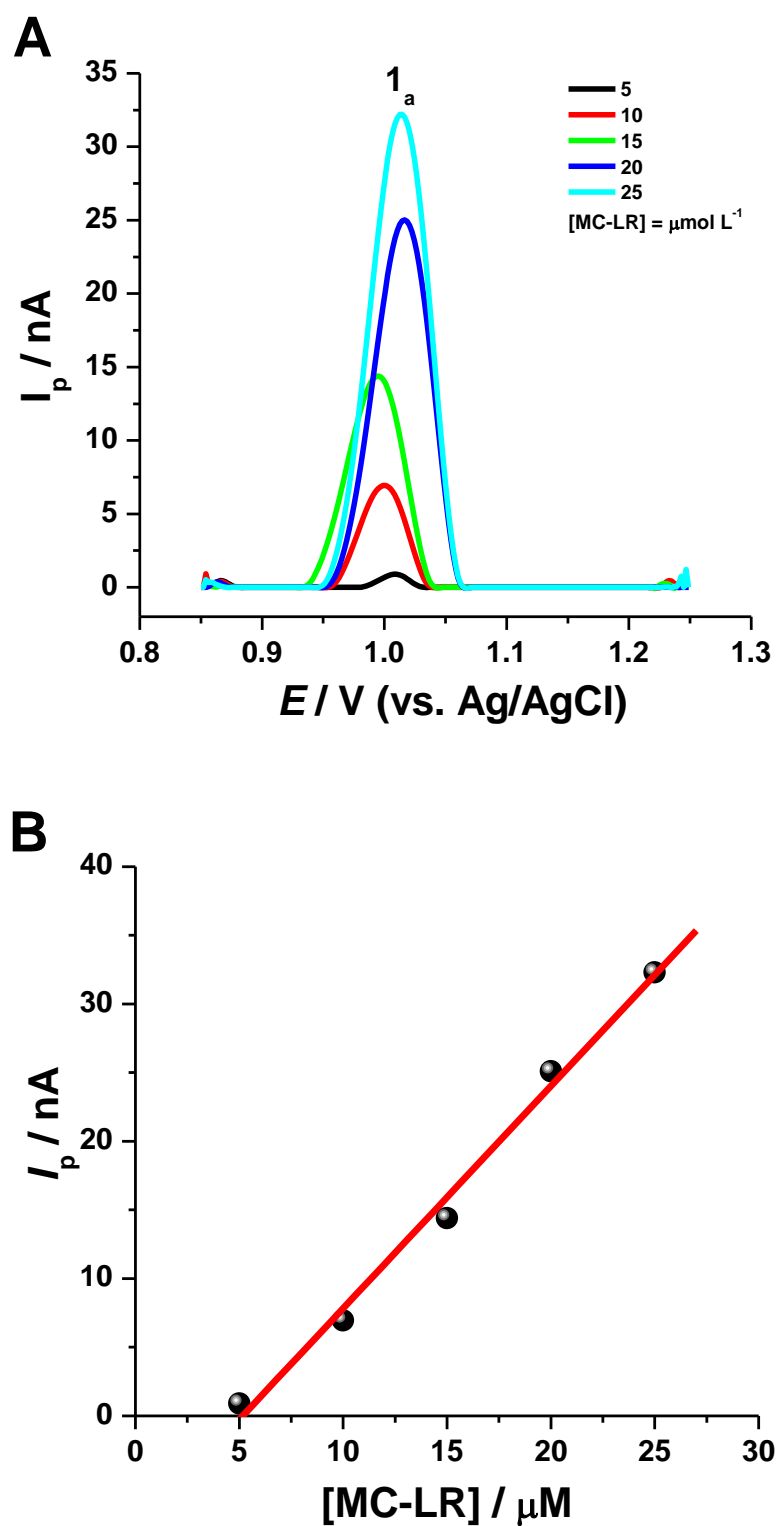


Figura 4.33. (A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida para oxidação da MC-LR, sobre ECV, em tampão pH 1,3, numa faixa linear de concentração de 5 à 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Relação da I_p com a concentração da MC-LR nas mesmas condições.

4.8.2 Figuras de mérito

Sabe-se que as figuras de mérito constituem os parâmetros requeridos para validação do método analítico proposto. Com esse intuito, avaliou-se o sistema quanto a sua sensibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Entende-se como sensibilidade de um método a capacidade que este tem, em determinado nível de confiança, de distinguir duas concentrações próximas (MOCAK *et al.*, 1997). Do ponto de vista prático a sensibilidade de calibração (IUPAC) constitui a inclinação da curva analítica (b), cujo valor encontrado foi da ordem de $1,62 (\pm 0,09) \frac{nA}{\mu mol L^{-1}}$, a qual foi utilizada para estimar os LD e LQ do método.

O LD foi calculado com base na Equação 3.1 (Seção 3.8.1). Foram registradas 20 medidas do branco a fim de estimar o desvio padrão da média aritmética ($S_b = 0,000752 \text{ nA}$), os quais são de extrema importância para avaliar a resposta da metodologia. Sendo assim, o LD obtido foi de $0,0014 \mu mol L^{-1}$ ($1,39 \mu g L^{-1}$). O LQ foi calculado mediante a Equação 3.2 (Seção 3.8.1) e o valor encontrado foi de $0,0046 \mu mol L^{-1}$ ($4,57 \mu g L^{-1}$). Esses limites estimados estão acima do valor limite estabelecido pela OMS para MC-LR total em água potável, que é de $1 \mu g L^{-1}$ (WHO, 1998). Além disso, eles não podem ser considerados aceitáveis, visto que seus valores estimados estão muito abaixo do esperado para as concentrações usadas na construção da curva analítica, Figura 4.33B. Esses resultados podem ser atribuídos ao polimento realizado na superfície do eletrodo entre cada medida, o qual pode levar a pequenas alterações na sua superfície, induzindo a um erro experimental. Sendo assim, tal procedimento provocou um deslocamento significativo de potencial de pico, Figura 4.33A, implicando na sensibilidade de calibração. Como já comentado na Seção 3.8, tal polimento foi necessário devido a adsorção dos produtos de oxidação da MC-LR na superfície do eletrodo.

4.9 Interação da microcistina-LR com DNA

A interação da MC-LR com *dsDNA* foi estudada a fim de investigar a ação dessa toxina na indução de mudanças conformacionais no DNA, clivagem das ligações de hidrogênio e/ou dano oxidativo nas bases do DNA. O efeito de interação foi investigado por VPD e espectrofotometria UV-Vis.

4.9.1 Avaliação voltamétrica *in situ* da interação da microcistina-LR com *dsDNA* utilizando biossensores de *dsDNA*

O estudo inicial da interação da MC-LR com o *dsDNA* foi feito mediante a imersão do biossensor eletroquímico de *dsDNA*, previamente preparado (Seção 3.9.1), numa solução recém-preparada de MC-LR e incubado durante 10 e 20 minutos. As concentrações da MC-LR testadas foram 30 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a incubação, o biossensor foi lavado com água deionizada, assegurando desse modo a remoção de moléculas não ligadas ao DNA e, em seguida, transferido para o tampão acetato pH 4,5.

Os biossensores de *dsDNA* de controle também foram preparados e analisados, conforme o procedimento descrito na Seção 3.9.1. Teve-se como objetivo assegurar que as mudanças observadas nos voltamogramas dos biossensores na presença de MC-LR foram de fato decorrentes da interação da MC-LR/*dsDNA* com o passar do tempo.

O efeito de interação da MC-LR/*dsDNA* foi observado comparando as alterações na intensidade de corrente dos picos de oxidação característicos do DNA - as bases purínicas desoxiguanosina (*dGuo*), $E_{pa} \approx + 1,05 \text{ V}$, e desoxiadenosina (*dAdo*), $E_{pa}^1 \approx + 1,30 \text{ V}$ (OLIVEIRA-BRETT e DICULESCU, 2004b) - com os biossensores de *dsDNA* de controle. A ocorrência dos picos dos produtos de oxidação da guanina e/ou adenina - os biomarcadores 8-oxoguanina (8-oxoGua) e 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) observados em $E_{pa}^1 \approx + 0,45 \text{ V}$ em tampão acetato pH 4,5 - é um

indicativo de dano oxidativo causado ao DNA (OLIVEIRA-BRETT, PIEDADE E SERRANO, 2000; DICULESCU, PIEDADE E OLIVEIRA-BRETT, 2007).

Em tampão acetato pH 4,5, o voltamograma registrado para o biossensor de *dsDNA* de controle mostrou a presença dos picos de oxidação: *dGuo* e *dAdo*, em $E_{pa}^1 = + 0,99$ V e $E_{pa}^2 = + 1,25$ V, respectivamente, Figura 4.34A.

Em outro experimento, Após 10 minutos de incubação de um novo biossensor de *dsDNA* na solução de MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se uma diminuição da intensidade das correntes dos picos da *dGuo* e *dAdo*, em comparação com os picos do *dsDNA* de controle. Transcorridos 20 minutos de incubação de um novo biossensor, os voltamogramas mostraram uma diminuição significativa das correntes dos picos de oxidação do *dsDNA*, Figura 4.34A. Isso mostra que a MC-LR interage com o *dsDNA* e indica que a diminuição dos picos *dGuo* e *dAdo* é consequência da redução do contato das bases do *dsDNA* com a superfície do eletrodo, que dificultou a transferência de elétrons, como resultado de mudanças conformacionais na dupla hélice do *dsDNA*. Essas modificações conformacionais podem ser explicadas pelo enrolamento da dupla hélice sobre si mesma, ou seja, a sua estrutura tornou-se condensada após interagir com a MC-LR.

Comportamentos similares foram observados nos picos de oxidação do *dsDNA* por Oliveira *et al.* (2009) e Corduneanu *et al.* (2010), quando investigaram a interação eletroquímica do *dsDNA* com a talidomida e quelatos de paládio com poliaminas biogênicas espermina e espermidina, respectivamente.

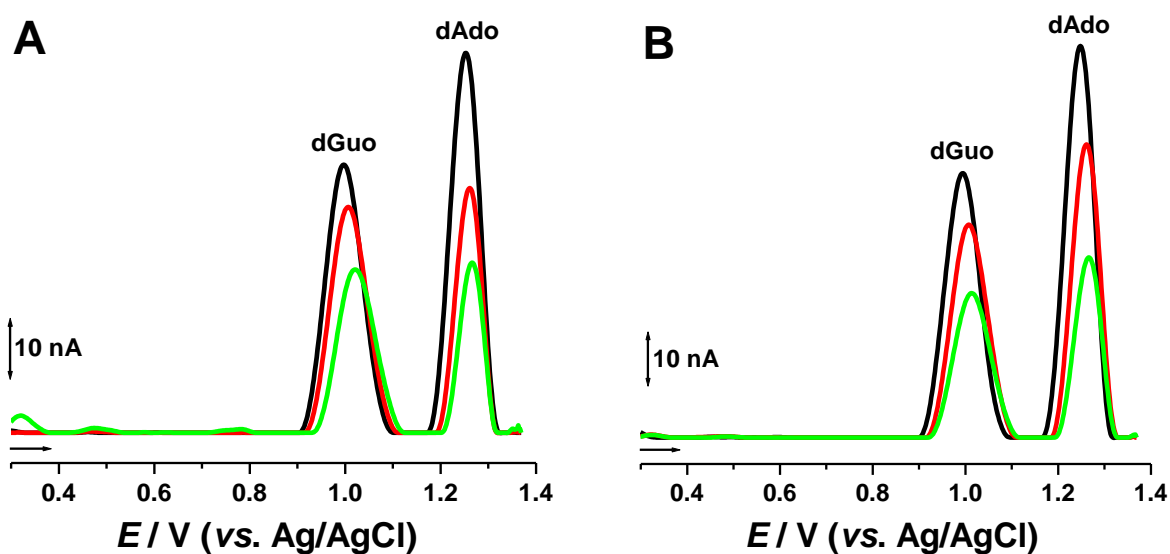


Figura 4.34. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos para o biossensor de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) e incubado durante 10 (—) e 20 minutos (—) numa solução de MC-LR em tampão acetato pH 4,5: (A) 30 e (B) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Nenhum outro pico anódico referente à oxidação da 8-oxoGua ou 2,8-DHA foi detectado nos voltamogramas resultantes, [Figura 4.34A](#). Isso é um indicativo de que não houve dano oxidativo ao *dsDNA* pela MC-LR nas condições experimentais estudadas.

Comportamento similar foi observado para a solução de MC-LR na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, [Figura 4.34B](#).

4.9.2 Avaliação voltamétrica *in situ* da interação da microcistina-LR com *dsDNA* utilizando soluções de *dsDNA* incubadas

O estudo da interação direta da MC-LR com *dsDNA* foi realizado através de soluções de *dsDNA* incubadas com esta toxina ([Seção 3.9.2](#)), a fim de observar a possível ocorrência de danos oxidativos ao *dsDNA* pela MC-LR durante longos tempos de incubação.

Soluções de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram incubadas com a MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão pH 4,5, durante 0, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas. As soluções de *dsDNA* de controle foram também preparadas e analisadas,

conforme o procedimento descrito na [Seção 3.9.2](#). A superfície do ECV foi sempre polida entre cada medida para evitar o decréscimo das correntes devido a adsorção do *dsDNA* após varreduras sucessivas.

Os efeitos da interação MC-LR/*dsDNA* foram obtidos por comparação dos sinais analíticos de oxidação da *dGuo* e *dAdo* na ausência e presença da MC-LR na solução.

O primeiro voltamograma registrado para a interação entre MC-LR/*dsDNA* revelou um aumento da intensidade da corrente de pico em +0,99 V logo após a adição da toxina na solução de *dsDNA*, quando comparado com o *dsDNA* de controle, [Figura 4.35A](#). Isso ocorreu devido à duas contribuições: a oxidação dos resíduos de *dGuo* das cadeias do *dsDNA* e a oxidação das moléculas de MC-LR, desde que respondem em potenciais similares. Comportamento análogo foi verificado por Oliveira *et al.* (2007), ao avaliar *in situ* a interação voltamétrica da ocratoxina A com *dsDNA*. Em contrapartida, a corrente de pico da *dAdo* diminuiu, [Figura 4.35A](#), provavelmente devido à uma interação da MC-LR com o *dsDNA*.

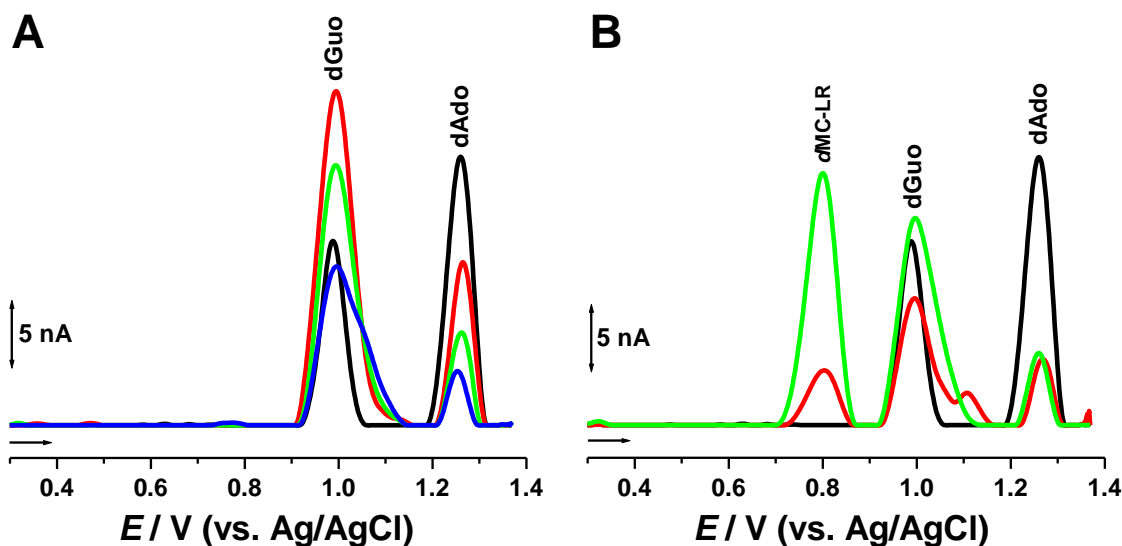


Figura 4.35. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida de uma mistura de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MC-LR $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,5, obtidos em um ECV: (A) (—) *dsDNA* de controle, (—) 0 h; (—) 2 h e (—) 6 h de incubação; (B) (—) *dsDNA* de controle, (—) 24 h e (—) 48 h de incubação. $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_t = 70 \text{ ms}$ e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Quando a solução de MC-LR/*dsDNA* foi investigada após 2 e 6 horas de incubação, a intensidade das correntes dos picos da *dGuo* e *dAdo* diminuiu sucessivamente com o aumento do tempo de incubação, [Figura 4.35A](#). O mesmo comportamento foi observado no estudo da interação da MC-LR/*dsDNA* utilizando biossensores de *dsDNA* ([Seção 4.9.1](#)). Sendo assim, a dupla hélice do *dsDNA* sofreu condensação, tornando-se uma estrutura compacta após interagir com a toxina. Esses experimentos mostram que a toxina interage e se liga às cadeias do *dsDNA*.

Após 24 horas de incubação, [Figura 4.35B](#), além da diminuição das correntes dos picos do *dsDNA*, houve o aparecimento de um novo pico em $E_{pa}^3 = + 0,80$ V. Como mostrado na [Seção 4.2.2](#), a MC-LR sofre degradação em solução ácida e, por conseguinte, o pico em + 0,80 V é devido à oxidação dos *pdMC-LR* em solução. A corrente desse pico aumentou consideravelmente após 48 horas de incubação, indicando um aumento da concentração dos *pdMC-LR*, [Figura 4.35B](#). Em adição, durante todos os experimentos executados foi observado o aumento da largura a meia altura do pico de oxidação em + 0,99 V com o aumento do tempo de incubação, [Figuras 4.35A e B](#). Porém, após 24 horas de incubação foi observado o seu desdobramento e a ocorrência de um novo pico em $E_{pa}^2 = + 1,12$ V referente à oxidação da MC-LR, [Figura 4.35B](#). Isso indica que as cadeias helicoidais do *dsDNA* podem ter sofrido um desenrolamento durante a interação com essa toxina deixando-a mais exposta na superfície do eletrodo.

Uma vez que, nenhum pico anódico correspondente aos picos de oxidação da 8 oxoGua ou 2,8-DHA foi observado em todos os voltamogramas registrados, conclui-se que, para as condições experimentais estudadas, não houve dano oxidativo ao *dsDNA* pela toxina em estudo. Embora, a literatura relate que a MC-LR causou danos oxidativos ao DNA quando foram investigados a sua capacidade em induzir danos ao DNA em célula de hepatoma humano (HepG2) ([ZEGURA,](#)

SEDMAK e FILIPIC, 2003) e os efeitos da MC-LR sobre o DNA em vários órgãos de camundongos (GAUDIN *et al.*, 2008), ambos utilizando o teste do cometa *in vivo*.

4.9.3 Avaliação espectrofotométrica *in situ* da interação da microcistina-LR com dsDNA

Medidas espectrofotométricas da interação da MC-LR com dsDNA foram realizadas a fim de averiguar os resultados observados nos estudos voltamétricos.

Para verificar se a MC-LR influencia na conformação do dsDNA, as diferenças entre os espectros de absorção de dsDNA foram monitorados na ausência e presença de MC-LR.

Os espectros de absorção registrados para o dsDNA de controle 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e MC-LR 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ são mostrados na Figura 4.36. A banda de absorção típica do dsDNA foi observada em $\lambda = 260$ nm, devido exclusivamente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das bases purina e pirimidina (RODGER e SANDERS, 2010) e a absorção referente à MC-LR foi obtida em $\lambda = 239$ nm, atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do aminoácido Adda, constituinte dessa toxina (SHI *et al.*, 2005).

O espectro registrado, logo após preparar a mistura MC-LR/dsDNA em tampão pH 4,5, exibiu somente uma banda em $\lambda = 238$ nm, porém com a intensidade de absorção diminuída, Figura 4.36. A intensidade da banda ocorrida em $\lambda = 260$ nm diminuiu drasticamente. Isso é um indício de que houve uma mudança conformacional na estrutura do dsDNA durante a incubação com a toxina, levando à condensação da estrutura de dupla hélice do DNA. Comportamento similar foi observado por Oliveira *et al.* (2009) ao estudar a interação espectrofotométrica *in situ* do fármaco talidomida com dsDNA.

Os resultados espectrofotométricos concordaram com os dados observados em VPD.

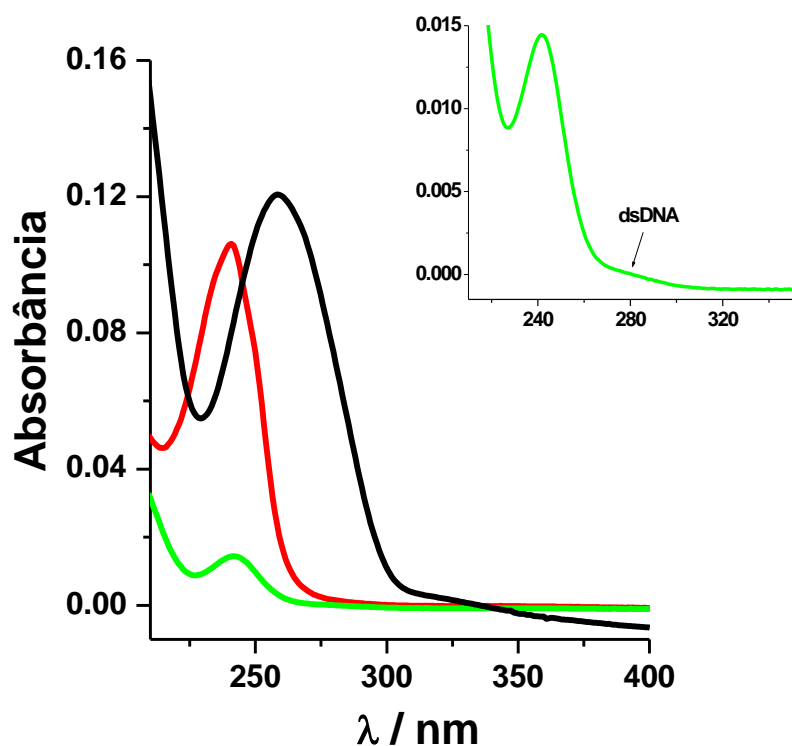


Figura 4.36. Espectros de absorção de: (—) *dsDNA* de controle $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; (—) MC-LR $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (—) solução de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtida imediatamente após a adição da MC-LR $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão pH 4,5. Inserção: espectro de absorção da mistura *dsDNA*/MC-LR entre 210 e 350 nm.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados por VC, VPD e VOQ evidenciaram que a MC-LR sofre oxidação eletroquímica sobre um ECV em um processo irreversível e independente do pH. Essa reação envolveu a transferência de apenas um elétron, sem a formação de qualquer produto de oxidação eletroativo.

Com o passar do tempo foi observado que a MC-LR sofre degradação química em solução tampão, levando à formação homogênea de dois produtos de degradação eletroativos. Esses produtos sofrem oxidação eletroquímica em um processo irreversível e dependente do pH. Além disso, a oxidação desses produtos levam à formação de duas espécies eletroativas que sofrem reações redox reversíveis em um processo dependente do pH.

O estudo cromatográfico da MC-LR confirmou a degradação dessa toxina em solução aquosa observada pelas técnicas voltamétricas.

Os experimentos obtidos por DPV em soluções contendo Leu, Arg, Ala, Glu e Asp não mostraram nenhuma resposta eletroativa, enquanto que os compostos 2-AAA e SA foram oxidados na superfície do ECV. Diante disso, os mecanismos de oxidação da MC-LR e dos seus produtos de degradação formados em solução aquosa foram propostos.

A partir do estudo eletroanalítico realizado por DPV, uma curva analítica foi obtida na faixa linear de concentração de 5 a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um LD = 0,0014 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1,39 $\mu\text{g L}^{-1}$) e LQ = 0,0046 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (4,57 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porém, os limites encontrados ainda não são considerados apropriados para a determinação desta toxina em águas naturais, uma vez que o valor limite estabelecido pela OMS para MC-LR total em água potável é de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, eles não podem ser considerados aceitáveis, visto que seus valores estimados estão muito abaixo do esperado para as concentrações usadas na construção da curva analítica.

Os resultados obtidos durante a investigação *in situ* da interação da MC-LR com *dsDNA*, por DPV e espectrofotometria UV-Vis, levaram a uma possível descrição dessa interação.

A MC-LR leva a modificações na estrutura da dupla hélice do *dsDNA* ao longo do tempo de incubação. Essa toxina interage e se liga às cadeias de estrutura rígida do *dsDNA* e também induz a sua condensação, confirmada pela diminuição da intensidade de corrente dos picos da *dGuo* e *dAdo* observada em VPD e pelo desaparecimento quase total da banda de absorção do *dsDNA* em espectrofotometria. Nenhum dano oxidativo ao *dsDNA* por essa toxina foi observado nos períodos de incubação estudados.

5.1 Perspectivas futuras

- Utilização da técnica de VOQ no desenvolvimento de um método analítico para a determinação da MC-LR em águas naturais, na intenção de minimizar os problemas associados ao envenenamento da superfície do eletrodo com os produtos de oxidação da toxina;
- Desenvolvimento de um analisador automático flow-batch e utilização de eletrodos quimicamente modificados na determinação da MC-LR em águas naturais, visando uma maior sensibilidade analítica;
- Investigação da interação da MC-LR com *dsDNA* por MFA, a fim de verificar as características morfológicas da superfície dos biossensores eletroquímicos de DNA durante a interação com a toxina.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVERCA, E. *et al*, Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line, *Toxicon*, **54(3): 283, 2009**

ANTONIOU, M.G. *et al*, LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. *Toxicon*, **51(6): 1103, 2008**

ANTONIOU, M.G. *et al*, Unveiling New Degradation Intermediates/Pathways from the Photocatalytic Degradation of Microcystin-LR. *Environmental Science & Technology*, **42(23): 8877, 2008**

ARYA, S. S., Stability of Sorbic Acid in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28: 1246, 1980**

ARYA, S. S.; THAKUR, B. R., Degradation Products of Sorbic Acid in Aqueous Solutions. *Food Chemistry*, **29: 41, 1988**

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 2001.

BATEMAN, K.P. *et al*, Mass-spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using online chromatographic and electrophoretic separations. *Journal of Chromatography A*, **712: 253, 1995**

BHATTACHARYA, R. *et al*, Liver slice culture for assessing hepatotoxicity of freshwater cyanobacteria, *Human and Experimental Toxicology*, **15: 105, 1996**

BISCHOFF, K., The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment, *Veterinary and Human Toxicology*, **43(5): 294, 2001**

BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J.; GORHAM, P.R., Isolation and identification of the past-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1, *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*, **37: 453, 1959**

BOURNE, D.G. *et al*, Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR, *Applied and Environmental Microbiology*, **62(11): 4086, 1996**

BRETT, A. M. O. *et al*, Voltammetric Behavior of Nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, **9: 1132, 1997**

BRETT, A. M. O., DNA-based biosensors. In: *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*. Amsterdam: (Series Ed. D. Barceló) Elsevier, 2005, Cap. 4. P. 179-208.

BRETT, A. M. O.; Brett, C. M. A., *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*. New York: Oxford University Press Inc., 1996, 471p.

BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A.-M., Atomic Force Microscopy of DNA Immobilized onto a Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrode Surface, *Langmuir*, **19: 3830, 2003**

BRETT, A. M. O.; CHIORCEA, A.-M., Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterisation, *Electrochemistry Communications*, **5: 178, 2003**

BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P., The electrochemical oxidation of DNA, *Journal of Brazilian Chemical Society*, **6(1): 97, 1995**

BRETT, A. M. O.; SERRANO, S.H.P.; PIEDADE, J.A.P., Electrochemistry of DNA. In: *Comprehensive Chemical Kinetics, Applications of Kinetic Modelling*. Amsterdam: Ed. R.G. Compton, Elsevier, 1999, V. 37, Cap. 3. P. 91-119.

BRETT, A.M.O. *et al*, DNA-electrochemical biosensors for investigating DNA damage. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, Cap. 20, 2007.

BRETT, A.M.O. *et al*, Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA, *Talanta*, **56: 959, 2002**

BRETT, A.M.O. *et al*, Synthetic oligonucleotides: AFM characterisation and electroanalytical studies, *Bioelectrochemistry*, **67: 181, 2005**

BRETT, A.M.O.; PIEDADE, J.A.P.; SERRANO, S.H.P., Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine, *Electroanalysis*, **12: 969, 2000**

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M. O.; SERRANO, S.H.P., On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **366: 225, 1994**

BRIAND, J.-F. *et al*, Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems, *Veterinary Research*, **34: 361, 2003**

CÀMPAS, M. *et al*, Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria, *Talanta*, **72: 179, 2007**

CÀMPAS, M.; OLTEANU, M. G.; MARTY, J.-L., Enzymatic recycling for signal amplification: Improving microcystin detection with biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **129(1): 263, 2008**

CAMPOS, C. A.; ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N., Studies of the effect of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) on sorbic acid degradation, *Food Research International*, **29(3-4): 259, 1996**

CARMICHAEL, W.W., The toxins of cyanobacteria, *Scientific American*, **270: 78, 1994**

CARMICHAEL, W.W.; FALCONER, I.R.S., Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, 1993, New York. P. 187–209.

CHIORCEA, A.-M.; BRETT, A. M. O., Atomic force microscopy characterization of an electrochemical DNA-biosensor, *Bioelectrochemistry*, **63: 229, 2004**

CHORUS, I. *et al*, Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **3: 323, 2000**

CLARKE, T. DNA's family tree, *Nature News*, April 24, 2003. Disponível em: <http://www.nature.com/news/2003/030424/full/news030421-5.html>>. Acessado em: 01 outubro 2010.

CODD G. A., MORRISON L. F., METCALF J. S., Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203(3): 264, 2005**

CODD, G. A.; BELL, S. G.; BROOKS, W.P., Cyanobacterial toxins in water, *Water Science and Technology*, **21: 1, 1989**

COOD, G. A., Cyanobacteria toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control, *Ecological Engineering*, **16: 51, 2000**

CORDUNEANU, O. *et al*, DNA Interaction with Palladium Chelates of Biogenic Polyamines Using Atomic Force Microscopy and Voltammetric Characterization, *Analytical Chemistry*, **82: 1245, 2010**

CORDUNEANU, O. *et al*, Lipoic acid–palladium complex interaction with DNA, voltammetric and AFM Characterization, *Talanta*, **77: 1843, 2009**

DAI, M. *et al*, Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **862: 43, 2008**

DAVID, G. B. *et al*, Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR, *Applied and Environmental Microbiology*, **62(1): 4086, 1996**

DAWSON, R.M., The toxicology of microcistins, *Toxicon*, **36: 953, 1998**

DEBERDT, G. L. B., NETO, R. C.; AGUJARO, L. F., Florações de cianobactérias e sua inserção na legislação brasileira. Disponível em: <<http://www.sanasa.com.br/document/noticias/589.pdf>>. Acessado em: 23 fevereiro 2011.

DICULESCU, V. C. *Desenvolvimento e aplicações do biossensor electroquímico com DNA*. Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2004. Tese de doutorado, 285p.

DICULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A. P.; OLIVEIRA-BRETT, A. M., *Bioelectrochemistry*, **70: 141, 2007**

DING, W.X. *et al*, Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China, *Mutation Research*, **442: 69, 1999**

DUY, T. N. *et al*, "Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue green algae) toxin in water". In: *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, **163: 113, 2000**

ETCHEGARAY, A., BUENO, C. C.; TESCHKE, O., Identificação de microcistina-LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. *Química Nova*, **33(9): 1843, 2010**

FALCONER, I.R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria, *Environmental Toxicology and Water Quality*, **6(2): 177, 1991**

FALCONER, I.R., An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drink water and recreational water, *Environmental Toxicology*, **14(1): 5, 1999**

FASMAN, G. D. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3 ed., CRC Press, Cleveland, OH, 1975, p. 589.

FASTNER, J. *et al*, Microcystins (Hepatotox hepatopeptides) in german fresh water bodies, *Environmental Toxicology*, **14(1): 13, 1999**

FENG, N. S. *et al*, Electrochemical Degradation of Microcystin-LR, *Journal of Environmental Science and Health*, **40: 453, 2005**

FERRÃO-FILHO, A. S., KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; AZEVEDO, S. M. F. O., Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community, *Aquatic Toxicology*, **59: 201, 2002**

FOJTA, M. In: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins. Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*, E. Paleček, F. Scheller, J. Wang (Eds.), Amsterdam: Elsevier, 386-431, 2005.

FOJTA, M., Electrochemical sensor for DNA interactions and damage, *Electroanalysis*, **14: 1449, 2002**

GÁBOR, V. *et al*, Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **66(1-3): 87, 2006**

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, *Mutation Research*, **652(1): 65, 2008**

GHICA, M.E.; BRETT, A. M. O., Electrochemical oxidation of rutin, *Electroanalysis*, **17(4): 313, 2005**

GOYAL, R.N.; KUMAR, A.; MITTAL, A., Oxidation chemistry of adenine and hydroxyadenine at pyrolytic graphite electrodes, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, **2: 1369, 1991**

GREEF, R. *et al*, Instrumental Methods in Electrochemistry, *Southampton Electrochemistry Group*, 1985.

GRETCHEN D. O. *et al*, Selective Oxidation of Key Functional Groups in Cyanotoxins during Drinking Water Ozonation, *Environmental Science and Technology*, **41: 4397, 2007**

GRIFFITHS, A.J.F. *et al*, *Modern Genetic Analysis*, New York: W.H. Freeman & Co., K.E., 1999.

GROSSE, Y. *et al*, "Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins", *Lancet Oncology*, **7(8): 628, 2006**

HALDEREN, A. V. *et al*, Cyanobacterial (blue-green algae) poisoning of livestock in the western Cape Province of South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, **66: 260, 1995**

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a ed., Oxford University Press, 1999.

HARADA K.; TSUJI, K., Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment, *Journal of Toxicology-Toxicology Review*, **17: 385, 1998**

HARADA, K. *et al*, Structural determination of geometrical-isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by 2-Dimensional NMR spectroscopic techniques, *Chemical Research in Toxicology*, **3: 473, 1990**

HAYNES, W. M. 2011. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 91st Edition (Internet Version). Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor and Francis.

HILDEGARD, M.; SABALITSCHKA, Th. 1965. Instability of sorbic acid. IV. Stabilization of sorbic acid with propyl gallate. *Seifen-Oele-Fette-Wachse*, 91(21): 720-722; *Chemical Abstracts*, 1966, 64, 7271f.

HITZFELD, B.C., HOGER, S.J., DIETRICH, R., Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environmental Health Perspectives*, **10: 113, 2000**

HONKANENER, R. *et al*, Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, *Journal of Biological Chemistry*, **265: 19401, 1990**

HOOSER, S.B *et al*, Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa* to rats and mice, *Veterinary Pathology*, **26: 246, 1989**

HUMBLE, A.V.; GADD, G.M.; CODD, G.A., Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography, *Water Research*, **31(7): 1679, 1997**

HUMPHREYS, M.W.; PARSONS, R., Ellipsometry of DNA adsorbed at mercury-electrodes – a preliminary – study, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **75: 427, 1977**

IARC, 2006. Cyanobacterial Peptide Toxins. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-cyanobacteria.pdf>>. acessado em: 02 março 2011.

IKEDA, O.; SHIROTA, Y.; SAKURAI, T., Electrical communication between heart cytochrome-C and electrodes in the presence of DNA or RNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **287: 179, 1990**

ITO, E. *et al*, Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR, *Toxicol*, **35: 1453, 1997**

JAYARAJ, R.; ANAND, T.; RAO, P. V. L., Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice, *Toxicology*, **220: 136, 2006**

JOCHIMSEN, E. M. *et al*, Liver failure and death after exposure to mycrocistins at a hemodialysis center in Brazil, *New England Journal of Medicine*, **338: 873, 1998**

KELLEY, S.O., *et al*, Orienting DNA helices on gold using applied electric fields, *Langmuir*, **14(24): 6781, 1998**

LABUDA, J. *et al*, Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report)*, *Pure Applied Chemistry*, **82(5): 1161, 2010**

LA-SCALEA, M. A; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R., Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise, *Química Nova*, **22: 417, 1999**

LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J., Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters, *Chemical Society Reviews*, **28: 217, 1999**

LONG, F. *et al*, Portable optical immunosensor for highly sensitive detection of microcystin-LR in water samples, *Biosensor Bioelectronical*, **24(8): 2346, 2009**

LOPES, I. C. *et al*, Sorbic acid and its degradation products: electrochemical characterization, *Analytical Letters (in press)*

MAATOUK, I., *et al*, Detection by ³²P-postlabelling of 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR- and nodularin-induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver, *Mutation Research*, **564: 9, 2004**

MACDONALD, I. D.; DUNFORD, H. B., Mechanism of horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of malonaldehyde, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **272(1): 185, 1989**

MACKINTOSH, C. *et al*, Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants, *FEBS Letters*, **264: 187, 1990**

MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O., Microcystin contamination in fish from Jacaré Paguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, **39: 1077, 2001**

MANKIEWICZ, J. *et al*, Natural toxins from cyanobacteria, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **45(2): 9, 2003**

MARDER, H. L.; SCHUERCH, C., Periodate Oxidation of Compounds Related to Malondialdehyde, *The Journal of Organic Chemistry*, **24(12): 1977, 1959**

MERILUOTO, J. *et al*, Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **810(1-2): 226, 1998**

MERILUOTO, J., Chromatography of microcystins, *Analytica Chimica Acta*, **352: 277, 1997**

MIRURA, G.A. *et al*, Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR in fasted rats, *Toxicon*, **27: 1229, 1989**

MOCAK, J. *et al.*, A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques, *Pure & Applied Chemistry*, **69(2): 297, 1997**

MOMANI, F. A.; SMITH, D. W.; EL-DIN, M. G., Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes, *Journal of Hazardous Materials*, **150: 238, 2008**

MSAGATI, T. A.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D., Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins, *Aquatic Toxicology*, **78: 382, 2006**

NISHIWAKI, S. *et al.*, Rapid purification of protein phosphatase 2A from mouse brain by microcystin-affinity chromatography, *FEBS Letters*, **279(1): 115–118, 1991**

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R. *et al.*, Liver tumour promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **118: 420, 1992**

O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG R. A., Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. *Analytical Chemistry*, **53(4): 695, 1981**

O'DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G., Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **345(1-2): 287, 1993**

OLIVEIRA, S. C. B. *et al.*, Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and in situ evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical DNA-biosensor, *Analytica Chimica Acta*, **588: 283, 2007**

OLIVEIRA, S. C. B. *et al.*, *In situ* electrochemical and AFM study of thalidomide–DNA interaction, *Bioelectrochemistry*, **76: 201, 2009**

OLIVEIRA, S. C. B.; CORDUNEANU, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. M., *In situ* evaluation of heavy metal–DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor, *Bioelectrochemistry*, **72: 53, 2008**

OLIVEIRA-BRETT, A. M. *et al.*, Electrochemistry of nanoscale DNA surface films on carbon, *Medical Engineering & Physics*, **28: 963, 2006**

OLIVEIRA-BRETT, A. M. *et al*, Voltammetric determination of all DNA nucleotides, *Analytical Biochemistry*, **332: 321, 2004**

OLIVEIRA-BRETT, A. M. O. *et al*, Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, **13: 861, 1998**

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; DICULESCU, V. C., Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part I. Analysis in incubated solutions, *Bioelectrochemistry*, **64: 133, 2004**

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; DICULESCU, V. C., Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors, *Bioelectrochemistry*, **64: 143, 2004**

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A. P.; SERRANO, S. H. P., *Electroanalysis*, **12: 969, 2000**

OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A., Square wave voltammetry, *Analytical Chemistry*, **57(1): 101A, 1985**

PACE, J.G. *et al*, Toxicity and kinetics of [³H] microcystin-LR in isolated perfused rat livers, *Toxicology Applied Pharmacological*, **107: 391, 1991**

PALECEK, E., Past, present and future of nucleic acids electrochemistry, *Talanta*, **56: 809, 2002**

PARK, H.-D., *et al*, Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology*, **16: 337, 2001**

PEARSON, L. *et al*, On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin, *Marine Drugs*, **8: 1650, 2010**

PIEPADE, J. A. P. *et al*, Voltammetric determination of γ radiation-induced DNA damage, *Analytical Biochemistry*, **355: 39, 2006**

POIRIER, M.C.; WESTON, A.; JOSEPH, R.B., DNA Damage, DNA Repair and Mutagenesis. In: *Encyclopedia of Cancer*. New York: Academic Press, 2002.

PONTINHA, A. D. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. *Electrochemical Oxidation of Metolazone at a Glassy Carbon Electrode*, *Electroanalysis*, **20(23): 2531, 2008**

PYO, D. *et al*, Microcystin Detection Characteristics of Fluorescence Immunochromatography and High Performance Liquid Chromatography, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **26(2): 268, 2005**

RAO, P. V. L. Cyanobacterial toxins: effects and control measures. In: Flora, S.J.S., Romano, J.A., Baskin, S.I., Sekhar, K. (Eds.), *Pharmacological Perspectives of Toxic Chemicals and their Antidotes*. Narosa Publishing House, New Delhi, 2004. P. 179–196

RAO, P.V. *et al*, Toxicity evaluation of in vitro cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Part 1. Hepatotoxic and histopathological effects in rats, *Biomedical Environmental Science*, **8: 254, 1995**

RAO, P.V.; BHATTACHARYA, R., The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo, *Toxicology*, **114: 29, 1996**

REPAVICH, W. M. *et al*, Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity, *Water Research*, **24: 225, 1990**

ROBERTSON, P.K.J., LAWTON, L.A.; CORNISH, B.J.P.A., The involvement of phycocyanin pigment in the photodecomposition of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **3: 544, 1999**

RODGER, A.; SANDERS, K. Biomacromolecular Applications of UV-Visible Absorption Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Coventry (UK), 2^a ed., 2010. P. 166-173.

SADIK, O. A.; EMON, J. V., Applications of electrochemical immunosensors to environmental monitoring, *Biosensor and Bioelectronics*, **11(8): i, 1996**

SAKER, M. L.; THOMAS, A. D.; NORTON, J. H., Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a outback region of North Queensland. *Environmental Toxicology*, **1(14): 179, 1999**

SANCHES, S. M. *et al*, Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico, *Eclética Química*, **32(4): 43, 2007**

SANO, T., *et al*, NIES certified reference material for microcystins, hepatotoxic cyclic peptide toxins from cyanobacterial blooms in eutrophic water bodies, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391(6): 2005, 2008**

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P., Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacterial from Brasil, *Nova Hedwigia*, **71(3-4): 359, 2000**

SAPPINGTON, P. L. *et al*, The ethyl pyruvate analogues, diethyl oxalopropionate, 2-acetamidoacrylate, and methyl-2-acetamidoacrylate, exhibit anti-inflammatory properties in vivo and/or in vitro, *Biochemical Pharmacology*, **70: 1579, 2005**

SEEMAN, N.C., DNA nanotechnology: Novel DNA constructions, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **27: 225, 1998**

SENGPRACHA, W.; SUVANNACHAI, N. E.; PHUTDHAWONG, W., Microcystin LR Content in *Microcystis aeruginosa*, Kütz Collected from Sri Sakhet, Thailand, *Chiang Mai Journal of Science*, **33(2): 231, 2006**

SÉQUARIS, J. M.; VALENTA, P., AC voltammetry: a control method for the damage to DNA caused in vitro by alkylating mutagens, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **227: 11, 1987**

SHENG, J.-W.; HE, M.; SHI, H.-C., A highly specific immunoassay for microcystin-LR detection based on a monoclonal antibody, *Analytica Chimica Acta*, **603: 111, 2007**

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

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P., Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349: 431, 1991**

SHORT, S. B.; EDWARDS, W. C., Blue-green algae toxicosis in Oklahoma, *Veterinary Human Toxicology*, **32: 558, 1990**

SIVONEN, K., JONES, G., Cyanobacterial toxins. In: *Chorus I, Bartram J, editors. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon. 1999. P. 41-111.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A., *Princípios de análise Instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

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

SONG, W. *et al*, Ultrasonically Induced Degradation of Microcystin-LR and -RR: Identification of Products, Effect of pH, Formation and Destruction of Peroxides, *Environmental Science & Technology*, **40: 3941, 2006**

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos, *Química Nova*, **26: 81, 2003**

SUZUKI, H. *et al*, Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells, *International Journal of Molecular Medical*, **2: 109, 1998**

TANAKA, Y. *et al*, Levels of microcystins in Japanese Lakes, *Toxicology Environmental Chemistry*, **39: 21, 1993**

TEIXEIRA, M. *et al*, Gastroenteritis epidemic in the area of Itaparica Dam, Bahia, Brasil, *Bulletin of the Pan American Health Organization*, **27: 244, 1993**

TSUJI, K. *et al*, Analysis of microcystins in sediments using MMPB method, *Toxicon*, **39: 687, 2001**

TSUJI, K. *et al*, Stability of microcystins from cyanobacteria. Part IV. Effect of chlorination on decomposition, *Toxicon*, **35: 1033, 1997**

TSUJI, K. *et al*, Stability of microcystins from cyanobacteria—II. Effect of UV light on decomposition and isomerization, *Toxicon*, **33: 1619, 1995**

UENO, Y. *et al*, Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay, *Carcinogenesis*, **17: 1317, 1996**

VELA, L. *et al*, Exploring the interaction of microcystin-LR with proteins and DNA, *Toxicology in Vitro*, **22: 1714, 2008**

WATANABE, M. F. *et al*, Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*, *Nature Toxic*, **1: 48, 1992**

WELKER, M., DOHREN, H. V., Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiology Review*, **30: 530, 2006**

WHO, Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. In: Guidelines for drinking for water quality. 2^a Ed. Addendum to Vol. 2. *Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva: 1998. P. 95-110.

YAN, F. *et al*, Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species, *Electrochemistry Communications*, **3: 224, 2001**

YAN, F.; OZSOZ, M.; SADIK, O. A., Electrochemical and conformational studies of microcystin-LR. *Analytica Chimica Acta*, **409: 247, 2000**

YARRAMRAJU, S. *et al*, Investigation of sorbic acid volatile degradation products in pharmaceutical formulations using static headspace gas chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, **44: 456, 2007**

YOSHIZAWA, S. *et al*, Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity, *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, **116: 609, 1990**

YU, S. *Drinking Water and Primary Liver Cancer*; China academic publishers: New York, NY, USA, 1989.

YU, S., Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology Hepatology*, **10: 674, 1995**

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M., The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage, *Toxicology*, **200: 59, 2004**

ZEGURA, B.; SEDMAK, B.; FILIPIC, M., Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2, *Toxicon*, **41: 41, 2003**

