Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Biocélulas a combustível metanol e etanol/O₂: Preparação e caracterização de biocátodos

FRANCIANE PINHEIRO CARDOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

Orientadora: Prof. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade

Ribeirão Preto
2014

FRANCIANE PINHEIRO CARDOSO

Biocélulas a combustível metanol e etanol/O₂: Preparação e
caracterização de biocátodos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Prof^a Dr^a Adalgisa Rodrigues de
Andrade

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pinheiro Cardoso, Franciane

Biocélulas a combustível metanol e etanol/O₂: preparação e caracterização de biocátodos

55p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, Área: Química.

Orientadora: De Andrade, Adalgisa Rodrigues.

1. Biocélula a combustível. 2. PAMAM. 3. Biocátodo 4. Imobilização de enzimas.

Agradecimentos

À profa. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade, pessoa excepcional com quem tive o prazer e o orgulho de conviver esses quatro anos. Agradeço pela, atenção, compreensão, amizade, paciência e acima de tudo pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa.

Ao meu amado marido Renato que sempre esteve ao meu lado, compartilhando dos meus sonhos, me apoiando incondicionalmente em todos os momentos, dando força e carinho em todas as horas. Jamais conseguiria expressar em poucas palavras o meu agradecimento, portanto é a você Renato que dedico essa tese.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo longe sempre deram força e acreditaram em mim!!! Amo vocês e agora estou voltando pra perto de vocês.....

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de existir e estar ao nosso lado em alguns momentos. A essas pessoas chamamos amigos. Fico feliz em olhar para trás e ver quantos amigos fiz nessa caminhada, e mesmo correndo o inevitável riscos de omissão, agradecerei nominalmente cada um deles.

Aos amigos Sidney (Neto) e Laís, que me mostraram como o trabalho em equipe é importante, produtivo e agradável, afinal juntos somos muito melhores!!! Vocês dois sabem como foram importantes na finalização desse trabalho.

Ao amigo Thiago Almeida, que se tornou um grande irmão, não só pela presença constante, como pelo companheirismo, amizade e atenção.

Aos amigos(as) do laboratório Fabiana, Lívia, Layciane, Paula, Ângelo, Rodrigo, Thiago Cavassani e Élen pelas longas conversas, companheirismo, amizade, horas de descontração e principalmente pelo carinho.

Jamais me esquecerei de vocês amigos !!!!

Ao CNPq pela bolsa de estudos, e à FFCLRP/USP-RP pelas oportunidades concedidas.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho chegasse ao fim.

Muito obrigada!!!

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Capítulo 1	1
1. Introdução	2
1.1. Aspectos Gerais	2
1.2. Biocélulas a Combustível.....	5
1.3. As biocélulas a combustível enzimáticas: Transferência eletrônica direta (TED) e mediada (TEM).....	6
1.3.1. Transferência Eletrônica Direta	8
1.3.2. Transferência Eletrônica Mediada.....	9
1.4. Processos de imobilização e estabilização de enzimas.....	12
1.4.1. O dendrímero PAMAM	14
1.5. A enzima lacase	16
1.5.1. Mediadores	18
1.5.2. Ciclo catalítico da enzima lacase	20
1.6. Reação de Redução de Oxigênio- Biocátodo	21
1.7. Principais Características de desempenho em Biocélulas a combustível ..	24
1.8. Breve histórico do desenvolvimento	25
Capítulo 2	30
2. Objetivo	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31
Capítulo 3	33
3. Parte Experimental	34
3.1. Materiais e Métodos	34
3.1.1. Reagentes	34
3.1.2. Síntese dos complexos metálicos utilizados como mediadores.....	35
3.1.3. Determinação da atividade enzimática pelo método contínuo	36

Sumário

3.1.4. Eletropolimerização dos eletrocatalisadores Verde de Metileno e Azul de Meldola.	38
3.1.5. Eletropolimerização do filme de polipirrol com os mediadores: ABTS, Porfirina de Ferro(III), Ferroceno, Complexo de Ósmio e Rutênio	39
3.1.6. Imobilização enzimática sobre o tecido de carbono eletropolimerizado com diferentes eletrocatalisadores.....	39
3.1.7. Teste de biocélula Etanol//O ₂ e Metanol//O ₂	40
Capítulo 4	42
Conclusões Finais.....	42
4.1. Conclusões Finais.....	43
Capítulo 5: <i>Curriculum vitae</i>	46
Capítulo 6	49
Referências Bibliográficas	49
6.1. Referências Bibliográficas	50

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo do funcionamento de uma célula a combustível tradicional ácida.....	3
Figura 2. Representação esquemática de uma biocélula a combustível.	6
Figura 3. Representações esquemáticas dos tipos de transferência de e^- possíveis entre as enzimas e os eletrodos em uma biocélula a combustível. (A) = transferência de elétrons direta. (B) = transferência de elétrons mediada. Modificado de Aquino Neto [11]......	7
Figura 4. Representação do procedimento de adsorção no processo de automontagem. Modificado de De Sousa Luz <i>et al.</i> [42]......	13
Figura 5. Esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM geração 4.	15
Figura 6. Esquema representativo dos sítios catalíticos da enzima Lacase. Modificado de Enguita [51]......	17
Figura 7. Ciclo catalítico da lacase (modificado e simplificado de Durán <i>et al.</i> 2002 [58]).	21
Figura 8. Mecanismos de redução do oxigênio [59]......	22
Figura 9. Esquema da reação eletrocatalítica de redução de oxigênio em um sistema mediador/enzima. Modificado de Barton <i>et al.</i> 2005[8].	24
Figura 10. Pesquisa bibliográfica conduzida na base de dados do Chemical Abstracts utilizando o termo “biofuel cell”. Fonte: SciFinder Scholar Atualizado de Aquino Neto[11]......	26
Figura 11. Ilustração do procedimento utilizada no experimento de cinética enzimática.....	36
Figura 12. Espectro representativo de absorção UV nos estudos cinéticos da Lacase.	37
Figura 13. Representação esquemática do biocátodo preparado.	40
Figura 14. Esquema representativo da célula eletroquímica utilizada para as medidas de densidade de potência.	41

Lista de Tabelas

Tabela 1- Mediadores da enzima lacase [23, 53, 56].....	19
Tabela 2- Revisões sobre biocélulas a combustível publicada a partir do ano 2000.	28

Resumo

CARDOSO F. P. **Biocélulas a combustível metanol e etanol/O₂: preparação e caracterização de biocátodos**. 2014. 55f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2014.

Este trabalho descreve a preparação e caracterização de biocátodos para biocélulas a combustível etanol e metanol//O₂ utilizando a enzima lacase (*Trametes versicolor*) num sistema de transferência eletrônica mediada (TEM). Na primeira etapa do trabalho, os resultados de cinética enzimática com a enzima lacase em solução e imobilizada sobre tecido de carbono mostraram que os vários parâmetros experimentais (pH, temperatura, estabilidade) analisados devem ser considerados, a fim de se obter atividade máxima com os biocatalisadores. Além disso, em relação aos testes cinéticos e de estabilidade, pode-se inferir que o dendrímero PAMAM pode ser empregado como um bom agente imobilizante na preparação de biocátodos para biocélulas a combustível enzimáticas. Na segunda etapa do trabalho, uma semibiocélula Etanol//O₂ foi testada e os eletrocatalisadores testados foram os polímeros de verde de metileno (VM) e azul de meldola (AM). Os testes de potência mostraram a importância da presença do mediador ABTS e do eletrocatalisador (VM) para melhorar o desempenho do dispositivo. Na terceira etapa do trabalho, eletrodos com diferentes mediadores (ABTS, ferro porfirina, ferroceno, complexo de ósmio e complexo de rutênio) e com polipirrol eletropolimerizado na superfície do eletrodo foram testados numa semibiocélula Metanol//O₂. Os testes de semibiocélula Etanol e Metanol//O₂ com transferência eletrônica mediada mostraram que os biocátodos preparados com o dendrímero PAMAM e com os diferentes eletrocatalisadores e mediadores se mostraram capazes de gerar densidades de potência competitivas em relação aos valores encontrados na literatura.

Palavras-chave: Biocélula, biocátodo, lacase, mediadores, ABTS, PAMAM e pirrol.

Abstract

CARDOSO F. P. **Methanol and ethanol/O₂ biofuel cell: preparation and characterization of biocathodes.** 2014. 55f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2014.

This work describes the preparation and characterization of biocathodes for Ethanol and Methanol//O₂ biofuel cell using the enzyme laccase (*Trametes versicolor*) and mediated electron transfer (MET). Investigation of the enzymatic kinetics of the enzyme laccase in solution and immobilized onto carbon platforms showed that the analyzed experimental parameters (pH, temperature, and stability) must be considered for maximum activity to be achieved. The kinetic and stability tests revealed that PAMAM dendrimers constitute very good immobilization agent to prepare biocathodes for enzymatic biofuel cell. The second part of this work, dealt with Ethanol//O₂ half-cell using methylene green (MG) or meldola blue (MB) as electrocatalyst. The power test evidenced that it is important to have ABTS as mediator and an electrocatalyst, to ensure that the device performs better. The third part of this work evaluated electrodes with distinct mediators (ABTS, iron porphyrin, ferrocene, osmium complex, and ruthenium complex) and containing electropolymerized polypyrrole on their surface in a Methanol//O₂ half-cell. Ethanol and Methanol//O₂ half-cell tests with mediated electron transfer showed that the biocathodes prepared with PAMAM dendrimers, electrocatalyst, and distinct mediators generated competitive power densities as compared with literature data.

Keywords: Biofuel cell, biocathode, laccase, mediators, ABTS, PAMAM and pyrrole.

Capítulo 1
Introdução

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

Ao longo da história pode-se observar que várias fontes de energia foram utilizadas pelo homem para suprir suas necessidades. O consumo de energia foi aumentando à medida que o homem foi utilizando novas técnicas para sua sobrevivência e conforto. A produção industrial e agrícola é um exemplo de uma crescente demanda de energia. Juntamente com o crescimento da demanda de energia, surge a preocupação com o esgotamento de importantes fontes de energia de origem fóssil como o petróleo e o gás natural. Dessa forma a humanidade defronta-se com a necessidade de buscar novas fontes alternativas de energia limpa e renovável, o que ajuda a amenizar e contornar o problema do aquecimento global, além de procurar novas alternativas para o modelo atual de consumo de energia [1]. A busca por fontes alternativas de energia tem se intensificado com o passar dos anos devido principalmente a fatores econômicos e aos impactos ambientais. Neste cenário, fontes de combustíveis alternativos tais como energia solar, hidrogênio, biomassa, biocombustíveis, célula a combustível, entre outras, são algumas das mais promissoras tecnologias disponíveis atualmente [2]. As células a combustível têm sido muito estudadas nos últimos anos [3-5], e constituem um dispositivo similar ao de uma célula galvânica, com a diferença que seus reagentes (combustível no ânodo e oxidante no cátodo) podem ser continuamente fornecidos. A conversão de energia química em energia elétrica em células a combustível foi demonstrada pela primeira vez por William Grove, que, no ano de 1839, percebeu que quando hidrogênio e oxigênio eram supridos separadamente na presença de dois eletrodos de platina em uma solução de ácido

sulfúrico, uma corrente elétrica era gerada [6]. As células a combustível com o passar do tempo e o avanço da tecnologia foram sendo aperfeiçoadas, gerando alto fluxo de corrente e densidade de energia, o que as tornou um dispositivo interessante frente às outras tecnologias. Estes dispositivos operam de acordo com o mecanismo apresentado na **Figura 1**. O processo se inicia com a reação de oxidação do combustível, que pode ser o hidrogênio ou alcoóis de cadeia curta, por catalisadores de metais nobres como a platina suportada em carbono de alta área superficial (o uso do carbono é justificado pelo fato de ser um bom condutor elétrico). Em seguida ocorre a etapa de redução, onde os elétrons gerados pela etapa de oxidação são carregados pelo circuito externo e então reagem com moléculas de oxigênio presentes do lado catódico da célula. Ao final do processo tem-se o trabalho elétrico e como produto final, quando hidrogênio é utilizado como combustível, a água. A produção de água ao final do processo é uma grande vantagem desse dispositivo, uma vez que os motores de combustão utilizados atualmente geram muitos gases poluentes ao final do processo de geração de energia.

Figura 1. Esquema representativo do funcionamento de uma célula a combustível tradicional ácida.

Existem diversos tipos de células a combustível, e o que as diferenciam são o combustível utilizado e o tipo de eletrólito [1]. As células de eletrólito polimérico ou membrana trocadora de prótons fornecem altas densidades de corrente e operam em baixas temperaturas (50 – 80°C), empregando catalisadores à base de platina [3, 4]. As células alcalinas operam a baixas temperaturas (60 a 90°C), e utilizam eletrólito líquido de KOH 35-50% e são aplicadas em dispositivos que requerem alta potência e mobilidade, no entanto perdem eficiência na presença de CO₂ [1]. As células de ácido fosfórico operam em temperaturas da ordem de 200 °C com uma eficiência de 55% e são aplicadas em geradores estacionários da ordem de 200 kW, utilizam o próprio ácido fosfórico como eletrólito. As células de carbonato fundido e as de óxidos sólidos operam a altas temperaturas, na faixa de 800 – 1000 °C, utilizam materiais cerâmicos como óxidos de ítrio e zircônio como catalisadores e alcançam potências da ordem de MW.

O eletrólito utilizado pode influenciar no mecanismo de geração de energia, por exemplo nas células que utilizam ácido como eletrólito, este transportará íons H⁺ provenientes do ânodo até o cátodo para formação de água. No caso das células alcalinas, o transporte será no sentido contrário, e o íon transportado será de OH⁻, que formará água no ânodo. Nas células de óxido sólido o íon transportado será o O²⁻ enquanto nas células de carbonato fundido será CO₃²⁻.

Embora muitos esforços tenham sido feitos nos últimos anos para o desenvolvimento e aplicação das células a combustível, existem alguns fatores que limitam sua aplicação em larga escala. Problemas como a passivação dos eletrodos, o elevado custo dos catalisadores metálicos, a ineficiência para oxidar alguns subprodutos do combustível utilizado e elevada temperatura de operação têm dificultado o avanço das pesquisas nessa área. Sendo assim, a demanda por

tecnologias que possam operar sob condições em que as células a combustível convencionais não trabalham tem sido grande.

1.2. Biocélulas a Combustível

Uma nova tecnologia que vem se destacando e ganhando atenção nos últimos anos, são as biocélulas a combustível [7, 8]. Estes dispositivos são caracterizados pela capacidade de converter energia química em energia elétrica utilizando-se biocatalisadores. Yahiro *et al.* [9] foram os primeiros a mostrar a produção de corrente elétrica utilizando a enzima glicose oxidase (GOx) na catálise do substrato mais utilizado em estudos de biocélulas a combustível, a glicose [9]. Foi a primeira vez que se utilizaram enzimas isoladas na superfície de um eletrodo. Esse experimento foi relatado 1964, e desde então observa-se um crescente aumento no número de publicações nesta área.

Existem três tipos de biocatalisadores utilizados em biocélulas: microorganismos, organelas e enzimas [7]. Os combustíveis mais empregados em biocélulas têm sido glicose, metanol e etanol, no entanto vários combustíveis podem ser utilizados, uma vez que os biocatalisadores são seletivos a uma grande variedade de substratos. Além da seletividade apresentada pelos biocatalisadores, biocélulas a combustível podem operar em temperatura ambiente, uma vantagem interessante frente às células que utilizam catalisadores metálicos. As células a combustível tradicionais operam em média a 80° C, enquanto as biocélulas operam na faixa de 20 a 40° C e pH neutro. A **Figura 2** apresenta de forma esquemática o funcionamento de uma biocélula a combustível.

Figura 2. Representação esquemática de uma biocélula a combustível.

1.3. As biocélulas a combustível enzimáticas: Transferência eletrônica direta (TED) e mediada (TEM)

Existem três grupos nos quais as enzimas mais utilizadas em processos redox se dividem. A divisão nesses grupos é feita de acordo com a localização do centro ativo da mesma. As primeiras correspondem às que oferecem uma fraca interação entre enzima e centro ativo atuando como carreador de elétrons. Neste grupo aparecem as enzimas que utilizam co-fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH/NAD⁺) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH/ NADP⁺). No segundo grupo aparecem as enzimas que possuem o centro ativo exposto, transferindo elétrons diretamente da enzima para o eletrodo tais como as peroxidases, quando a orientação das enzimas sobre o eletrodo é de grande importância. No terceiro grupo estão as enzimas que possuem o centro ativo ocluído e necessitam de moléculas mediadoras para realizar a transferência de elétrons; a glicose oxidase é um exemplo deste tipo de enzima [10].

Tendo em vista os três grupos diferentes de enzimas, e sua divisão de acordo com a disposição do sítio ativo para a realização da transferência de elétrons, pode-se observar que as reações de transferência de elétrons entre o sítio reativo da enzima e a superfície do eletrodo são muito importantes. O ponto fundamental para a eficiência ou não de uma célula a combustível está ligado à velocidade desta transferência de elétrons, sendo que o melhor desempenho das biocélulas a combustível dependerá dessa transferência. Esse tipo de transferência pode ocorrer diretamente ou indiretamente por meio de uma molécula mediadora.

A **Figura 3** apresenta as duas possibilidades de transferência de elétrons possíveis entre as enzimas e a superfície do eletrodo [11].

Figura 3. Representações esquemáticas dos tipos de transferência de e^- possíveis entre as enzimas e os eletrodos em uma biocélula a combustível. (A) = transferência de elétrons direta. (B) = transferência de elétrons mediada. Modificado de Aquino Neto [11].

1.3.1. Transferência Eletrônica Direta

A **Figura 3(A)** representa o sistema de transferência de elétrons direta (TED) entre o sítio ativo e o eletrodo. No mecanismo de TED, a catálise enzimática e a reação eletroquímica não podem ser consideradas como reações distintas, mas, sim, uma reação única onde o elétron pode ser considerado um segundo substrato que é diretamente e cataliticamente transferido do sítio ativo da enzima para o eletrodo [7, 12]. A estrutura da enzima, especificamente a localização do centro redox, e a orientação da mesma, são muito importantes para que o fluxo de elétrons entre o centro ativo e o eletrodo seja eficiente. Dessa forma, pode-se concluir que uma boa taxa de transferência de elétrons entre enzima e eletrodo só será obtida se todas estas condições forem alcançadas.

Uma das grandes vantagens desse tipo de sistema está na simplicidade da construção do bioeletrodo, já que não precisa utilizar mediadores, o que favorece o processo futuro de miniaturização deste tipo de dispositivo. Outras vantagens desse tipo de processo estão associadas ao fato de eliminar possíveis problemas relacionados à estabilidade, seletividade, e transporte de massa na superfície do eletrodo; além disso, evitam-se também possíveis perdas de desempenho que podem surgir da diferença de potencial entre enzima/mediador [13]. Todas essas vantagens fazem com que o processo TED se torne o alvo de pesquisa de muitos grupos em todo o mundo. Grande parte das pesquisas tem investido muito na utilização de nanotubos de carbono, carbono vítreo, diamante dopado com boro dentre outros materiais como suporte para imobilização enzimática. O tratamento desses materiais, adicionando diferentes grupos funcionais em suas superfícies, pode possibilitar um ancoramento eficiente da enzima, expondo e direcionando de

forma eficaz seus sítios ativos. Meredith *et al.* [14] modificaram nanotubos de carbono hidroxilados com grupos antracenos para ajudar a orientar os sítios ativos da lacase. Observou-se nesse trabalho que a redução do oxigênio ocorreu em 0,6 V vs ECS, próximo ao potencial do sítio ativo T1 da lacase. Valores de densidade de potência iguais a 56,8 $\mu\text{W cm}^{-2}$ e 34 $\mu\text{W cm}^{-2}$ foram obtidos para biocélulas glicose/ O_2 e frutose/ O_2 respectivamente. Zheng *et al.* [15] testaram transferência eletrônica direta entre a lacase e eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono. O potencial de redução de oxigênio encontrado foi de 530 mV vs ECS, e os valores de densidades de potência obtidos para uma biocélula ascorbato/ O_2 foram menores que 10 $\mu\text{W cm}^{-2}$. Jönsson-Niedziolka *et al.* [16] funcionalizaram nanotubos de carbono com pireno e obtiveram uma densidade de corrente para redução de O_2 de 150 $\mu\text{A cm}^{-2}$ e uma densidade de potência de 100 $\mu\text{W cm}^{-2}$, em uma célula Zn/ O_2 .

Apesar do processo de TED estar sendo cada vez mais estudado, existem algumas desvantagens que devem ser citadas. Este sistema geralmente leva a menores valores de potência que o sistema mediado, e isso pode ser devido à dificuldade de conectar eletricamente a enzima na superfície do eletrodo. A conexão enzima-eletrodo não é trivial de ser realizada e requer muito conhecimento da estrutura enzima/substrato.

1.3.2. Transferência Eletrônica Mediada

A **Figura 3(B)**, ilustra a transferência de elétrons mediada (TEM), onde uma molécula mediadora é utilizada para auxiliar a transferência de carga da enzima até o eletrodo. Mediadores são espécies redox eletroquimicamente reversíveis que

podem transferir elétrons entre coenzima/cofator de uma enzima oxiredutase e o eletrodo. Estes mediadores geralmente envolvem corantes orgânicos ou complexos organometálicos que permanecem em solução ou imobilizados no eletrodo [17]. Mediadores são necessários porque muitas enzimas não conseguem se comunicar com a superfície do eletrodo pelo mecanismo TED. Essa dificuldade se dá pelo fato dos sítios ativos de muitas enzimas oxirredutases se encontrarem “enterrados” no interior da matriz protéica, o que dificulta muito o processo de comunicação elétrica com o eletrodo [18, 19].

Uma das principais vantagens de se utilizar o sistema TEM é a maior densidade de potência obtida para esse sistema quando comparada aos valores obtidos pelo sistema TED, além de se utilizar enzimas facilmente obtidas comercialmente, tais como as enzimas álcool desidrogenase (ADH), GOx e lacase.

Os mediadores podem ser empregados em solução ou imobilizados na superfície do eletrodo (na forma de filmes poliméricos por exemplo), o que torna o processo de montagem do bioeletrodo mais complexo que para o sistema TED. Algumas características importantes que esses mediadores devem apresentar além de não serem tóxicos, e apresentarem biocompatibilidade, são apresentar uma rápida reação com a enzima, além de ser solúvel nas formas oxidada e reduzida. A solubilidade é importante para que possam difundir rapidamente até o eletrodo ou até a enzima. Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o potencial redox do mediador, que deve estar próximo do par redox da enzima a ser utilizada [20]. Na literatura são muitos os mediadores utilizados, dentre eles estão complexos metálicos [21-23], ferroceno [24], polipirrol e corantes orgânicos [25]. A seguir serão citados alguns trabalhos realizados nos últimos anos empregando diferentes mediadores.

Palmore *et al.* [26] utilizaram ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) como mediador em um sistema homogêneo, em que a enzima lacase e o mediador se encontravam em solução e obtiveram valores de densidade de potência de $40 \mu\text{W cm}^{-2}$. O ânodo utilizado foi uma rede de platina e o cátodo carbono vítreo. A eletrorredução de O_2 via quatro elétrons foi relatada por Barton *et al.* [22] em um potencial de 0,6 V. Nesse trabalho a enzima lacase utilizada foi da fonte *Coriolus hirsutus* utilizando como mediador o polímero redox $\text{PVI-Os(dmebpy)(tpy)}^{2+/3+}$.

Barrière *et al.* [23] utilizaram eletrodos modificados com a enzima lacase da fonte *Trametes Versicolor* co-imobilizada com polímeros redox de ósmio e rutênio como mediadores. Neste trabalho a biocélula foi utilizada sem membrana, e o ânodo empregado foi a enzima glicose oxidase. A avaliação dos diferentes mediadores, mostrou que o polímero redox $[\text{Os}(\text{bipyridine})_2(\text{poly}\{\text{N-vinylimidazole}\})_2]\text{Cl}_2$ que possui um $E^0=0,40 \text{ V}$ apresentou melhor valor de densidade de corrente ($240 \mu\text{A cm}^{-2}$) para a reação de redução de oxigênio em pH 5. Valor de densidade de potência de aproximadamente 40 mW m^{-2} foi encontrado por Schaetzle *et al.* [27] quando utilizaram uma biocélula constituída de um ânodo microbiológico oxidando substratos orgânicos e o cátodo enzimático reduzindo oxigênio. O mediador utilizado foi o ABTS. Nian-Din *et al.* [28] utilizaram Single-Walled Nanotubes (SWN) combinados com hidróxidos duplos lamelares intercalados com ABTS para aprisionar e conectar eletricamente a enzima lacase. O valor máximo de densidade de potência obtido foi de $18 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 0,3 V, entretanto este valor diminuiu para $8,3 \mu\text{W cm}^{-2}$ quando o biocátodo empregado não continha o nanotubo de carbono.

Como pode ser observado, muitos trabalhos utilizando diferentes mediadores tem sido feitos com o objetivo de conseguir melhores valores de densidade de potência, assim como provar que a reação de redução de oxigênio ocorre via 4 elétrons. Neste cenário, observa-se que são vários os sistemas empregados, podendo variar o suporte do eletrodo, a forma como o mediador está exposto (imobilizado ou em solução), a utilização ou não de uma membrana na célula dentre outras variações. É importante ressaltar que tais variações muitas vezes dificultam a comparação entre os trabalhos desenvolvidos.

1.4. Processos de imobilização e estabilização de enzimas

A imobilização de enzimas sobre a superfície do eletrodo tem sido considerada uma etapa importantíssima e definitiva que influencia de forma acentuada a eficiência dos eletrodos enzimáticos. A imobilização da enzima na superfície do eletrodo tem o objetivo de estender o tempo de vida da enzima, assim como obter uma camada mecânica e quimicamente estável sem formar uma região capacitiva na superfície do eletrodo. Sendo assim, a escolha de um processo de imobilização adequado durante o ancoramento da enzima sobre a superfície do eletrodo é de grande importância, já que esse processo afeta diretamente o tempo de vida da enzima imobilizada [11].

Processos químicos, físicos e bioquímicos como, crosslinking químico [29, 30], interações magnéticas [31, 32], encapsulamento [33], e a formação de pasta [34], têm sido muito explorados para imobilizar enzimas sobre a superfície dos eletrodos. Dentre todos esses processos, existe ainda o método de imobilização que utiliza polímeros redox. Materiais poliméricos têm atraído a atenção de muitos pesquisadores [35], e vários destes materiais, tais como nafion modificado,

quitosana, polipirrol, polianilina, polifenol, politiofeno, polivinil, piridina, policarbonato e nylon, têm sido utilizados para construção de eletrodos enzimáticos [36, 37].

Outra forma de imobilização de enzimas ou proteínas sobre substratos sólidos são as arquiteturas em multicamadas [38] ou a construção de filmes ultrafinos formados por monocamadas adsorvidas por meio de ligações específicas [39-41].

Na imobilização por multicamadas, a enzima pode ser ancorada à superfície do eletrodo utilizando-se a técnica de automontagem. Nessa técnica, a imobilização de biomoléculas ocorre via adsorção física (a partir de uma solução tampão em condições otimizadas de pH e força iônica), à temperatura ambiente, e os resultados têm-se mostrado excelentes para imobilizar e preservar a atividade da enzima por um período de tempo considerável [39]. Na técnica de automontagem, ocorre uma adsorção seqüencial de materiais com cargas opostas a partir de uma solução adequada (**Figura 4**).

Figura 4. Representação do procedimento de adsorção no processo de automontagem. Modificado de De Sousa Luz *et al.* [42].

Imersões alternadas em soluções policatiônicas e polianiônicas, seguidas de lavagem e secagem, são repetidas até o número desejado de camadas [38]. A imobilização de enzimas em estruturas multicamadas tem apresentado resultados

promissores em relação ao tempo de vida e a atividade alcançada pela enzima imobilizada, permitindo a construção de diferentes biossensores [39].

Na técnica de construção de filmes ultrafinos, podem existir ligações covalentes entre as monocamadas e o substrato, e diferentemente da técnica de automontagem não há a formação de bicamadas que se repetem no filme. A vantagem desse método é a pequena quantidade de material utilizado, além do controle sobre a arquitetura e espessura dos filmes.

1.4.1. O dendrímero PAMAM

Os dendrímeros são uma classe de moléculas orgânicas que tem despertado o interesse de várias áreas de pesquisa devido as suas características, dentre elas a de sofrer diversas modificações químicas em sua superfície e poder manter cavidades em sua estrutura interna. Esses dendrímeros são constituídos de três componentes básicos: um núcleo central, onde o dendrímero inicia sua estruturação; camadas geradoras e uma extremidade que pode ancorar grupos funcionais [43, 44]. É o tamanho das cavidades do dendrímero e sua composição interna e periférica que determinarão a afinidade pelas moléculas a serem inseridas na cavidade.

Características como elevada uniformidade e superfície terminal altamente funcionalizada [43] atraem o interesse de pesquisadores em diversos campos científicos. Além disso, sua estrutura tridimensional com boa biocompatibilidade pode ser utilizada na produção de sensores, inclusive na preparação de filmes automontados. A estrutura do dendrímero PAMAM contendo diversas cavidades faz com que também seja possível o encapsulamento de biomoléculas, tornando-o um atrativo material na fabricação de biossensores. A

Figura 5 apresenta um esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM geração 4, utilizado neste trabalho.

Figura 5. Esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM geração 4.

Os dendrímeros PAMAM são identificados de acordo com sua geração, que está relacionada à quantidade de ramificações (grupos funcionais) que o composto apresenta; assim, o dendrímero PAMAM geração 8 apresenta uma quantidade de ramificações muito maior do que o dendrímero PAMAM geração 1. Os principais grupos funcionais presentes na estrutura periférica do dendrímero PAMAM são grupamento amina e hidroxilas.

Quanto a sua utilização para imobilização enzimática, já foi relatado que a enzima ADH pode ser imobilizada em conjunto com o dendrímero PAMAM sobre eletrodos de Au utilizando o processo de automontagem [41]. O processo de imobilização foi acompanhado em tempo real usando uma microbalança de cristal de quartzo indicando que, em média, uma massa de 52,1 ng de ADH foi adsorvida em cada etapa de deposição (em cada bicamada). Esses eletrodos, contendo 35 bicamadas de PAMAM/enzima foram aplicados como biosensores de álcool com excelente limite de detecção [41]. A mesma metodologia foi empregada também

para imobilizar a enzima Cl-catecol 1,2-dioxigenase em filmes nanoestruturados para a detecção de compostos aromáticos presentes em pesticidas e resíduos industriais[39]. Os resultados deste estudo mostraram que a enzima permaneceu ativa imobilizada no filme por mais de 3 semanas e a detecção do catecol foi possível em concentrações bastante baixas.

1.5. A enzima lacase

As enzimas, em geral, possuem um vasto campo de aplicação biotecnológica, além de apresentarem um mercado cada vez mais promissor. A enzima lacase é uma polifenol oxidase (EC 1.10.3.2) que contém três tipos de átomos de cobre em seu centro catalítico e é também conhecida como uma multicobre oxidase. Essa enzima foi demonstrada pela primeira vez em 1883 por Yoshida, originada de uma árvore japonesa *Rhus vernicifera* e em 1985 foi caracterizada como uma oxidase [45]. As lacases são mais comumente encontradas em fungos, mas podem ser encontradas também em plantas superiores e até em bactérias [46, 47]. Elas podem ser divididas em lacases de alto potencial redox, que ocorrem em fungos, e de baixo potencial redox que ocorrem em insetos, bactérias e leveduras [48]. Lacases possuem massa molar que varia de 50 a 130 kDa [49] e são capazes de catalisar a reação de oxidação de vários compostos fenólicos com concomitante redução de oxigênio a água. O sítio catalítico da lacase apresenta três tipos de átomos de cobre com diferentes funções: o cobre do tipo 1 (T1) é que confere a coloração azul a enzima, e possui banda de absorção na região da luz visível em 600 nm; o cobre do tipo 2 (T2) apresenta baixa absorção na luz visível, e o cobre do tipo 3 (T3) é formado por um par de íons cobre [50]. Os substratos fenólicos são oxidados pelo cobre T1 que é o aceptor primário de elétrons, em seguida os

elétrons são transferidos para os sítios T2 e T3 que formam um sítio trinuclear que reduz o oxigênio molecular a água, como pode ser visto na **Figura 6**.

Figura 6. Esquema representativo dos sítios catalíticos da enzima Lacase. Modificado de Enguita [51].

Outra característica interessante da enzima lacase é que ela não necessita de cofator, uma vez que utiliza o oxigênio molecular disponível no ambiente como um cosubstrato, o que diminui o custo de produção dessa enzima [52]. Mesmo não precisando de cofator para funcionar, a oxidação direta de alguns substratos pela enzima lacase pode não ocorrer; isto pode ser explicado pelo tamanho da molécula do substrato, pois moléculas muito grandes podem ter dificuldades de penetrar no sítio ativo da enzima, ou devido ao potencial redox elevado do substrato. Para contornar esse problema, mediadores químicos têm sido utilizados para intermediar a reação entre o substrato e a enzima lacase.

1.5.1. Mediadores

Mediadores são moléculas de baixo peso molecular, que estão indiretamente envolvidas com a reação enzimática [53]. Tem sido relatado que moléculas que apresentam comportamento redox bem definido são bons mediadores [21-23, 26, 54]. Outra característica importante dos mediadores é a atuação destes compostos como “entregadores” de elétrons, facilitando a oxidação de substratos que não conseguem atingir o sítio ativo da enzima. Uma vez oxidados pela enzima e estáveis na forma de radical, os mediadores podem difundir-se para fora da estrutura da enzima oxidando o substrato da enzima que não conseguiu entrar no sítio ativo da mesma. O número de substratos que podem ser oxidados pela enzima lacase é muito grande, e pode ser aumentado ainda mais com a utilização de mediadores que permitem um aumento da atividade catalítica da enzima frente a moléculas mais difíceis de oxidar. Sendo assim, um bom mediador deve apresentar comportamento redox bem definido, ter baixo peso molecular (o que permite um fácil acesso ao sítio ativo da enzima), deve ser capaz de gerar radicais estáveis que não desativem as enzimas e por fim apresentar baixo custo.

Existem mediadores naturais e sintéticos. Dentre os sintéticos, o primeiro mediador da lacase é o ABTS, que foi desenvolvido com o objetivo de ajudar na reação de oxidação da lignina [55]. Outros mediadores muito utilizados em sistemas mediados com a enzima lacase estão listados na **Tabela 1** [53].

Tabela 1- Mediadores da enzima lacase [23, 53, 56].

Estrutura do Mediador	Nome
Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS)
Ácido 3-hidroxi-antrânilico (HAA)
1-hidroxibenzotriazol (HBT)
Ácido vialurônico (VLA)
TEMPO
Metil vialogênio (MV)
[Os(bipiridina) ₂ (poli{N-vinilimidazol}) ₂]Cl ₂
[Ru(bipiridina) ₂ (poli{N-vinilimidazol}) ₁₀]Cl

A forma como os mediadores da lacase atuam na oxidação dos diferentes substratos no sistema mediador/enzima pode ser dividida em três grupos diferentes: (1) transferência do átomo de hidrogênio; (2) mecanismo do tipo iônico; e (3) transferência de elétrons [56]. Os mediadores HAT, HBT e VLA são suscetíveis à transferência do átomo de hidrogênio, enquanto mediadores como o TEMPO reagem via mecanismos do tipo iônico. O ABTS e mediadores parecidos atuam por transferência de elétrons.

1.5.2. Ciclo catalítico da enzima lacase

A **Figura 7** apresenta o ciclo catalítico das lacases. Conforme dito anteriormente, lacases, são constituídas de três sítios de cobre (T1, T2 e T3), somando quatro átomos de cobre no total. Estes átomos de cobre estão no estado de oxidação +2 e à medida que a enzima vai oxidando o substrato, os átomos de cobre vão se reduzindo e se reorganizando (via transferência eletrônica) dentro da própria molécula, de forma que o sítio ativo 1 fique sempre na forma oxidada e pronto para receber o substrato a ser oxidado. Essa transferência de elétrons dentro da molécula se processa até que todos os átomos de cobre estejam reduzidos, então ocorre a re-oxidação da enzima, o que resulta na reação de interesse, a redução do oxigênio a água com concomitante oxidação da lacase. A estequiometria do ciclo compreende quatro Cu^{+2} (ligados a uma única proteína ou a cadeias proteicas acopladas), quatro substratos fenólicos, quatro prótons e uma molécula de O_2 [57].

Figura 7. Ciclo catalítico da lacase (modificado e simplificado de Durán *et al.* 2002 [58]).

1.6. Reação de Redução de Oxigênio- Biocátodo

A reação de redução de oxigênio (RRO) apresenta uma complexidade cinética, o que justifica a reação lenta se comparada a outros processos eletroquímicos tais como a oxidação de combustíveis, principalmente o hidrogênio. A faixa de potencial onde a reação ocorre é uma região mais positiva, o que torna uma desvantagem nos casos das células a combustível, pois em potenciais muito positivos os metais utilizados como catalisadores podem dissolver ou sofrer passivação tornando-se inativos. No caso das biocélulas a combustível, potenciais muito positivos para a redução de oxigênio não são vistos como desvantagem, uma vez que se pode utilizar mediadores para facilitar a reação.

A RRO é uma reação multieletrônica que inclui algumas etapas elementares em seu mecanismo. Esta transformação química ocorre segundo dois mecanismos globais em soluções aquosas ácidas e básicas: o mecanismo direto (4 elétrons,) e, o mecanismo de formação do peróxido (2 elétrons) [59]. Esses mecanismos estão ilustrados na **Figura 8**.

Figura 8. Mecanismos de redução do oxigênio [59].

Em biocélulas a combustível, é a reação direta envolvendo quatro elétrons que ocorre. As enzimas capazes de reduzir oxigênio a água com a oxidação de um substrato são chamadas de multicobre oxidases. Alguns trabalhos apresentam resultados da transferência eletrônica dessas enzimas em solução ou sobre diferentes eletrodos [26, 60-63], no entanto os resultados e suas respectivas interpretações variam muito. Isso se deve, entre outros fatores, às variações da forma como os experimentos foram realizados.

A eletrorredução do oxigênio a água sob condições fisiológicas e temperatura ambiente é de grande interesse devido a sua aplicação em miniaturas de biocélulas a combustível, que podem no futuro atuar como sensores implantados no organismo humano, como, por exemplo, sensores de glicose. Uma biocélula a combustível que oxida glicose no ânodo e reduz oxigênio no cátodo (glicose/O₂) pode ser utilizada para esta finalidade [64].

Dentre as enzimas utilizadas para catalisar a reação de redução de oxigênio a água, estão a lacase e a bilirrubina oxidase. Essas enzimas necessitam de um mediador redox eletro-condutor para melhorar a eficiência da transferência de elétrons entre o combustível e o eletrodo, melhorando a eficiência da reação de redução. Diferentes mediadores permitem que a reação de redução de oxigênio a água ocorra em potenciais menores que o padrão, o que ocasiona um ganho de energia no processo. A **Figura 9** mostra o esquema da reação redox, envolvendo um sistema mediador/enzima. Barton *et al.* [65] empregaram como mediador para a enzima lacase um polímero redox de ósmio, e mostraram que o potencial de eletrorredução do oxigênio depende fortemente do polímero redox utilizado para ancorar a enzima, e como os sítios ativos das enzimas estão dispostos na superfície do eletrodo.

Figura 9. Esquema da reação eletrocatalítica de redução de oxigênio em um sistema mediador/enzima. Modificado de Barton *et al.* 2005[8].

1.7. Principais Características de desempenho em Biocélulas a combustível

O potencial total associado a um sistema de eletrodos, geralmente descrito como potencial total da célula (E_{cel}), é o parâmetro de fundamental importância em qualquer processo eletroquímico **Equação 1:**

$$E_{cel} = E_c - E_a - \sum IR_e \quad (1)$$

sendo E_c o potencial do cátodo e E_a o potencial do ânodo, I a corrente produzida pelo sistema e $\sum IR_e$ a queda ôhmica. Para se obter um bom desempenho de um dispositivo, é necessário que ocorra a maximização do potencial de circuito aberto (PCA), ou da chamada janela de potencial ($E_c - E_a$), e para tanto a minimização de todas as resistências possíveis envolvidas no sistema. Para alcançar esses objetivos, os estudos de biocélulas a combustível têm investido na preparação de bioeletrodos que sejam ativos as reações catalíticas facilitando a transferência elétrica do sistema, além de investir em diversos protótipos de células que possam diminuir as resistências do sistema.

Para avaliar o funcionamento de uma biocélula a combustível, utiliza-se o parâmetro potência (P) gerada pelo sistema e que pode ser determinado pela

Equação 2:

$$P_{cel} = E_{cel} \int I dt \quad (2)$$

Com o objetivo de padronizar a potência dos sistemas, outra forma de apresentação utilizada pela literatura é a relação de densidade de potência (**Equação 3**):

$$\text{Densidade de potência} = \frac{P_{cel}}{A} \quad (3)$$

na qual a corrente produzida pelo sistema reflete a taxa de produção de elétrons gerados na catálise enzimática, além dos processos de transporte.

1.8. Breve histórico do desenvolvimento

Como citado anteriormente, a primeira descrição de uma biocélula a combustível utilizando enzimas isoladas na superfície de um eletrodo foi no ano de 1964 por Yahiro *et al.* [9]. A enzima utilizada foi a glicose oxidase (GOx) e o cátodo foi a platina em contato direto com o ar. O valor de densidade de corrente obtido foi 30 nA cm⁻² em 330 mV e o potencial de circuito aberto (PCA) ficou na faixa de 625 a 750 mV [9]. O valor de densidade de corrente obtido foi bem baixo, e talvez isso explique o fato dessa área de pesquisa ter demorado a crescer, uma vez que a maior atenção a esse assunto só foi dada nos últimos anos. A **Figura 10** mostra

através de uma pesquisa bibliográfica o aumento do interesse dos pesquisadores por este tema.

Figura 10. Pesquisa bibliográfica conduzida na base de dados do Chemical Abstracts utilizando o termo “biofuel cell”. Fonte: SciFinder Scholar Atualizado de Aquino Neto[11].

Estudos sobre biocélulas a combustível começaram na década de 80, quando Plotkin *et al.* [66] obtiveram melhores resultados na oxidação de metanol, (utilizando a enzima ADH), que os obtidos em 1964 por Yahiro *et al.* [9] para a oxidação da glicose. A densidade de corrente saía da ordem de nA para a ordem de μA . A densidade de corrente máxima obtida nesse trabalho foi de $30 \mu\text{A cm}^{-2}$ a um PCA de 300 mV. Ressurgiu então o interesse pelo desenvolvimento das biocélulas a combustível. Em 1984 Lee *et al.* [67] demonstraram a catálise da reação de redução de oxigênio num eletrodo de grafite recoberto com a enzima lacase da fonte *Polyporous versicolor*. A reação ocorreu em potenciais acima de 0,5 V vs ECS [67]. Em 1992 Heller já falava da importância da conexão elétrica do centro redox

das enzimas com o eletrodo [10]. Eletrodos cobertos com um filme de um complexo redox à base de ósmio e polivinilimidazol juntamente com a enzima glicose oxidase forneceram valores de densidade de corrente de $400 \mu\text{A cm}^{-2}$, e além disso se mostraram bastante seletivos a glicose quando na presença de ascorbato e acetaminofeno [68]. Em 1999, Palmore e Kim [26] descreveram como o mediador redox ABTS é usado para reduzir oxigênio a água usando a enzima lacase como biocatalisador. A biocélula utilizada consistia em um ânodo de platina e um cátodo de carbono vítreo. A enzima lacase e o ABTS se encontravam em solução. O valor máximo de densidade de potência encontrado foi de $42 \mu\text{W cm}^{-2}$ a 0,61 V.

Nos anos 2000, a quantidade de trabalhos publicados nessa área aumentou imensamente, como pode ser observado na **Figura 10**. Foram nesses últimos anos que uma variedade enorme de sistemas foi testada. Testou-se diferentes mediadores para várias enzimas [23, 53, 69, 70], microdispositivos para implementação médica [54], modificação/melhoramento genético de certas enzimas [71], diferentes combustíveis [66, 72], diferentes formas de imobilização [73, 74], diferentes arranjos de células, modificação de materiais [14, 75], dentre outros. A **Tabela 2** apresenta um resumo de algumas revisões feitas nos anos 2000.

Tabela 2- Revisões sobre biocélulas a combustível publicadas a partir do ano 2000.

Referência	Foco da Revisão
Barton, 2004[20]	Revisão completa desde métodos de imobilização, aplicações, diferenças entre biocélulas e biosensores, e grande ênfase em processos de TEM.
Bullen, 2006[17]	Revisão dos trabalhos publicados entre o período de 1994 a 2006, enfatizando os parâmetros como densidade de potência e PCA das biocélulas desenvolvidas.
Minteer, 2007[76]	Revisão que destaca os aspectos práticos de aplicação, tais como estabilidade e tempo de vida, além de tendências futuras no desenvolvimento deste dispositivo.
Cooney e Minteer, 2008[77]	Revisão dos processos de transferência eletrônica em biocélulas enzimáticas, além dos aspectos associados à configuração dos eletrodos e técnicas de caracterização.
Ivanov, 2010[78]	Revisão de metodologias de preparação de bioeletrodos e modelagem.
Osman, 2011[79]	Revisão dos progressos obtidos no desenvolvimento de biocélulas enzimáticas. Novos materiais eletródicos, métodos de imobilização e nanoestruturação.
Opallo, 2011[80]	Revisão do desenvolvimento de bioeletrodos nanoestruturados com foco na catálise da reação de redução de oxigênio.
Yang, 2012[81]	Revisão das etapas de imobilização de enzimas em superfícies eletródicas.
Falk, 2012[82]	Discussão do processo TED em biocélulas enzimáticas.

O estudo das biocélulas a combustível tem mostrado que esses dispositivos apresentam características promissoras para a geração de energia, no entanto vários desafios ainda precisam ser alcançados para se obter uma futura aplicação desse sistema. Algumas questões importantes ainda precisam ser solucionadas no desenvolvimento das biocélulas a combustível enzimáticas. Dentre estas questões estão o tempo de vida, estabilidade das enzimas, obtenção de maiores densidades

de potência, superação das dificuldades na transferência de elétrons entre enzimas e eletrodos, além do aprimoramento de técnicas de imobilização das enzimas. Sendo assim, o investimento da maioria dos grupos de pesquisa está voltado para a melhoria e desenvolvimento desses fatores.

Capítulo 2
Objetivos

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de biocélulas a combustível focando principalmente o estudo da semi-biocélula a combustível para redução de oxigênio, utilizando a enzima lacase. Para este intuito foi investigado o método de Transferência Eletrônica Mediada, utilizando vários mediadores e diferentes formas de imobilização. Além disso, metanol e etanol foram testados como combustíveis no compartimento anódico. O composto utilizado para a imobilização da enzima foi o dendrímero PAMAM geração 4. Quanto às metodologias de preparação dos bioeletrodos, tendo em vista uma grande variedade já relatada na literatura, foram propostas algumas modificações com o objetivo de alcançar melhores resultados.

2.2. Objetivos Específicos

Para se investigar o método de TEM várias abordagens foram testadas e para facilitar apresentação dos resultados estes foram organizados em diferentes capítulos. Relatamos o estudo cinético da enzima Lacase em solução e imobilizada em plataforma de carbono. Estes estudos iniciais tiveram como objetivo verificar a cinética da enzima comercial Lacase (*Trametes versicolor*) de forma comparativa em solução e imobilizada em plataformas de carbono utilizando o dendrímero PAMAM como matriz de imobilização das enzimas.

Foram preparados diferentes biocátodos pelo método de adsorção passiva com o dendrímero PAMAM. Os corantes verde de metileno e azul de meldola foram eletropolimerizados sobre o suporte de carbono e utilizados como

eletrocatalisadores nos bioeletrodos preparados. Para avaliar o desempenho dos biocátodos, testes de potência foram realizados na presença e ausência do mediador ABTS.

Biocátodos preparados pelo método de adsorção passiva com o dendrímero PAMAM e um filme de polipirrol eletropolimerizado sobre a superfície de carbono também foram testados. Na preparação do filme de polipirrol, os mediadores ABTS, porfirina de ferro III, ferroceno, complexo de rutênio e complexo de ósmio foram eletropolimerizados juntamente com o filme de polipirrol, com o objetivo de ficarem aprisionados no filme do polímero condutor.

Capítulo 3
Parte Experimental

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e Métodos

Todos os reagentes empregados neste trabalho e não especificados são de pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia. As metodologias e procedimentos experimentais empregados para cada tipo de bioeletrodo preparado (com diferentes mediadores) possuem particularidades e, por isso, as etapas experimentais em cada tipo de processo são apresentadas de maneira independente.

3.1.1. Reagentes

A enzima comercial utilizada, Lacase (EC 1.10.3.2) com atividade inicial de 21 U mg⁻¹) extraída de *Trametes versicolor* e comercializada na forma de pó liofilizado, foi obtida da Sigma-Aldrich e utilizada como recebida. O PAMAM-NH₂ geração 4 com núcleo de etilenodiamina (solução 10 % em metanol), o ABTS ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico, o azul de meldola (AM), o verde de metileno (VM), o acetato de sódio, o pirrol e o tetraborato de sódio também foram obtidos da Sigma-Aldrich. O PAMAM G4-NH₂ apresenta um diâmetro de aproximadamente 4,5 nm contendo 62 grupos aminas internos e 64 grupos periféricos. O Nafion é da marca Fulka, o ácido acético da Merck, e o nitrato de sódio da J.T. Backer. O RuCl₃.nH₂O, (NH₄)OsCl₆, 2,2' bipyridina, LiCl da marca Sigma e o DMF recém-destilado e etilenoglicol da Sigma-Aldrich.

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹) purificada por um sistema *Milli-Q* da *Millipore Inc.* As medidas de pH foram realizadas com um eletrodo de pH acoplado a um pHmetro *Qualxtron*

8010. Todas as soluções de enzimas e coenzima foram preparadas e utilizadas imediatamente.

3.1.2. Síntese dos complexos metálicos utilizados como mediadores

a) Síntese do precursor $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$

Esta síntese foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura [83], com algumas modificações. Em um balão de 50 mL fez-se reagir 2,02 g de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 2,45 g de 2,2' bipyridina e 2,33 g de LiCl em 12 mL de DMF recém destilado. Manteve-se em refluxo durante 6 horas e protegido da luz. Em seguida resfriou-se a solução até a temperatura ambiente. Após a solução resfriada, adicionou-se acetona e deixou-se em geladeira por uma noite. No dia seguinte, o sólido foi filtrado com água para retirar o excesso de $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ e LiCl. A lavagem foi monitorada através do registro de espectros eletrônicos, até obter duas bandas bem separadas em aproximadamente 390 e 590 nm.

b) Síntese do precursor $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$

Esta síntese foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura [84], com algumas modificações. Em um balão de 100 mL fez-se reagir 1,0 g de $(\text{NH}_4)\text{OsCl}_6$ com 0,72 g de 2,2' bipyridina em 50 mL de etilenoglicol. Manteve-se em refluxo durante 45 minutos e protegido da luz sob atmosfera de N_2 . Em seguida resfriou-se a solução até a temperatura ambiente. Após a solução resfriada, adicionou-se volume equivalente de solução saturada de ditionito de sódio. No dia seguinte, o sólido foi filtrado com água e depois éter. O sólido obtido apresentou cor roxa escura.

3.1.3. Determinação da atividade enzimática pelo método contínuo

A atividade de hidrólise do substrato catalisada pela enzima lacase foi realizada a 25 °C, acompanhando-se a oxidação do ABTS em 420 nm ($\epsilon_{420\text{nm}}^{\text{pH } 4,5} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em um espectrofotômetro *Ultrospec 5300 pro* da *Amersham Biosciences* equipado com células termostatizadas, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico. As condições de ensaio foram padronizadas dependendo do sistema utilizado, sempre empregando o tampão acetato de pH 4,5 contendo o substrato e a enzima em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ou do substrato contendo a enzima imobilizada, dependendo do estudo realizado. No caso dos estudos de cinética com as enzimas em solução, a reação foi iniciada pela simples adição de certa quantidade de solução tampão contendo a enzima de interesse. Já no caso da enzima imobilizada em substrato de carbono tipo Toray, a reação foi iniciada pela imersão dos substratos sólidos na cubeta espectrofotométrica. A **Figura 11** apresenta uma ilustração da cubeta utilizada nos experimentos de cinética enzimática contendo o substrato de carbono com a enzima imobilizada.

Figura 11. Ilustração do procedimento utilizada no experimento de cinética enzimática.

Uma vez que a oxidação do ABTS ocorre com o aumento da intensidade da cor da solução, o monitoramento da atividade resulta no aumento dos valores de leitura da absorbância em 420 nm (representado na **Figura 12**). No caso dos estudos da enzima em solução, os valores de absorbância foram coletados por 3 minutos com intervalo de medida de 2 s, e a velocidade de conversão do substrato foi calculada por regressão linear durante os primeiros minutos de reação. No caso dos estudos com a enzima imobilizada, os valores de absorbância foram coletados por um período um pouco maior, de aproximadamente 7 minutos, devido à cinética mais lenta observada nestas condições.

Figura 12. Espectro representativo de absorção UV nos estudos cinéticos da Lacase.

A influência tanto do pH quanto da temperatura na cinética da enzima lacase foi determinada por meio de ensaios de 25 a 60 °C em vários pHs entre 3,5 e 8,1. Para um volume final de solução igual a 1 mL, a concentração final dos reagentes foi mantida em 1 mmol L⁻¹ de ABTS.

Os ensaios foram realizados em triplicata e brancos sem adição de enzima foram incluídos em cada experimento para quantificar possíveis hidrólises não enzimáticas dos substratos. Valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ do substrato foram calculados por meio do gráfico de Lineweaver-Burk [85].

3.1.4. Eletropolimerização dos eletrocatalisadores Verde de Metileno e Azul de Meldola.

Previamente ao processo de eletropolimerização, os eletrodos de carbono vítreo foram polidos com alumina 0,3 μm e limpos eletroquimicamente por voltametria cíclica na faixa de potencial de -2,0 a 2,0 V vs um eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Dez ciclos de varredura foram realizados em meio de HNO_3 1 mol L^{-1} para garantir a completa remoção de vestígios de material orgânico da superfície do eletrodo.

Os filmes foram preparados via eletropolimerização utilizando a técnica de voltametria cíclica, por meio de 12 ciclos voltamétricos em intervalos de potencial distintos para cada composto, sempre a 50 mV s^{-1} em uma solução contendo 4×10^{-4} mol L^{-1} do respectivo corante em nitrato de sódio 0,1 mol L^{-1} . No caso do corante verde de metileno, foi utilizado um intervalo de potencial de -0,3 a 1,3 V vs ECS em uma solução contendo também tetraborato de sódio 1×10^{-2} mol L^{-1} [72]. A polimerização do azul de meldola foi realizada também por voltametria cíclica num intervalo de potencial de -0,3 a 0,6 V vs ECS e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , sendo registrados 12 ciclos sucessivos. A solução utilizada foi igual à empregada para o verde de metileno. Os filmes foram eletropolimerizados também sobre uma camada difusora composta de tecido de carbono Toray de 1 cm^2 . Após a polimerização, os suportes foram secos em um dessecador por 24 horas.

3.1.5. Eletropolimerização do filme de polipirrol com os mediadores: ABTS, Porfirina de Ferro(III), Ferroceno, Complexo de Ósmio e Rutênio

A polimerização do pirrol juntamente com os mediadores sobre uma camada difusora composta de tecido de carbono Toray de 1 cm² foi realizada através da técnica de voltametria cíclica num intervalo de potencial de 0 a 1 V vs ECS e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, sendo registrados 20 ciclos sucessivos. A solução utilizada para a realização dos voltamogramas foi: Pirrol 200 mmol L⁻¹ em solução de nitrato de sódio 100 mmol L⁻¹. A quantidade dos mediadores porfirina de ferro(III), ferroceno, complexos de ósmio e rutênio foi de 8 mg mL⁻¹. Para o ABTS a quantidade foi de 7,3 mM [69]. Após a polimerização, o tecido foi seco em um dessecador por 24 horas.

3.1.6. Imobilização enzimática sobre o tecido de carbono eletropolimerizado com diferentes eletrocatalisadores

Na preparação dos biocátodos para testes de biocélula, o suporte utilizado foi um tecido de carbono composto de uma camada difusora (*HT1400W, ELAT® GDL - BASF*), com área de 1 cm². Uma vez finalizada a etapa de eletropolimerização dos eletrocatalisadores (procedimentos descritos nos itens 3.1.4. e 3.1.5.), os eletrodos foram lavados com água deionizada, secos em N₂ e deixados por 24 horas em dessecador antes da imobilização das enzimas.

Em seguida, procedeu-se com a deposição por adsorção passiva de uma solução enzima/dendrímero. As soluções de lacase/PAMAM foram preparadas na razão 1:2, mantendo o volume final em 600 µL em tampão acetato 0,1 x 10⁻³ mol L⁻¹ (pH 4,5). Após homogeneização, 50 µL desta solução foram adicionados

diretamente na superfície do suporte, seguido de secagem por 12 h. A **Figura 13** apresenta uma representação esquemática do biocátodo preparado.

Figura 13. Representação esquemática do biocátodo preparado.

Os biocátodos recém-preparados e secos foram imersos em solução tampão e mantidos por 12 h a 4 °C antes de cada ensaio.

3.1.7. Teste de biocélula Etanol//O₂ e Metanol//O₂

As medidas de densidade de potência e corrente foram realizadas em uma célula eletroquímica de dois compartimentos separados por uma membrana Nafion® (**Figura 14**). Uma membrana de difusão gasosa (ELAT®) composta de 20 % Pt em C (*E-TEK*) prensada a quente foi utilizada como material anódico para etanol, sendo mantida em contato direto com uma solução de etanol 0,1 mol L⁻¹. Para a biocélula metanol//O₂, o ânodo utilizado foi uma membrana de difusão gasosa (ELAT®) composta de 40 %Pt (Pt_{66%}Ru_{34%} (*E-TEK*)) prensada a quente. O ânodo foi mantido em contato direto com uma solução de metanol 0,1 mol L⁻¹. As medidas foram realizadas em uma solução de tampão acetato (pH = 4,5) saturada constantemente com O₂. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) em um potenciostato/galvanostato modelo 273A-PAR. O sistema foi deixado em equilíbrio por 1 hora para registro do PCA, e a seguir as curvas de

polarização foram registradas a 1 mV s^{-1} , das quais foram obtidas então as curvas de densidade de potência. Todos os resultados apresentados são baseados em medidas em triplicata.

Figura 14. Esquema representativo da célula eletroquímica utilizada para as medidas de densidade de potência.

Capítulo 4
Conclusões Finais

4.1. Conclusões Finais

A enzima lacase juntamente com o dendrímero PAMAM foram utilizados nesse trabalho para a redução de oxigênio em biocátodos para biocélulas a combustível. Para avaliar a viabilidade dessa enzima como um biocátodo, testes cinéticos e de estabilidade foram realizados. Os resultados da influência de pH e temperatura para a enzima lacase mostraram que a enzima apresenta ótimas características para a aplicação em sistemas mais complexos. A enzima é capaz de manter uma boa atividade catalítica em uma relativa faixa de pH (3,5 a 5,5) e temperatura (30 a 60 °C) quando imobilizada sobre tecido de carbono.

Em relação aos testes cinéticos e de estabilidade, pode-se inferir que o dendrímero PAMAM pode ser empregado como um bom agente imobilizante, tornando-se muito atrativo para arranjos de imobilização de enzimas, uma vez que os parâmetros cinéticos foram avaliados.

Estudos do fluxo eletroquímico do ABTS mostraram que o filme de PAMAM não introduz limitações no transporte de massa.

Imagens de MEV contendo diferentes mediadores aprisionados no filme de polipirrol sobre o tecido de carbono mostraram a formação de um filme uniforme e denso, além de uma porosidade do material. Essas características do filme fornecem um ambiente favorável para biomoléculas. Além disso, as espécies metálicas apresentaram uma boa dispersão na estrutura do filme.

Testes de potência para diferentes sistemas eletródicos numa semibiocélula etanol//O₂ e metanol//O₂ mostraram a importância da presença do mediador, do eletrocatalisador, além da metodologia de preparação do biocátodo, para melhorar o desempenho do dispositivo.

Os melhores resultados foram obtidos para a biocélula etanol//O₂: C/ Pt (ETeK), EtOH(0,1 mol L⁻¹)// C/verde de metileno/lacase, PAMAM que apresentou valores de densidade de potência de 7,7 e 35,1 $\mu\text{W cm}^{-2}$ na ausência e presença de ABTS, respectivamente.

Os testes de biocélula indicaram que os dois complexos metálicos de ósmio e rutênio apresentam melhor desempenho quando comparado com os outros mediadores. Os melhores resultados obtidos foram para as biocélulas metanol//O₂: C/PtRu (ETeK),MeOH (0,1 molL⁻¹) // C/polipirrol, Os(bpy)₂Cl₂/ lacase, PAMAM, O₂, pH 4,5 e C/PtRu (ETeK),MeOH (0,1 molL⁻¹)/C/polipirrol, Ru(bpy)₂Cl₂/ lacase, PAMAM, O₂, pH 4,5 . A densidade de potência máxima alcançada foi de 71,6 e 81,7 $\mu\text{W cm}^{-2}$ para os complexos de ósmio e rutênio, respectivamente.

Na biocélula que utilizou etanol como combustível (Etanol//O₂) o melhor resultado foi obtido para o sistema que utilizou o ABTS como mediador e o verde de metileno como eletrocatalisador (35,1 $\mu\text{W cm}^{-2}$). Outro eletrocatalisador utilizado foi o azul de meldola, no entanto esse sistema apresentou baixas densidades de potência (0,6 $\mu\text{W cm}^{-2}$).

Ao trocar o combustível e utilizar metanol, modificou-se também a forma de imobilização, utilizando um polímero de polipirrol eletropolimerizado com o mediador, no lugar do verde de metileno. As densidades de potência obtidas nesse sistema variaram de acordo com o mediador utilizado. Ao utilizar o ABTS como mediador, obteve-se um valor de densidade de potência próximo (25,4 $\mu\text{W cm}^{-2}$) ao valor obtido para o sistema etanol//O₂ utilizando o verde de metileno como eletrocatalisador (35,1 $\mu\text{W cm}^{-2}$). Nesse caso observa-se que o verde de metileno foi melhor na transferência eletrônica entre o mediador e a enzima do que o filme

de polipirrol. No sistema de biocélula metanol//O₂ os valores de densidade de potência foram de 5,9 $\mu\text{W cm}^{-2}$, quando se utilizou a porfirina como mediador, a 81,7 $\mu\text{W cm}^{-2}$, para o complexo de rutênio. Esses valores estão de acordo com os valores encontrados na literatura, os quais não excederam ainda os 300 $\mu\text{W cm}^{-2}$ independente da metodologia utilizada.

Capítulo 5: *Curriculum vitae*

1. Formação Acadêmica

- 1.1. Licenciatura em Química- Universidade Federal de Lavras- UFLA- (2004 – 2008)
- 1.2. Mestrado em Química – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ Usp- FFCLRP/USP- (2008-2010)

2. Publicações

2.1. Dissertação Publicada

Título da Dissertação: Estudo da Degradação do Ácido Tânico por processos eletroquímicos e fotoeletroquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Olivi

2.2. Artigos Publicados em Periódicos

CARDOSO, F. P.; AQUINO NETO, S.; CREPALDI, L. B.; NIKOLAOU, S. ; BARROS, V. P. ; DE ANDRADE, A. R. .Biocathodes for Enzymatic Biofuel Cells Using Laccase and Different Redox Mediators Entrapped in Polypyrrole Matrix. **Journal of the Electrochemical Society** , v. 161, p. F445-F450, 2014.

CARDOSO, F. P.; AQUINO NETO, S.; FENGA, P. G. ; CIANCAGLINI, P. ; DE ANDRADE, A. R. . Electrochemical characterization of methanol/O₂ biofuel cell: Use of laccase biocathode immobilized with polypyrrole film and PAMAM dendrimers. **Electrochimica Acta** , v. 90, p. 90-94, 2013.

FENGA, P.G.; CARDOSO, F.P.; AQUINO NETO, S.; DE ANDRADE, A.R.. Multiwalled carbon nanotubes to improve ethanol/air biofuel cells. **Electrochimica Acta** , v. 106, p. 109-113, 2013.

CARDOSO, F. P.; NOGUEIRA, A. E. ; PATRICIO, P. S. O. ; OLIVEIRA, L. C. A. . The effect of tungsten doping on catalytic properties of niobium oxide. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Online), v. 23, n.4, p. 702-709, 2012.

CARDOSO, F. P.; AQUINO NETO, S.; CIANCAGLINI, P.; DE ANDRADE, A. R. The Use of PAMAM Dendrimers as a Platform for Laccase Immobilization: Kinetic Characterization of the Enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology** (Online) , v. 167, p. 1854-1864, 2012.

2.3. Resumos Publicados em Anais de Congresso

CREPALDI, L. B. ; CARDOSO, F. P. ; Aquino Neto, S. ; FENGA, P. G. ; ANDRADE, A. R. . Preparação de bioanodos utilizando sistema mediado polipirrol/ferroceno para biocélula a combustível glicose/O₂. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

AQUINO NETO, S. ; CARDOSO, F. P. ; ALMEIDA, T. S. ; CREPALDI, L. B. ; FENGA, P. G. ; MEREDITH, M. T. ; MINTEER, S.; ANDRADE, A. R. . The use of MWCNTs/ methylene green electrodes to enhance NADH electrocatalysis in ethanol biofuel cell.2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; AQUINO NETO, S. ; CREPALDI, L. B. ; FENGA, P. G. ; ANDRADE, A. R. . Laccase Immobilization with Ruthenium Complex as Catalyst for Biocathode Application. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; AQUINO NETO, S. ; FENGA, P. G. ; CIANCAGLINI, P. ; ANDRADE, A. R. . Kinetic and Electrochemical Characterization of Laccase Using PAMAM Dendrimers Enzyme Immobilization. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

AQUINO NETO, S. ; DANIEL, G. R. ; CARDOSO, F. P. ; FENGA, P. G. ; ANDRADE, A. R. . Estudo da atividade de diferentes mediadores em biocélulas a combustível EtOH/O₂. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CARDOSO, F. P. ; Aquino Neto, S. ; FENGA, P. G. ; ANDRADE, A. R. . Avaliação de diferentes eletrocatalisadores em biocátodo a base de lacase para reação de redução de oxigênio.. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio)

Aquino Neto, S. ; ALMEIDA, T. S. ; CARDOSO, F. P. ; PALMA, L.M. ; ZUCOLOTO, V. ; ANDRADE, A. R. . Nanostructured Bioanodes containing Enzymes and Gold/Pt nanoparticles for Ethanol Biofuel Cells. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; AQUINO NETO, S. ; CIANCAGLINI, P. ; ZUCOLOTO, V. ; ANDRADE, A. R. . Laccase immobilization with PAMAM dendrimers for biocathode application. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; Olivi. P . Electrochemical Technology for Tannins Degradation. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; Aguiar, A. C. R. ; Olivi. P . Tratamento eletroquímico e fotoeletroquímico de ácido tânico na presença de cloro. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CARDOSO, F. P. ; Olivi. P . Eletrooxidação de Ácido Tânico empregando eletrodos do tipo Ti/Sn_{0,9}Ir_{0,1} e Ti//Sn_{0,9}Ir_{0,1}.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

CARDOSO, F. P. ; GONCALVES, M. ; OLIVEIRA, L. C. A. . Estudo de adsorção de contaminantes organicos em óxidos de niobio:sintetico e CBMM.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

GONCALVES, M. ; CARDOSO, F. P. ; GUERREIRO, M. C. . Goethitas pura e dopada com Mn e Co: síntese e propriedade catalíticas em reações tipo Fenton.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; OLIVEIRA, L. C. A. . Estudo da degradação de contaminantes orgânicos em óxidos de nióbio dopado com Tungstênio e tratado com peróxido de hidrogênio.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; OLIVEIRA, L. C. A. . Síntese de níobia para adsorção de contaminantes orgânicos.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CARDOSO, F. P. ; OLIVEIRA, L. C. A. ; GUERREIRO, M. C. ; GONCALVES, M. ; PEREIRA, E. I. . Carvão ativado obtido a partir de resíduos dos frutos do cafeeiro para remoção de contaminantes em meio aquoso.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3.0. Participação em eventos científicos

223rd Meeting of The Electrochemical Society. 2013. (Congresso).

221st Meeting of The Electrochemical Society. 2012. (Congresso).

XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica 2012 (Congresso).

XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. 2011. (Simpósio).

XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. 2009. (Simpósio).

30 Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Quimica. 2007. (Congresso).

XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. 2007. (Congresso).

XX Congresso de iniciação científica da UFLA 2007 (Congresso).

I Semana Acadêmica da UFLA. 2007. (Outra).

XVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. 2004. (Congresso).

Capítulo 6
Referências Bibliográficas

6.1. Referências Bibliográficas

1. GUO, K.W., *Green nanotechnology of trends in future energy: a review*. International Journal of Energy Research, 2012. **36** (1): p. 1-17.
2. DINCER, I., *Renewable energy and sustainable development: a crucial review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2000. **4**(2): p. 157-175.
3. LAMY, C., LIMA, A., LERHUN, V., DELIME, F., COUTANCEAU, C., LÉGER, J.-M., *Recent advances in the development of direct alcohol fuel cells (DAFC)*. Journal of Power Sources, 2002. **105**(2): p. 283-296.
4. SONG, S., TSIAKARAS, P., *Recent progress in direct ethanol proton exchange membrane fuel cells (DEPEMFCs)*. Applied Catalysis B: Environmental, 2006. **63**: p. 187-193.
5. WANG, C.Y., *Fundamental Models for Fuel Cell Engineering*. Chemical Reviews, 2004. **104**: p. 4727-4766.
6. WENDT, H., GOTZ M. LINARDI M., *Tecnologia de Células a combustível*. Química Nova, 2000. **23**(4): p. 538-546.
7. COONEY, M.J., SVOBODA, V., LAU, C., MARTIN, G., MINTEER, S. D., *Enzyme catalysed biofuel cells*. Energy & Environmental Science, 2008. **1**: p. 320-337.
8. BARTON, S.C., *Oxygen transport in composite mediated biocathodes*. . Electrochimica Acta, 2005. **50**(10): p. 2145-2153.
9. YAHIRO, A.T.; LEE, S.M.; KIMBLE, D.O., *Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects, 1964. **88**(2): p. 375-383.
10. HELLER, A., *Electrical Connection of Enzyme Redox Centers to Electrodes*. The Journal of Physical Chemistry, 1992. **96**(9): p. 3579-3587.
11. AQUINO NETO, S., FORTI, J.C., DE ANDRADE A. R., *An Overview of Enzymatic Biofuel Cells*. Electrocatalysis, 2010. **1**(1): p. 87-94.
12. GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E., *Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications*. Electroanalysis, 1997. **9**(9): p. 661-674.
13. FALK, M., BLUM, Z., SHLEEV S., *Direct electron transfer based enzymatic fuel cells*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 191-202.
14. MEREDITH, M.T. MINSON, M., HICKEY D., ARTYUSHKIVA K., GLATZHOFFER D. T, MINTEER S. D., *Anthracene-Modified Multi-Walled Carbon Nanotube as direct transfer scaffolds for enzymatic oxygen reduction*. ACS Catalysis, 2011. **1**: p. 1683-1690.
15. ZHENG, W., ZHOU, H. M., ZHENG, Y. F., WANG, N., *A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell*. Chemical Physics Letters, 2008. **457**: p. 381-385.
16. JÖNSSON-NIEDZIOLKA, M., KAMINSKA, A., OPALLO, M., *Pyrene-functionalised single-walled carbon nanotubes for mediatorless dioxygen bioelectrocatalysis*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(28): p. 8744-8750.
17. BULLEN, R.A., ARNOT, T. C., LAKEMAN, J. B., WALSH, F. C. *Biofuel cells and their development*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(11): p. 2015-2045.
18. WILLNER, B., KATZ E., WILLNER I., *Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(6): p. 589-596.

19. KOMABA, S., T. MITSUHASHI, AND S. SHIRAISHI, *Polyion Complex Nanocomposite Electrode Incorporating Enzyme and Carbon Nanotube for Biofuel Cells*. *Electrochemistry*, 2008. **76**(1): p. 55-58.
20. BARTON, S.C., GALLAWAY, J., ATANASSOV, P. *Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices*. *Chemical Reviews*, 2004. **104**(10): p. 4867-4886.
21. KAVANAGH, P., JENKINS, P., LEECH, D., *Electroreduction of O₂ at a mediated Melanocarpus albomyces laccase cathode in a physiological buffer*. *Electrochemistry Communications*, 2008. **10**(7): p. 970-972.
22. BARTON, S. C., PICKARD, M., VAZQUEZ-DUHALT, R., HELLER A. *Electroreduction of O₂ to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the 'wired' Pleurotus ostreatus laccase cathode*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002. **17**(11-12): p. 1071-1074.
23. BARRIÈRE, F., FERRY, Y., ROCHEFORT, D., LEECH, D., *Targetting redox polymers as mediators for laccase oxygen reduction in a membrane-less biofuel cell*. *Electrochemistry Communications*, 2004. **6**(3): p. 237-241.
24. PARK, H.J., WON, K., LEE, S. Y., KIM, J. H., KIM, W-J., LEE, D. S., YOON, H. H., *Fabrication of CNT/Ferrocene/Glucose Oxidase/Chitosan-Layered Bioanode for Glucose/Oxygen Biofuel Cells*. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2011. **539**(1): p. 238/[578]-246/[586].
25. SARMA, A. K., VATSYAYAN, P.; GOSWAMI, P.; MINTEER, S. D.; *Recent advances in material science for developing enzyme electrodes*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(8): p. 2313-2322.
26. PALMORE, G.T. R., KIM H-H., *Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1999. **464**(1): p. 110-117.
27. SCHAETZLE, O., BARRIERE F., SCHRODER, U., *An improved microbial fuel cell with laccase as the oxygen reduction catalyst*. *Energy & Environmental Science*, 2009. **2**(1): p. 96-99.
28. DING, S.-N., HOLZINGER, M., MOUSTY, C., COSNIER, S. *Laccase electrodes based on the combination of single-walled carbon nanotubes and redox layered double hydroxides: Towards the development of biocathode for biofuel cells*. *Journal of Power Sources*, 2010. **195**(15): p. 4714-4717.
29. SARATH BABU, S.V.R., PATRA., S.; KARANTH, N.G.; KUMAR, M.A.; THAKUR, M.S. , *Development of a biosensor for caffeine*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **582**(2): p. 329-334.
30. NOSS, K. R., VAUGHAN, A. D.; BYRNE, M. E.; , *Tailored binding and transport parameters of molecularly imprinted films via macromolecular structure: The rational design of recognitive polymers. .* *Journal of Applied Polymer Science*, 2008. **107**(6): p. 3435-3441.
31. DE LA RICA, R., BALDI, A.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. , *Local detection of enzymatic ion generation with polycrystalline silicon interdigitated electrodes and its application to biosensing*. *Applied Physics Letters*, 2007. **90**(7): p. 074102.
32. GAO, X., GE, SHUTIAN., CAI, Q., ZENG, K., GRIMES, C. A., *Kinetic study on the interaction between tannin and bovine serum albumin with a wireless magnetoelastic biosensor*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. **129**(2): p. 929-933.

33. COSNIER, S., *Recent Advances in Biological Sensors Based on Electrogenated Polymers: A Review*. Analytical Letters, 2007. **40**(7): p. 1260-1279.
34. FUKUDA, H., KOMATSU, H., TOYAMA, S., MATSUSHITA, K., *JP Patent 2,007,225,444*. 2007.
35. BARTLETT, P. N., BIRKIN, P. R., *The application of conducting polymers in biosensors*. Synthetic Metals, 1993. **61**(1-2): p. 15-21.
36. ZHENG, H., OKADA, H., NOJIMA, S., SUYE, S., HORI, T., *Layer-by-layer assembly of enzymes and polymerized mediator on electrode surface by electrostatic adsorption*. Science and Technology of Advanced Materials, 2004. **5**(3): p. 371-376.
37. SARMA, A. K., VATSYAYAN, P., GOSWAMI, P., MINTEER, S. D., *Recent advances in material science for developing enzyme electrodes*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **24**(2313-2322).
38. OLIVEIRA Jr., O. N., HE, J. A., ZUCOLOTTI, V., BALASUBRAMANIAN, S., LI, L., NALWA, H. S., KUMAR, J., TRIPATHY, S. K. Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications, 2002. **1**: p. 1-37.
39. ZUCOLOTTI, V., PINTO, A. P. A., TUMOLO, T., MORAES, M. L., BAPTISTA, M. S., RIUL JR. A., ARAÚJO, A. P. U., OLIVEIRA JR. O. N. *Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase*. Biosensors & Bioelectronics, 2006. **21**(7): p. 1320-1326.
40. ZUCOLOTTI, V., DAGHASTANLI, K. R. P., HAYASAKA, C. O., RIUL JR. A., CIANCAGLINI, P., OLIVERIA, O. N. Jr., *Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-layer films for biosensing*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(5): p. 2163-2167.
41. PERINOTTO, A. C., CASELI, L., HAYASAKA, C. O., RIUL JR. A., OLIVERIA, O. N. Jr., ZUCOLOTTI, V. *Dendrimer-assisted immobilization of alcohol dehydrogenase in nanostructured films for biosensing: Ethanol detection using electrical capacitance measurements*. Thin Solid Films, 2008. **516**(24): p. 9002-9005.
42. LUZ, R. A. S., MARTINS, M. V. A., MAGALHÃES, J. L., SIQUEIRA JR, J. R., ZUCOLOTTI, V., OLIVEIRA JR. O. N., CRESPILO, F. N., DA SILVA, W. C., *Supramolecular architectures in layer-by-layer films of single-walled carbon nanotubes, chitosan and cobalt (II) phthalocyanine*. Materials Chemistry and Physics, 2011. **130**(3): p. 1072-1077.
43. TOMALIA, D.A., NAYLOR, A.M., GODDARD, W.A. *Starburst dendrimers - molecular-level control of size, shape, surface-chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1990. **29**(2): p. 138-175.
44. TOMALIA, D.A., BAKER, H., DEWALD, J., HALL, M., KALLOS, G., MARTIN, S., ROECK, J., RYDER, J., SMITH, P. *A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules*. Polymer Journal, 1985. **17**(1): p. 117-132.
45. MAYER, A.M., STAPLES, R. C., *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry, 2002. **60**(6): p. 551-565.
46. FAURE D., BOUILLANT M. L., BALLY, R. *Isolation of azospirillum lipoferum 4t tn 5 mutants affected in melanization and laccase activity*. Applied Environmental Microbiology, 1994. **60**(9): p. 3413-3415.
47. LEONOWICZ, A., BOLLAG, J. M. *Laccases in soil and the feasibility of their extraction*. Soil Biological Biochemistry, 1987. **19**(3): p. 237-242.

48. MIKOLASH A., SCHAUER F. *Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **82**(4): p. 605-624.
49. MOROZOVA, O.V., SHUMAKOVICH, G.P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S., YAROLOV A. I. "Blue" Laccases. Biochemistry(Moscow), 2007. **72**(10): p. 1136-1150.
50. SOLOMON, E.I., SUNDARAM, U. M., MACHONKIN, T. E., *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chemical Reviews, 1996. **96**(7): p. 2563-2606.
51. ENGUITA, F. J., MARTINS, L. O., HENRIQUES, A. O., CARRONDO, M. A. *Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**: p. 19416–19425.
52. ARORA, D. S., SHARMA R. K. , *Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **160**(6): p. 1760-1788.
53. FABBRINI, M., GALLI, C., GENTILI, P., *Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002. **16** (5-6): p. 231-240.
54. BARRIÈRE, F., KAVANAGH, P., LEECH, D. *A laccase–glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer*. Electrochimica Acta, 2006. **51**(24): p. 5187-5192.
55. BOURBONNAIS R., PAICE.G.M *Oxidation of non-phenolic substrates*. FEBS Letters, 1990. **267**(1): p. 99-102.
56. SHIRAISHI T., SANNAMI Y., KAMITAKAHARA H., TAKANO T. *Comparison of a series of laccase mediators in the electro-oxidation reactions of non-phenolic lignin model compounds*. Electrochimica Acta, 2013. **106**: p. 440-446.
57. SOARES, C.H.L., DURAN, N. *Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E1 effluent by Trametes villosa*. Environmental Technology, 1998. **19**(9): p. 883-891.
58. DURÁN, N., ROSA, M. A., D'ANNIBALE, A., GIANFREDA, L. *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(7): p. 907-931.
59. YEAGER, E., *Electrocatalysts for O₂ reduction*. Electrochimica Acta, 1984. **29**(11): p. 1527-1537.
60. SHLEEV, S., JAROSZ-WILKOLAZKA, A., KHALUNINA, A., MOROZOVA, O., YAROLOV, A., RUZGAS, T., GORTON, L. *Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes*. Bioelectrochemistry, 2005. **67**(1): p. 115-124.
61. JENKINS, P., TUURALA, S., VAARI, A., VALKIAINEN, M., SMOLANDER, M., LEECH, D. *A comparison of glucose oxidase and aldose dehydrogenase as mediated anodes in printed glucose/oxygen enzymatic fuel cells using ABTS/laccase cathodes*. Bioelectrochemistry, 2012. **87**: p. 172-177.
62. NOGALA, W., ROZNIECKA, E., ZAWISZA, I., ROGALSKI, J., OPALLO, M. *Immobilization of ABTS - laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen*. Electrochemistry Communications, 2006. **8**(12): p. 1850-1854.
63. LUO, H., JIN, S., FALLGREN, P. H., PARK, H. J., JOHNSON, P. A., *A novel laccase - catalyzed cathode for microbial fuel cells*. Chemical Engineering Journal, 2010. **165**(2): p. 524-528.

64. MANO, N., MAO, F., HELLER, A., *Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose–O₂ Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(21): p. 6588-6594.
65. BARTON, S.C., KIM, H-H., BINYAMIN, G., ZHANG, Y., HELLER, A. *The “Wired” Laccase Cathode: High Current Density Electroreduction of O₂ to Water at +0.7 V (NHE) at pH 5*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(24): p. 5802-5803.
66. PLOTKIN, E.V., HIGGINS., I. J.; HILL, H. A. *O Methanol dehydrogenase bioelectrochemical cell and alcohol detector*. Biotechnology Letters, 1981. **3**(4): p. 187-192.
67. LEE, C.-W., GRAY, H. B., ANSON, F. C., MALMSTRÖM, B. G. *Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal Laccase A*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1984. **172**: p. 289-300.
68. OHARA, T.J., RAJAGOPALAN, R., HELLER, A. *Glucose Electrodes Based on Cross-Linked [Os(bpy)₂Cl]⁺²⁺ Complexed Poly(1-vinylimidazole) Films*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(23): p. 3512-3517.
69. FEI, J., SONG H-K, PALMORE, G.T.R. *A Biopolymer Composite that Catalyzes the Reduction of Oxygen to Water*. Chemistry of Materials, 2007. **19**(7): p. 1565-1570.
70. MEREDITH, M.T., HICKEY, D. P., REDEMANN, J. P., SCHMIDTKE, D. W., GLATZHOFFER, D. T. *Effects of ferrocene methylation on ferrocene-modified linear poly(ethylenimine) bioanodes*. Electrochimica Acta, 2013. **92**: p. 226-235.
71. HALLIWELL, C. M., SIMON., E.; TOH, C.-S.; CASS, A. E. G.; BARTLETT, P. N. *The design of dehydrogenase enzymes for use in a biofuel cell: the role of genetically introduced peptide tags in enzyme immobilization on electrodes*. Bioelectrochemistry, 2002. **55**(1-2): p. 21-23.
72. AKERS, N. L., MOORE, C. M., MINTEER, S. D. *Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes*. Electrochimica Acta, 2005. **50**(12): p. 2521-2525.
73. CRESPILO, F.N., GHICA, E., FLORESCU, M., NART, F. C., OLIVEIRA JR, O. N., BRETT, C. M. A. *A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer–gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator*. Electrochemistry Communications, 2006. **8**(10): p. 1665-1670.
74. FARNETH, W. E., D’AMORE M. B. *Encapsulated laccase electrodes for fuel cell cathodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005. **581**(2): p. 197-205.
75. STOLARCZYK, K., ŁYP, D., ŻELECHOWSKA, K., BIERNAT, J. F., ROGALSKI, J., BILEWICZ, R. *Arylated carbon nanotubes for biobatteries and biofuel cells*. Electrochimica Acta, 2012. **79**(0): p. 74-81.
76. MINTEER, S.D., LIAW, B.Y., COONEY, M.J. *Enzyme-based biofuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(3): p. 228-234.
77. COONEY, M.J. SVOBODA, V., LAU, C., MARTIN, G., MINTEER, S.D. *Enzyme catalysed biofuel cells*. Energy & Environmental Science, 2008. **1**: p. 320-337.
78. IVANOV, I., VIDA KOVIĆ-KOCH, T., SUNDMACHER, K. , *Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling*. Energies, 2010. **3**(4): p. 803-846.
79. OSMAN, M.H.; SHAH, A.A.; WALSH, F.C., *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(7): p. 3087-3102.

80. OPALLO, M. BILEWICZ, R. *Recent Developments of Nanostructured Electrodes for Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction*. Advances in Physical Chemistry, 2011. **2011**: p. 21.
81. YANG X-Y, TIAN,G., JIANG, N., SU, B.-L. *Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design*. Energy & Environmental Science, 2012. **5**(2): p. 5540-5563.
82. FALK, M., BLUM, Z., SHLEEV, S. *Direct electron transfer based enzymatic fuel cells*. Electrochimica Acta, 2012. **82**: p. 191-202.
83. SULLIVAN, B. P., SALMON, D. J., MEYER, T. J. *Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium*. Inorganic Chemistry, 1978. **17**(12): p. 3334-3341.
84. KOBER, E.M., CASPAR J. V., SULLIVAN B. P., MEYER, T. J., *Synthetic Routes to New Polypyridyl Complexes of Osmium II*. Inorganic Chemistry, 1988. **27**(25): p. 4587-4598.
85. LINEWEAVER, H., BURK, D. *The determination of enzyme dissociation constants*. Journal of the American Chemical Society, 1934. **56**(3): p. 658-666.