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

***“Preparação e caracterização de bioanodos para
biocélula a combustível etanol/O₂”***

SIDNEY DE AQUINO NETO

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das
exigências para a obtenção do **Título de Doutor em
Ciências, área: Química.**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade

RIBEIRÃO PRETO - SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Aquino Neto, Sidney

Preparação e caracterização de bioanodos para biocélula a combustível etanol/O₂

200 p. : 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. Bioanodo. 4. Imobilização de enzimas.

Este trabalho é dedicado...

... à minha família e minha noiva ...

Agradecimentos...

... especiais à Profa. Dra. **Adalgisa Rodrigues de Andrade**, pela orientação e contribuição na minha formação enquanto pesquisador. E, principalmente pela sua sincera amizade e paciência tornando estes 7 anos de convívio sempre muito agradáveis.

... a amiga Dr^a Juliane Cristina Forti, responsável pela implementação de uma nova linha de pesquisa no laboratório, da qual dei continuidade neste trabalho.

... ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, não apenas pela brilhante cooperação durante todo o trabalho, mas pela amizade e atenção durante todo meu doutorado.

... ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela excelente contribuição científica durante todo o trabalho realizado.

... a todos do Laboratório de Eletroquímica e Eletrocatalise Ambiental (LEEA), especialmente àqueles que estiveram presentes desde o início de meu trabalho (Ângelo, Fabiana, Franciane, Gabriella, Layciane, Laís, Livia, Luiza, Paula, Perê, Rafaela, Raquel, Rodrigo, Stoppa, Thiago Almeida e Thiago Cavassani).

... aos funcionários do Departamento de Química, da Secretaria e Seção de Pós-Graduação.

... à CAPES pela bolsa de estudo de Doutorado no país e pela bolsa do programa de doutorado no País com estágio no Exterior

... à Pró-Reitoria de pós graduação da USP pelos auxílios concedidos.

...e a todos aqueles que de algum modo (direta ou indiretamente) tenham contribuído para a realização desse trabalho.

... to Prof Dr. Shelley D. Minter, who kindly welcomed me for a 6-month internship at the departments of chemistry and materials science and engineering in the University of Utah - Salt Lake City - Utah - USA, providing me a first and unique living experience outside Brazil.

... to all my American friends, who helped me a lot during my internship in America (Daiy, Fei, Joseph, Kyle, Lindsey, Mathew Shu Chuai, Matt Meredith, and Shannon)

... especiais à minha noiva Emily Lumi Suda, pelo apoio irrestrito desde o início deste trabalho. Não apenas como minha parceira na vida pessoal, mas também durante meu estágio no exterior onde foi responsável por grande parte do trabalho realizado, além de fazer de meu estágio científico uma das maiores experiências pessoais em minha vida.

Sumário

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	x
Abreviações e símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Capítulo 1	1
1. Introdução.....	1
1.1. Demanda energética e fontes alternativas de combustível	1
1.2. Biocélulas a combustível.....	4
1.2.1. Biocélulas a combustível microbiológicas	7
1.2.2. Biocélulas a combustível enzimáticas.....	11
1.2.2.1. As enzimas	11
1.2.2.2. O funcionamento	15
1.2.2.3. Transferência eletrônica em biocélulas a combustível enzimáticas.....	19
- Transferência eletrônica direta	19
- Transferência eletrônica mediada.....	21
1.2.2.4. Metodologias de imobilização de enzimas	23
1.2.2.5. Combustíveis	28
1.2.2.6. Enzimas desidrogenases	29
- A enzima ADH.....	30
- A enzima AldDH.....	34
1.2.2.7. Enzimas PQQ-dependentes.....	37
1.2.2.8. Extração e purificação de enzimas	40
- Fontes de obtenção de enzimas	40
- Cromatografia de troca iônica.....	41

- Cromatografia de exclusão molecular	43
1.2.2.9. Técnicas de caracterização de bioeletrodos.....	44
- Técnicas eletroquímicas.....	44
- Espectrofotometria, Fluorescência e Microscopia eletrônica	46
1.2.2.10. Principais características de desempenho em biocélulas a combustível	47
1.2.2.11. Breve histórico do desenvolvimento das biocélulas a combustível	49
Capítulo 2	53
2. Objetivos	53
Capítulo 3	54
3. Materiais e métodos	54
Parte 1.....	54
3.1. Transferência eletrônica mediada.....	54
3.1.1. Determinação da atividade enzimática pelo método contínuo	55
3.1.2. Eletropolimerização dos eletrocatalisadores da espécie NADH.....	57
3.1.3. Caracterização eletroquímica da espécie NAD⁺	59
3.1.4. Preparação dos bioanodos pelo método de adsorção passiva.....	60
3.1.5. Preparação dos bioanodos pelo método de automontagem.....	61
- Tratamento do suporte de carbono	61
- Quantificação das enzimas durante o processo de automontagem	62
- Preparação dos bioanodos via automontagem	63
3.1.6. Teste de biocélula etanol/O₂	64
Parte 2	65
3.2. Transferência eletrônica direta.....	65
3.2.1. Extração e purificação das enzimas PQQ-dependentes	66
- Crescimento das células de <i>Gluconobacter</i> sp. 33	66
- Lise das células.....	68
- Cromatografia de troca iônica.....	69

- Cromatografia de exclusão molecular	71
3.2.2. Determinação da atividade enzimática das enzimas PQQ-dependentes.....	72
3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	75
3.2.4. Preparação dos bioanodos e caracterização eletroquímica	76
- Preparação dos bioanodos utilizando a membrana Nafion [®] -modificada	76
- Preparação dos bioanodos utilizando o dendrímero PAMAM	79
3.2.5. Preparação dos bioanodos e medidas de densidade de potência.....	81
Capítulo 4	83
4. Resultados e discussão	83
PARTE 1.....	83
4.1. Transferência eletrônica mediada.....	83
4.1.1. Caracterização cinética das enzimas desidrogenases em solução	83
4.1.1.1. Caracterização da enzima ADH	85
4.1.1.2. Caracterização da enzima AldDH	92
4.1.1.3. Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática das enzimas desidrogenases ADH e AldDH.....	98
4.1.2. Caracterização cinética das enzimas desidrogenases imobilizadas.....	101
4.1.2.1. Resultados obtidos com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva.....	101
4.1.2.2. Resultados obtidos com os bioanodos preparados pelo método de automontagem.....	106
4.1.3. Preparação e caracterização eletroquímica dos catalisadores da espécie NAD⁺	116
4.1.3.1. Eletropolimerização dos catalisadores da espécie NAD⁺	116
4.1.3.2. Caracterização eletroquímica da espécie NAD⁺	119
4.1.3.3. Caracterização do filme de eletrocatalisador de NADH.....	121
4.1.4. Caracterização dos bioanodos preparados pela metodologia de adsorção passiva	122

4.1.4.1. Caracterização por MEV dos bioanodos preparados	122
4.1.4.2. Testes de semi-célula etanol/O ₂	125
4.1.4.3. Testes de estabilidade dos bioanodos.....	135
4.1.5. Testes de semi-célula etanol/O ₂ com os bioanodos preparados pela metodologia de automontagem.....	138
4.1.5.1. Sistema mono-enzimático.....	138
4.1.5.2. Sistema enzimático duplo.....	142
Parte 2	145
4.2. Transferência eletrônica direta.....	145
4.2.1. Crescimento da bactéria <i>Gluconobacter</i> sp. 33 e caracterização das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH	145
4.2.2. Caracterização eletroquímica do sistema de TED	154
4.2.2.1. Bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada	154
4.2.2.2. Bioanodos preparados via automontagem PAMAM/ouro	162
4.2.3. Testes de biocélula etanol/O ₂ com TED	167
4.2.3.1. Bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada	167
4.2.3.2. Bioanodos preparados com o dendrímero PAMAM	169
5. Conclusões	177
Capítulo 6	181
6. Perspectivas futuras	181
Capítulo 7	183
7. Referências bibliográficas	183

Lista de figuras

Figura 1: Esquema representativo do funcionamento de uma célula a combustível tradicional.	2
Figura 2: Pesquisa bibliográfica conduzida na base de dados do Chemical Abstract utilizando o termo “biofuel cell”. Fonte: SciFinder Scholar [10].	5
Figura 3: Esquema representativo de um biorreator de uma biocélula a combustível microbiológica.	8
Figura 4: Ilustração da teoria do estado de transição em um processo catalítico enzimático e não enzimático. A = reagente; B = produto; E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto.	12
Figura 5: Representação esquemática de uma biocélula a combustível enzimática.	16
Figura 6: Esquema representativo da faixa de potência fornecida em algumas metodologias de obtenção de energia (baseado em Bullen, 2006 [8]).	17
Figura 7: Representação esquemática dos diferentes processos de transferência eletrônica em biocélulas a combustível enzimáticas.	19
Figura 8: Representação esquemática do procedimento de imobilização por meio de interações físicas utilizando arquiteturas de multicamadas.	25
Figura 9: Esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM geração 4.	27
Figura 10: Figura representativa de um tetrâmero da enzima ADH com respectivo sítio ativo, baseado na estrutura obtida por cristalografia de raios x [81].	31
Figura 11: Representação esquemática do mecanismo de ação da enzima ADH na catálise de oxidação do etanol. E $\equiv$ ADH, A $\equiv$ NAD ⁺ , B $\equiv$ etanol, P $\equiv$ acetaldeído, Q $\equiv$ NADH [79].	33
Figura 12: Figura representativa do dímero da enzima AldDH com respectivos sítios de ligação.	35

Figura 13: Representação esquemática do mecanismo de ação da enzima AldDH na catálise de oxidação do etanol. E $\equiv$ AldDH, A $\equiv$ NAD ⁺ , B $\equiv$ acetaldeído, P $\equiv$ ácido acético, Q $\equiv$ NADH.	36
Figura 14: Estruturas moleculares do grupamento heme-c (à esquerda) e do cofator PQQ (à direita).	37
Figura 15: Ilustração do mecanismo de transferência eletrônica em enzimas PQQ-dependentes, no caso a enzima PQQ-ADH que contém 3 subunidades [95].	38
Figura 16: Representação da estrutura molecular das resinas DEAE (A) e CM (B).	41
Figura 17: Ilustração da cubeta utilizada nos experimentos de cinética enzimática contendo o substrato de carbono com as enzimas imobilizadas.	55
Figura 18: Espectro representativo de absorção UV das espécies NAD ⁺ e NADH, após 2 minutos de cinética utilizando-se a enzima ADH.	56
Figura 19: Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de caracterização da espécie NAD ⁺	59
Figura 20: Representação esquemática do bioanodo preparado pela metodologia de adsorção passiva.	60
Figura 21: Curva de calibração utilizada para quantificação das enzimas adsorvidas durante o processo de preparação dos bioanodos via automontagem.	62
Figura 22: Representação esquemática do bioanodo preparado pela metodologia de automontagem.	63
Figura 23: Esquema representativo da cela eletroquímica utilizada para as medidas de densidade de potência.	64
Figura 24: Meio de cultura de D-mannitol contendo as células de <i>Gluconobacter</i> sp. 33 após 20 horas de crescimento anaeróbico.	66

Figura 25: Meio de cultura de D-mannitol durante o crescimento aeróbico das células de <i>Gluconobacter</i> sp. 33.	67
Figura 26: Figura ilustrativa de um tubo do tipo “falcon” contendo o extrato celular.	67
Figura 27: Esquema representativo do processo de purificação das enzimas PQQ-dependentes via cromatografia.	68
Figura 28: Solução final das enzimas contendo ambas as enzimas PQQ-dependentes PQQ-ADH e PQQ-AldDH.	71
Figura 29: Determinação experimental da absorvidade molar (ϵ) do DCIP.	73
Figura 30: Curva de calibração utilizada para quantificar as enzimas PQQ-dependentes purificadas.	73
Figura 31: Ilustração das duas amostras de bioanodos preparadas para caracterização eletroquímica, na ausência (amostra 1, à esquerda) e na presença de MWCNTs (amostra 2, à direita).	77
Figura 32: Ilustração do bioanodo preparado utilizando o dendrímero PAMAM via automontagem em eletrodo de ouro previamente modificado DTBA.	79
Figura 33: Ilustração dos bioanodos utilizados nos testes de biocélula etanol/O ₂ com TED utilizando o dendrímero PAMAM na ausência (à esquerda), e na presença de MWCNTs (à direita).	82
Figura 34: Curva de absorbância (em 340 nm) em função do tempo obtida nos ensaios de atividade enzimática com as enzimas ADH e AldDH em meio de tampão fosfato, pH 7,2.	84
Figura 35: Primeiras etapas do metabolismo de oxidação do etanol.	85
Figura 36: Influência da quantidade de ADH na cinética enzimática, 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, 1,9 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NAD ⁺ , em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.	85

Figura 37: (A) Influência da concentração de substrato na cinética enzimática; (B) Gráfico do duplo recíproco, 0,2 U de enzima, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^{+} , em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.	87
Figura 38: (A) Influência da concentração de NAD^{+} na cinética enzimática; (B) Gráfico do duplo recíproco, 0,2 U de enzima, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de EtOH em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.	89
Figura 39: Efeito da presença de potássio e íons tiol na atividade da enzima AldDH. AldDH = 0,05 U, $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^{+} em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.	92
Figura 40: Influência da quantidade de AldDH na cinética enzimática, em meio de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^{+} , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol, em meio de tampão fosfato, pH 7,2.	93
Figura 41: Influência da concentração de substrato na cinética enzimática da enzima AldDH, em meio de 0,05 U de enzima, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^{+} , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.	94
Figura 42: Influência da concentração de NAD^{+} na cinética enzimática da enzima AldDH, em meio de 0,05 U de enzima, $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.	96
Figura 43: Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade enzimática da enzima ADH e da enzima AldDH em solução. (●) ADH 0,2 U, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ EtOH, $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NAD^{+} , tampão fosfato, pH 7,2. (○) AldDH 0,05 U, $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NAD^{+} , KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 2-mercaptoethanol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	98
Figura 44: Comparação entre atividade da enzima ADH em solução e imobilizada na superfície do bioanodo em meio de tampão fosfato pH 7,2, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^{+} , ADH = 0,2 U.	101

Figura 45: Comportamento cinético da enzima ADH em função da quantidade de enzima imobilizada em superfície de carbono, em meio de tampão fosfato pH 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, 1,9 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NAD ⁺ .	102
Figura 46: Cinética enzimática da enzima ADH imobilizada em superfície de carbono em função do número de bicamadas, em meio de tampão fosfato pH 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, 1,9 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NAD ⁺ .	107
Figura 47: Perfil cinético da enzima ADH em solução e imobilizada em superfície de carbono pela metodologia de automontagem em meio de solução tampão fosfato pH 7,2 e 0,1 mol L ⁻¹ de etanol; (▲) 0,2 U de ADH em solução, (●) 36 bicamadas de ADH imobilizada. Em detalhe, respectivos gráficos de duplo recíproco.	108
Figura 48: Atividade da enzima ADH imobilizada em superfície de carbono em função do tempo, bioanodo contendo 36 bicamadas de ADH, 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, tampão fosfato, pH 7,2.	110
Figura 49: Perfil cinético da enzima AldDH em solução e imobilizada em superfície de carbono pela metodologia de automontagem em meio de solução tampão fosfato pH 7,2, 1,67 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NAD ⁺ , 0,1 mol L ⁻¹ de KCl, 0,01 mol L ⁻¹ de 2-mercaptoethanol. (▲) AldDH em solução, 0,05 U; (●) 36 bicamadas de AldDH imobilizada. Em detalhe, respectivos gráficos de duplo recíproco.	111
Figura 50: Representação esquemática do processo de regeneração da espécie NAD ⁺ .	117
Figura 51: Voltamogramas cíclicos registrados durante o processo de eletropolimerização do corante verde de metileno (4 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em eletrodo de tecido de carbono a 50 mV s ⁻¹ no intervalo de -0,3 a 1,3 V vs. ECS, em meio de 0,1 mol L ⁻¹ de nitrato de sódio e 1 10 ⁻² mol L ⁻¹ de tetraborato de sódio.	118

Figura 52: Perfil voltamétrico obtido com os diferentes eletrocatalisadores da espécie NAD^+ , em meio de tampão fosfato pH 7,2, $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , na faixa de -0,4 a 0,4 V vs. ECS a 50 mV s^{-1}	119
Figura 53: Imagens de MEV obtidas com o filme de verde de metileno em suporte de carbono em diferentes ordens de aumento. (A) Vista superior com 250 x de aumento. (B) Vista frontal com 2000 x de aumento. (C) Vista superior com 3000 x de aumento. (D) Vista frontal com 5000 x de aumento.	121
Figura 54: Imagens de MEV obtidas com ambos os suportes de carbono utilizados nos testes de potência e estabilidade em diferentes ordens de aumento. Papel de carbono em vista frontal com 250 x de aumento (A) e 5000 x de aumento (B). Tecido de carbono em vista frontal com 250 x de aumento (C) e 500 x de aumento (D).	123
Figura 55: Imagens de MEV obtidas com os bioanodos preparados pela metodologia de adsorção passiva em diferentes ordens de aumento. (A) Vista frontal com 250 x de aumento. (B) Vista superior com 250 x de aumento. (C) Vista frontal com 5000 x de aumento. (D) Vista superior com 5000 x de aumento.	124
Figura 56: Representação esquemática de uma curva de polarização obtida em testes de potência em células a combustível.	125
Figura 57: Curvas de densidade de potência em função da quantidade de enzima imobilizada nos bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH em tecido de carbono.	127
Figura 58: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH	130

Figura 59: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados com os diferentes eletrocatalisadores de NAD^+ pelo método de adsorção passiva utilizando tecido de carbono como suporte, mantendo-se a quantidade de enzima em 28 U de ADH.	132
Figura 60: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva em sistema enzimático duplo em tecido de carbono, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH.....	133
Figura 61: Curvas de densidade de potência em função do tempo de armazenamento dos bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH e tecido de carbono como suporte.	135
Figura 62: Curvas de densidade de potência em experimentos de cronoamperometria com o bioanodo preparado pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH e tecido de carbono como suporte.	136
Figura 63: Curvas de densidade de potência dos bioanodos preparados pelo método de automontagem em função do número de bicamadas em sistema mono-enzimático (A); além da densidade de potência máxima em função da quantidade de enzima (B).	138
Figura 64: Curvas de densidade de potência dos bioanodos preparados pelo método de automontagem com 36 bicamadas em sistema mono-enzimático, na presença e na ausência da camada de difusão gasosa.	141
Figura 65: Curvas de densidade de potência dos bioanodos preparados pelo método de automontagem com 36 bicamadas em sistema enzimático duplo.	143
Figura 66: Medidas de densidade óptica dos meios de crescimento da bactéria <i>Gluconobacter</i> sp. 33 em função da quantidade de oxigênio empregada.....	146

Figura 67: Géis representativos obtidos nos ensaios de eletroforese com a solução de enzimas PQQ-dependentes purificadas após cada etapa cromatográfica.....	148
Figura 68: Curva de absorbância em função do tempo obtida nos ensaios de atividade enzimática com as enzimas ADH e AldDH em meio de tampão fosfato, pH 7,2.....	149
Figura 69: Gráficos de atividade enzimática utilizando o etanol como substrato, em função do tempo de armazenamento em duas diferentes condições de armazenamento, em meio de tampão fosfato pH = 7,2. (A) = 4 °C; (B) = -20 °C.....	150
Figura 70: Cinética enzimática das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH em função da concentração dos respectivos substratos; (A) = etanol; (B) = acetaldeído; além dos respectivos gráficos de duplo recíproco.	151
Figura 71: Voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH imobilizadas na presença e na ausência de MWCNTs em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ , 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, velocidade de varredura = 30 mV s ⁻¹	155
Figura 72: Voltamogramas cíclicos representativos em função da concentração de etanol na presença (A) e na ausência de MWCNTs (B) em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ , velocidade de varredura = 30 mV s ⁻¹	158
Figura 73: Voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH ao longo do processo de purificação das enzimas, imobilizadas na presença de MWCNTs em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ , 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, velocidade de varredura = 30 mV s ⁻¹	160

Figura 74: Voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH, imobilizadas com MWCNTs em eletrodo de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, e também em eletrodos de ouro modificado com DTBA utilizando o dendrímero PAMAM. Tampão fosfato pH 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ , 0,1 mol L ⁻¹ de etanol, velocidade de varredura = 30 mV s ⁻¹	163
Figura 75: Voltamogramas cíclicos representativos em função da concentração de etanol com os bioanodos preparados pela metodologia de automontagem em eletrodo de ouro modificado com DTBA utilizando o dendrímero PAMAM, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ , velocidade de varredura = 30 mV s ⁻¹ . Em detalhe, os picos de oxidação em aumento, além do gráfico de corrente de pico em função da concentração de substrato.	165
Figura 76: Curvas de polarização e densidade de potência obtida com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono via metodologia de adsorção passiva utilizando a membrana Nafion-modificada.....	167
Figura 77: Curvas de polarização e densidade de potência obtida com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono via metodologia de adsorção passiva utilizando o dendrímero PAMAM.....	169
Figura 78: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados com a solução final de enzimas PQQ-dependentes purificadas, na presença e na ausência de nanotubos de MWCNTs, utilizando ambas as metodologias de imobilização, membrana Nafion-modificada e dendrímero PAMAM.	173

Lista de tabelas

Tabela 1: Resumo de alguns dos principais trabalhos publicados em biocélulas a combustível até o ano de 2012	6
Tabela 2: Parâmetros cinéticos da enzima ADH em solução.....	91
Tabela 3: Parâmetros cinéticos da enzima ADH em solução e imobilizada em superfícies de carbono pelo método de adsorção passiva	103
Tabela 4: Parâmetros cinéticos em relação aos respectivos substratos para ambas as enzimas desidrogenases em solução e imobilizadas em plataformas de carbono pela metodologia de automontagem	112
Tabela 5: Resumo de alguns importantes trabalhos publicados na literatura em biocélulas a combustível nos últimos anos.....	129
Tabela 6: Potenciais de circuito aberto e valores de densidade de potência obtidos nos testes de semi-célula etanol/O ₂ com os bioanodos preparados com as enzimas PQQ-dependentes obtidas em cada etapa de purificação utilizando ambas as metodologias de imobilização testadas	171

Abreviações e símbolos

ϵ	Absortividade molar
ATP	Adenosina trifosfato
DTBA	Ácido 4,4-ditiobutírico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
ADH	Álcool desidrogenase
AldDH	Aldeído desidrogenase
A	Ampere
pH	Antilog da concentração hidrogeniônica
~	Aproximadamente
TBAB	Brometo de tetrabutilamônio
CM	Carboximetil
cm	Centímetro
E.C.	Classificação enzimática
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>I</i>	Corrente
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
Da	Dalton
DEAE	Dietilaminoetil
SDS	Dodecil sulfato de sódio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
DSMZ	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i>
GOx	Glicose oxidase
g	Grama
°C	Grau celsius
h	Horas
L	Litro
MTP	Membrana trocadora de prótons
PMS	Metasulfato de fenazina
m	Metro
μ	Micro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MWCNTs	<i>Multi walled carbon nanotubes</i>

m	Mili
min	Minuto
n	Nano
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ITO	Óxido de índio-estanho
PAMAM	Poliamidoamina
PTFE	Politetrafluoretileno
PQQ	Pirroquinolina quinona
PQQ-ADH	Pirroquinolina quinona-álcool desidrogenase
PQQ-AldDH	Pirroquinolina quinona-aldeído desidrogenase
P	Potência
E	Potencial
PCA	Potencial de circuito aberto
E_a	Potencial do anodo
E_c	Potencial do catodo
E_{cel}	Potencial total da célula
%	Porcentagem
k	Quilo
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
TED	Transferência eletrônica direta
TEM	Transferência eletrônica mediada
Tris+	Tris-hidroximetil amino metano-HCl
UV-Vis	Ultra-violeta - visível
Unica	União da Agroindústria Canavieira de São Paulo
U	Unidade de atividade enzimática
vs.	Versus
v	Velocidade de varredura
$v_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima
V	Volt
W	Watts
DCIP	2,6-diclorofenol indofenol

Resumo

Este trabalho descreve a preparação e caracterização de bioanodos para biocélula a combustível etanol/O₂ utilizando enzimas desidrogenases, tanto com transferência eletrônica mediada como com transferência eletrônica direta. Na primeira etapa do trabalho, os resultados de cinética enzimática com as enzimas comerciais álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase em solução e imobilizada mostraram claramente que os vários parâmetros cinéticos analisados devem ser considerados, a fim de se obter atividade máxima com os biocatalisadores; além disso, os resultados obtidos com as diferentes metodologias de imobilização empregadas (adsorção passiva e automontagem) confirmaram que tal etapa é crucial para a obtenção de um sistema viável. Os testes de semi-célula e estabilidade com transferência eletrônica mediada mostraram que o dendrímero PAMAM se mostra bastante atrativo na preparação de bioanodos para biocélula a combustível enzimática com ambas as metodologias testadas. Na segunda parte do trabalho, os resultados obtidos com os bioanodos preparados com as enzimas desidrogenases contendo o grupamento pirroquinolina quinona extraídas da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 e purificadas em laboratório mostraram que ambos os protocolos de imobilização empregados nesta etapa (dendrímero PAMAM e Nafion-modificado) foram capazes de proporcionar um ambiente no qual as enzimas são capazes de realizar transferência eletrônica diretamente com superfícies de ouro e carbono. Com base nos resultados de caracterização eletroquímica, observou-se que a reação de interesse ocorre mais facilmente na presença de nanotubos de carbono, onde se acredita que os grupamentos heme-c permanecem em um arranjo mais adequado que facilita o processo de transferência eletrônica e conseqüentemente fornece maiores correntes catalíticas. Os testes de semi-célula etanol/O₂ com transferência eletrônica direta mostraram que os bioanodos preparados tanto com a membrana Nafion-modificada quanto com o dendrímero PAMAM se mostraram capazes de gerar densidades de potência competitivas em relação a outros métodos de imobilização.

Abstract

This work describes the preparation and characterization of bioanodes for ethanol/O₂ biofuel cell using dehydrogenases enzymes, using either mediated electron transfer or direct electron transfer. First, investigation of the enzymatic kinetics of the commercial enzymes alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in solution and immobilized onto carbon platforms clearly showed that the analyzed kinetic parameters must be considered for achievement of maximum activity. The results obtained by using different immobilization methodologies (passive adsorption and self-assembly) confirmed that this step is crucial for attainment of a viable system. The half-cell and stability tests employing mediated electron transfer showed that PAMAM dendrimers seem to be very attractive for the preparation of bioanodes for enzymatic biofuel cell using the tested protocols. In the second part of the work, the results obtained with the bioanodes prepared with dehydrogenases enzymes containing the pyrroloquinoline quinone group, extracted from the bacteria *Gluconobacter* sp. 33 and purified in our laboratory, revealed that both immobilization protocols employed in this step (PAMAM dendrimers and modified-Nafion) were able to provide an environment in which the enzymes undergo direct electron transfer with gold and carbon surfaces. The electrochemical characterization results evidenced that the reaction of interest occurs more easily in the presence of carbon nanotubes. We believe that the c-heme groups remain in a more suitable arrangement in the nanotubes, which facilitates the electron transfer process and provides higher catalytic currents. Ethanol/O₂ half-cell tests with direct electron transfer showed that both the bioanodes prepared with modified-Nafion membrane and PAMAM dendrimers were capable of generating competitive power densities as compared to other immobilization methods.

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Demanda energética e fontes alternativas de combustível

Fatores econômicos e ambientais, principalmente, têm forçado, cada vez mais, o desenvolvimento de processos limpos e eficientes para produção de energia, resultando em uma contínua busca por fontes de energia alternativa. O comportamento de consumo humano é ainda muito dependente da utilização de combustíveis não renováveis, e o crescente aumento da demanda energética associada ao acelerado crescimento da população mundial, faz com que autoridades, governos, empresas e pesquisadores se dediquem ao desenvolvimento de processos de obtenção de energia eficazes e sustentáveis. É nesse cenário que a produção de energia renovável é vista como um dos meios de amenizar a preocupante questão do aquecimento global além de fornecer novos caminhos ao atual modelo de consumo energético [1]. Fontes de combustíveis alternativas tais como energia solar, hidrogênio, biomassa, biocombustíveis, célula a combustível, entre outras, são algumas das mais promissoras tecnologias disponíveis atualmente [2]. Nesse contexto, grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento das células a combustível, um dispositivo que pode ser compreendido como um sistema capaz de gerar energia elétrica a partir de reações eletroquímicas de oxidação e redução [3].

As células a combustível tradicionais apresentam características únicas frente a outras tecnologias, principalmente devido a sua elevada eficiência de conversão e densidade de potência. Caracterizada como uma tecnologia não poluente e silenciosa, este sistema promove a conversão de energia química em eletricidade de acordo com o mecanismo ilustrado na **Figura 1**. A reação se inicia com a etapa de oxidação de um combustível (geralmente hidrogênio, e álcoois de cadeia curta como o metanol, o etanol e o glicerol) por catalisadores de metais nobres como platina e rutênio.

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

Após a etapa de oxidação, elétrons são gerados e carregados por meio de um circuito externo até o lado catódico, onde então reagem com uma molécula oxidante (geralmente oxigênio) resultando em trabalho elétrico e formando, como produto final, água. Existem diferentes tipos básicos de célula a combustível, que se diferenciam pelo tipo de eletrólito utilizado e pela faixa de temperatura de operação [1]. As chamadas células alcalinas possuem como eletrólito 35 – 50 % de KOH e operam na faixa de 60 a 90 °C, obtendo eficiência energética na ordem de 50 – 60 % e têm como desvantagem perda de eficiência na presença de CO₂ [1]. As células de ácido fosfórico utilizam o mesmo, como eletrólito, e operam com uma eficiência na ordem de 55 % a 160 - 220 °C. As chamadas células de óxidos sólidos ou de alta temperatura operam na faixa de 800 - 1000 °C e utilizam como catalisadores materiais cerâmicos como óxidos de ítrio e zircônio. Graças ao seu poder de operação em baixas temperaturas, as conhecidas células a combustível que utilizam uma membrana trocadora de prótons (MTP), também chamadas de eletrólito polimérico fornecem elevadas densidades de potência e operam entre 50 e 80 °C utilizando geralmente catalisadores a base de platina [3].

As células a combustível convencionais apresentam resultados bastante satisfatórios, no entanto, alguns fatores consideráveis limitam uma futura aplicação comercial em larga escala. Os principais deles são o elevado custo dos catalisadores metálicos (principalmente a platina, que ainda é o metal utilizado em maior quantidade como catalisador base), e problemas quanto à passivação destes eletrodos, além da ineficiência para oxidar alguns subprodutos dos combustíveis utilizados [4]. Além disso, o processo de produção, purificação e armazenamento do hidrogênio (combustível mais utilizado em células a combustível) possui ainda grandes desafios técnicos; desta forma, a produção em larga escala de todos os insumos relacionados às células a combustíveis ainda são desafios a serem vencidos pelos pesquisadores [1].

1.2. Biocélulas a combustível

Alternativamente às células a combustível convencionais que utilizam catalisadores metálicos, a biocélula a combustível (do inglês biofuel cell) é um caso particular das células a combustível, no qual enzimas (biocélula a combustível enzimática) ou micro-organismos (biocélula a combustível microbiológica) são utilizados como catalisador ao invés dos tradicionais catalisadores de metais nobres [5]. Esses dispositivos podem ser definidos como um sistema capaz de transformar diretamente energia química em elétrica por meio de reações que envolvem etapas bioquímicas; ou ainda, como células a combustível na qual a atividade da célula (ou parte dela) se deve à atuação de biocatalisadores [6]. A conexão entre biologia e eletricidade e o conceito de uma biocélula a combustível é conhecido desde sua primeira demonstração em 1912, quando M.C. Potter observou a produção de eletricidade em uma cultura de bactéria *E. coli* em estudos de semi-célula com eletrodos de platina [7]. Após algumas décadas, o interesse na utilização dessa tecnologia aumentou muito impulsionado pelo programa espacial dos Estados Unidos nos anos 50 e 60, no qual a ideia central do projeto envolvia a utilização das biocélulas a combustível em duas frentes: para o tratamento do resíduo gerado pelas aeronaves além da consequente geração de eletricidade [8].

Motivada pela possibilidade de aplicação in vivo deste dispositivo, a primeira descrição de uma biocélula a combustível utilizando enzimas isoladas na superfície de um eletrodo data de 1964; onde Yahiro *et al.* mostraram 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]. Desde então, observa-se um crescente aumento no número de publicações na área (**Figura 2**) que demonstra o interesse cada vez maior de pesquisadores por este tema [10].

Figura 2: Pesquisa bibliográfica conduzida na base de dados do Chemical Abstract utilizando o termo “biofuel cell”. Fonte: SciFinder Scholar [10].

As principais motivações dos grupos de pesquisa que vislumbram o desenvolvimento destes dispositivos estão diretamente associadas às vantagens deste sistema, principalmente relacionadas à:

- Utilização de catalisadores limpos e renováveis (enzimas ou micro-organismos);
- Habilidade de operar em temperaturas brandas (20 - 40 °C) e condições de pH fisiológico;
- Possibilidade de se utilizar diversos combustíveis devido à grande diversidade e especificidade de enzimas e micro-organismos existentes.

Acrescenta-se ainda, que com uma possível utilização em larga escala dos biocatalisadores, tende a se obter uma considerável diminuição do custo de produção dos mesmos, enquanto tal conclusão não pode ser feita em relação aos catalisadores de metais de transição. Em conjunto, todas essas vantagens favorecem a obtenção de um processo economicamente viável, que tem sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa em

várias partes do mundo [8, 11, 12]. A **Tabela 1** apresenta um resumo de alguns dos principais trabalhos já publicados em biocélulas a combustível e o foco central de cada pesquisa.

Tabela 1: Resumo de alguns dos principais trabalhos publicados em biocélulas a combustível até o ano de 2012

Referência	Foco do trabalho
Potter, 1912 [7]	Primeira descrição de produção de eletricidade a partir de micro-organismos
Yahiro, 1964 [9]	Primeiro trabalho de biocélula a combustível utilizando enzimas isoladas
Wingard Jr, 1982 [13]	Primeira revisão sobre biocélulas mostrando aspectos teóricos de operação
Palmore e Witesides [6]	Primeiro capítulo dedicado a ambas biocélulas enzimática e microbiológica
Willner, 1998 [14]	Biocélula a combustível enzimática sem utilização de membranas
Cosnier, 1999 [15]	Procedimentos eletroquímicos para imobilização de biomoléculas
Armstrong, 2000 [16]	Processos cinéticos na interface biomolécula/eletrodo
Katz, 2003 [17]	Geralmente citado como texto base em biocélulas a combustível
Barton, 2004 [18]	Revisão em biocélulas a combustível implantáveis e em microdispositivos
Palmore, 2004[19]	Revisão sobre biocélulas microbiológicas e seu poder de geração de energia
Bullen, 2006 [8]	Revisão sobre ambas biocélulas enzimáticas e microbiológicas
Logan, 2006 [20]	Materiais e métodos utilizados na construção de biocélulas microbiológicas
Lovley, 2008 [21]	Processo de transferência eletrônica em biocélulas microbiológicas
Sakai, 2009 [22]	Biocélula a combustível enzimática glicose/O ₂ de alta potência (Sony®)
Osman, 2011 [23]	Recentes avanços no desenvolvimento de biocélulas enzimáticas
Zebda, 2011 [24]	Biocélula enzimática sem membrana com maior potência já descrita

1.2.1. Biocélulas a combustível microbiológicas

A tecnologia utilizando células a combustível microbiológicas, que convertem a energia armazenada nos compostos orgânicos em eletricidade por meio de reações catalisadas por micro-organismos, tem despertado grande interesse dos pesquisadores desde seu desenvolvimento pelo programa espacial dos Estados Unidos na década de 60 [25]. Em teoria, a grande maioria das bactérias pode ser utilizada em biocélulas microbiológicas com o intuito de produzir eletricidade simultaneamente com a realização de degradação de resíduos de matéria orgânica [26]. Para se entender como um biocélula microbiológica produz eletricidade, se faz necessário entender como bactérias obtêm e processam a energia. As bactérias crescem catalisando reações bioquímicas e armazenando energia na forma de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) [27]. Em uma biocélula microbiológica, as bactérias catalisam reações de oxidação de substratos orgânicos, liberando assim alguns dos elétrons produzidos na respiração celular para um eletrodo, onde eles fluem por meio de um circuito externo até o lado catódico do sistema e produzem corrente elétrica. Uma reação típica que ocorre na superfície de um eletrodo em biocélulas microbiológicas é apresentada a seguir utilizando o acetato como exemplo de substrato:

A reação global pode ser compreendida, então, como a quebra do substrato até dióxido de carbono e água com consequente produção de eletricidade. Um biorreator de uma biocélula microbiológica gera energia elétrica a partir do fluxo de elétrons do anodo ao cátodo por meio de um circuito externo, como apresentado na **Figura 3**.

Figura 3: Esquema representativo de um biorreator de uma biocélula a combustível microbiológica.

Apesar de existirem alguns exemplos de micro-organismos que são capazes de formar um biofilme e transferir elétrons diretamente ao eletrodo por meio de sua membrana celular, tais como *Geobacteraceae sulfurreducens* [28], *Shewanella putrefaciens* [29], e *Geobacter metallireducens* [30]; a grande maioria deles não é capaz de realizar este processo de transferência eletrônica e, necessita de uma molécula mediadora que auxilia nesta reação fazendo com que o processo seja termodinamicamente favorável [31]. Este tipo de comportamento se deve principalmente ao fato das camadas externas dos micro-organismos serem basicamente compostas por membranas lipídicas de baixa condutividade, que dificultam o processo de transferência eletrônica diretamente com a superfície de um eletrodo. Estas moléculas mediadoras atuam diretamente na membrana celular dos micro-organismos realizando o processo de transferência de elétrons com a superfície do eletrodo em uma biocélula microbiológica e, devem possuir como principais características [32]:

- Ser capaz de atravessar a membrana celular;
- Ser capaz de retirar elétrons das cadeias reacionais;
- Apresentar elevada taxa de reação com o eletrodo;
- Apresentar boa solubilidade no eletrólito;
- Não ser biodegradável e nem tóxico aos micro-organismos e;
- Apresentar baixo custo.

Em termos práticos, em uma biocélula a combustível microbiológica, o quão eficiente for o processo de transferência eletrônica entre micro-organismo/mediador /eletrodo influenciará diretamente na eficiência ou não do processo global. Nesse contexto, dentre as principais moléculas que são utilizadas como mediador de transferência de elétrons em biocélulas microbiológicas, destacam-se alguns corantes sintéticos e complexos metalo-orgânicos como o vermelho neutro, azul de metileno, tionina, azul de meldola, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e o complexo Fe(III)EDTA [25].

As principais vantagens das células a combustível microbiológicas frente às enzimáticas estão relacionadas ao maior tempo de vida destes dispositivos, além de um relativo menor custo e capacidade de oxidar completamente vários substratos [5]. Além disso, este sistema apresenta benefícios como a capacidade de converter biomassa em eletricidade em temperaturas inferiores a 20 °C e baixas concentrações de substrato [25]. A versatilidade de substrato em biocélulas microbiológicas é mais um dos fatores que favorecem a utilização desta técnica. Encontram-se na literatura trabalhos mostrando a possibilidade de utilização desse sistema com uma grande variedade de substratos, desde compostos puros a resíduos reais bastante complexos [27]. Para este fim, misturas contendo vários micro-organismos são preparadas com o intuito de promover uma maior taxa de degradação e consequentemente, maior corrente elétrica gerada [27].

As principais aplicações para o desenvolvimento das biocélulas microbiológicas estão bastante relacionadas à possibilidade de tratamento de resíduos orgânicos associado à produção de eletricidade, com vários exemplos encontrados na literatura que demonstram a possível aplicação desse sistema em resíduos sanitários, domésticos, suínos, entre outros [25]. Entretanto, a literatura mostra também outras possibilidades de utilização do mesmo sistema, tais como biosensores de poluentes orgânicos para monitoramento de controle de análise in situ da tradicional demanda bioquímica de oxigênio [33]; além da possibilidade de utilização das biocélulas microbiológicas para produção do mais utilizado combustível e estudos de célula a combustível, o hidrogênio. Em termos energéticos, a produção de biohidrogênio em uma biocélula microbiológica é desfavorável, ou seja, em condições normais de operação, prótons são liberados na reação anódica e migram para o lado catódico e reagem com oxigênio para formação de água. Por esse motivo, a reação para produção de hidrogênio a partir dos prótons e elétrons produzidos pelo metabolismo dos micro-organismos em uma biocélula necessita ser forçada pela aplicação de um potencial externo [34]. Apesar do gasto energético associado a esse processo, o mesmo é bastante favorável em relação às tradicionais metodologias, como a eletrólise da água [34].

Até o presente momento, o desempenho deste sistema ainda está muito aquém daquele que se necessita para uma possível aplicação comercial e, melhorias significativas em termos de densidade de potência, estabilidade, membranas com menor custo e maior durabilidade, materiais anódicos e catódicos mais eficientes são ainda objetivos a serem alcançados [35]. Nesse contexto, pesquisadores vêm buscando novas possibilidades em termos de mediadores e micro-organismos com taxa de transferência eletrônica mais eficiente, além da incorporação/preparação de materiais nanoestruturados que possibilitem uma maior área superficial e uma interface com a superfície do eletrodo mais integrada à estrutura do micro-organismo [35].

1.2.2. Biocélulas a combustível enzimáticas

1.2.2.1. As enzimas

O termo enzima é derivado do Latim que significa “na levedura”, onde se imaginava as enzimas só existindo em um organismo, sendo assim “inseparáveis”. Este pensamento foi mantido até que Sumner em 1926 conseguiu cristalizar a enzima uréase, demonstrando que estes compostos eram, de fato, proteínas [36]. A partir daí, as enzimas foram definidas como polipeptídios que catalisam uma determinada reação com certo grau de especificidade [37]. Deste modo, todas as enzimas são proteínas e, sua funcionalidade é uma consequência direta de sua sequência de aminoácidos, ou seja, de sua estrutura primária. Além disso, a maneira pela qual esses aminoácidos são “dobrados” em uma determinada conformação (ou seja, de acordo com sua estrutura secundária), as interações das cadeias laterais de aminoácidos (estrutura terciária) e, a natureza do arranjo das subunidades proteicas (estrutura quaternária) são os fatores determinantes para a função desempenhada por cada enzima. O tamanho molecular das enzimas pode variar de mil até alguns milhares de Daltons (Da), entretanto, a grande maioria das enzimas se encontra na faixa de 30 a 50 kDa. Embora as enzimas sejam proteínas que contém centenas de resíduos de aminoácidos, apenas alguns resíduos estão envolvidos diretamente no processo de ligação enzima-substrato, ou seja, na catálise. Deste modo, a natureza do processo catalítico é dependente dos aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima, e conseqüentemente ao mecanismo cinético de ação das enzimas. O restante dos aminoácidos está diretamente ligação à distribuição espacial das enzimas, que determinam a entrada/saída de substrato/produto além de coenzimas que participam do processo catalítico [38]. Além disso, a flexibilidade estrutural das enzimas e suas interações também influenciam e controlam a atividade das mesmas.

A nomenclatura utilizada na classificação de milhares de enzimas existentes segue a seguinte distribuição [37]:

- Oxirredutases: enzimas que catalisam reações com transferência de elétrons;
- Transferases: enzimas que catalisam reações com transferência de grupo;
- Hidrolases: enzimas que catalisam reações de hidrólise;
- Liases: enzimas que catalisam reações de quebra de ligações duplas;
- Isomerasas: enzimas que catalisam reações de isomerização;
- Ligases: enzimas que catalisam reações de formação de ligações.

O processo catalítico enzimático é compreendido com base na catálise tradicional de reações químicas, ou seja, como a aceleração de um processo que seria realizado em uma velocidade bastante baixa, e ocorre na presença de um agente que não é consumido durante o processo reacional. A teoria do estado de transição ilustrada na **Figura 4**, que governa o processo catalítico em processos enzimáticos, inicialmente descrita por Eyring [39], se baseia na diminuição da energia de ativação de uma reação química; ou seja, diminuindo a barreira termodinâmica que dificulta a ocorrência de uma determinada reação.

Figura 4: Ilustração da teoria do estado de transição em um processo catalítico enzimático e não enzimático. A = reagente; B = produto; E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto.

Uma das principais avaliações quantitativas da relação entre enzima e substrato, sendo uma das mais utilizadas em processos cinéticos é a descrição cinética fornecida pelo modelo de Michaelis-Menten (equações 3 e 4), na qual a função extraída da curva de velocidade reacional em função da quantidade de substrato é uma hipérbole retangular [40]. É claro que o comportamento “michaeliano” não pode ser aplicado como mecanismo padrão para todas as reações enzimáticas, entretanto, acaba sendo útil na grande maioria dos casos.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Por meio do tratamento estatístico obtido pela equação de Michaelis-Menten, determina-se tanto a velocidade máxima ($v_{\max}$) da reação associada à conversão de um substrato, S, como a constante de Michaelis-Menten, K_m , que indica a especificidade da enzima em relação a um determinado substrato. Outra constante de grande importância em estudos de cinética enzimática é o número de renovação ou de “*turnover*” (K_{cat}), a qual indica o número máximo de moléculas de substrato convertidas a moléculas de produto por sítio ativo por unidade de tempo. Acrescenta-se ainda, que a atividade enzimática é descrita em Unidades (U), onde 1 U corresponde à 1 μmol de substrato convertido à produto por minuto por mg de enzima.

Assim como outras reações químicas, as reações catalisadas por enzimas são altamente dependentes do ambiente reacional, nesse sentido, temperatura e pH são importantes pontos a serem considerados. A faixa ideal de temperatura da grande maioria das enzimas fica entre 20 - 50 °C, e mesmo sendo verdade que a maioria das enzimas se desnatura em elevadas temperaturas, muitas delas têm sua estrutura peptídica mantida mesmo em

elevadas temperaturas, resistindo até certos tratamentos acima de 100 °C [41]. Já o efeito do pH do meio é geralmente relacionado à ionização reversível do substrato ou dos resíduos de aminoácidos das enzimas, sendo assim, este parâmetro acaba sendo característico de cada biomolécula e varia também com o substrato em questão [37].

Embora as enzimas catalisem uma série de reações por meio da formação de um complexo enzima-substrato, estas reações só ocorrem em associação com espécies chamadas de cofatores, que se ligam covalentemente ou ionicamente ao sítio ativo da enzima. Esses cofatores podem ser íons metálicos, tais como Cu^{2+} , Fe^{3+} ou Zn^{2+} (fato que explica o porquê dos organismos vivos necessitarem de suplementos metálicos em sua dieta), ou ainda compostos orgânicos. As principais espécies orgânicas que atuam como coenzima de várias enzimas são a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD).

Graças a suas excelentes características catalíticas e biodisponibilidade, enzimas têm sido muito exploradas na bioeletroquímica em estudos de preparação de biosensores e bioeletrodos para biocélulas a combustível, com o objetivo de usufruir da grande especificidade em reações químicas desses materiais biológicos na superfície de um eletrodo.

1.2.2.2. O funcionamento

Perto de completar 50 anos desde as primeiras descrições de utilização de enzimas com o intuito de produzir corrente elétrica [9], o desenvolvimento de dispositivos que se baseiam na imobilização de proteínas em superfícies sólidas é cada vez mais alvo de muitos grupos de pesquisa [10, 42-46], inclusive de grandes companhias tecnológicas [22, 47]. O mecanismo pelo qual se baseia a obtenção de corrente elétrica por meio de reações catalisadas por enzimas é intrinsicamente relacionado à ocorrência de reações bioeletroquímicas na superfície de um eletrodo e consequente aproveitamento dos elétrons gerados nestas reações de oxidação catalisadas por enzimas. As equações 5 a 9 exemplificam o mecanismo de obtenção de elétrons na catálise enzimática de oxidação do metanol via enzimas desidrogenases NAD⁺-dependentes.

O esquema de funcionamento de uma biocélula a combustível enzimática procede de maneira análoga às convencionais. O processo inicia-se a partir de uma reação de oxidação de um combustível catalisada por biocatalisadores no ânodo que promove a liberação de elétrons, por meio de um circuito externo, até o lado catódico com subsequente redução de um oxidante (geralmente O₂) resultando em trabalho elétrico (**Figura 5**). Em outras palavras, a corrente elétrica flui de acordo com uma diferença de potencial e consequentemente, potência é gerada diretamente do combustível/substrato por meio de uma reação catalisada por enzimas.

Figura 5: Representação esquemática de uma biocélula a combustível enzimática.

A utilização de enzimas isoladas como biocatalisadores em biocélulas a combustível apresenta algumas vantagens frente às biocélulas a combustível microbiológicas, dentre elas: variedade de reações que são catalisadas por enzimas com especificidade incomparável mesmo na presença de impurezas [48]; maior poder de aplicabilidade *in vivo* deste dispositivo [18]; além de fornecer maiores valores de densidade de potência, uma vez que biocélulas a combustível microbiológicas possuem limitações nos processos de transferência de massa e elétrons impostas pela membrana celular dos micro-organismos [8]. Comparativamente as biocélulas microbiológicas, os dispositivos enzimáticos geralmente conseguem promover maiores correntes elétricas; entretanto, esse sistema é muitas vezes limitado à oxidação incompleta dos substratos e menor tempo de vida. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura utiliza apenas o sistema enzimático único, com uma etapa de oxidação do combustível envolvendo um ou dois elétrons; porém, encontram-se trabalhos que buscam a imobilização de enzimas em cascata na superfície de um eletrodo com o objetivo de oxidar o combustível até dióxido de carbono e assim, aproveitar ao máximo a densidade de energia de um composto [49, 50].

Diferentemente das células a combustível tradicionais, que fornecem densidades de potência da ordem de mili a quilo watts, as biocélulas a combustível fornecem densidades de

potência da ordem de micro a alguns mili watts, que são suficientes para aplicações em pequenos dispositivos eletrônicos [22]. O esquema representativo da **Figura 6** mostra a faixa de potência de alguns dos mais utilizados sistemas de obtenção de energia [8]. Além da possibilidade de aplicação como fontes de energia em baterias, o poder de aplicação in vivo para dispositivos onde o combustível possa ser repostado continuamente (por exemplo, aparelhos marca-passos, neuroestimuladores, transportadores de droga, sensores de glicose, etc.) é um grande atrativo desta tecnologia [8].

Figura 6: Esquema representativo da faixa de potência fornecida em algumas metodologias de obtenção de energia (baseado em Bullen, 2006 [8]).

Apesar das diversas vantagens e potenciais aplicações apresentadas pelas biocélulas a combustível enzimáticas, existem fatores cruciais no desenvolvimento deste sistema a fim de se obter um dispositivo eficiente. O primeiro grande desafio no desenvolvimento de bioeletrodos para utilização em biocélulas a combustível enzimáticas está relacionado ao fato de que em enzimas são proteínas e, como tais, possuem uma frágil estrutura tridimensional que precisa ser mantida para se obter atividade catalítica [5]. Apesar de serem catalisadores extremamente específicos e eficientes, as enzimas possuem um tempo de vida bastante

limitado quando em solução; por esta razão, sua utilização em estudos de biocélula requer uma etapa crucial, na qual estas biomoléculas necessitam ser imobilizadas na superfície de um eletrodo.

A realização de contato elétrico entre enzimas e eletrodos é um dos processos de fundamental importância na bioeletroquímica; sendo assim, os pontos mais críticos em relação à construção de uma biocélula a combustível enzimática estão relacionados principalmente à imobilização da enzima em uma superfície sólida, além do processo de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima até a superfície do eletrodo.

1.2.2.3. Transferência eletrônica em biocélulas a combustível enzimáticas

- Transferência eletrônica direta

O processo de transferência de elétrons entre enzima/eletrodo é geralmente classificado em duas grandes áreas, conhecidas como transferência eletrônica direta (TED) e transferência eletrônica mediada (TEM), como ilustrado na **Figura 7** [51].

Figura 7: Representação esquemática dos diferentes processos de transferência eletrônica em biocélulas a combustível enzimáticas.

Pouco mais de 1300 enzimas oxidoredutases (enzimas que catalisam reações envolvendo transferência eletrônica) são conhecidas até o presente momento [52], que possivelmente podem ser utilizadas como biocatalisadores em biocélulas a combustível enzimáticas; no entanto, menos de 100 delas são capazes de realizar conexão elétrica com substratos sólidos, transferindo elétrons diretamente do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo [53]. Este comportamento se deve pelo fato de que este processo ocorre somente em enzimas que tem a habilidade de atuar como transdutores moleculares, convertendo um sinal químico em elétrico, via transferência de carga na presença de espécies redox estáveis [54]. Assim, 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 [5]. A literatura mostra que o mecanismo de tunelamento dos elétrons em um sistema enzimático irá depender da estrutura da enzima, da localização do centro redox (normalmente localizado dentro da estrutura proteica e não na região periférica), da orientação da enzima na superfície do eletrodo e, principalmente, da distância da transferência eletrônica [55]. Pode-se inferir então, que uma boa taxa de transferência de elétrons entre enzima e eletrodo só será obtida se todas estas condições forem alcançadas [56].

As grandes vantagens nesse 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 [57]. Acrescenta-se ainda, que este tipo de transferência eletrônica tem como grande característica a simplicidade de construção dos bioeletrodos, que favorece o processo de miniaturização deste dispositivo [54].

Apesar do processo de TED ser alvo, cada vez maior, dos pesquisadores pelas vantagens já discutidas, este sistema geralmente leva a menores valores de potência devido à dificuldade de conectar eletricamente quantidade suficiente de enzima para obter valores de potência satisfatórios; além disso, a grande maioria das enzimas capazes de realizar esse tipo de transferência (tais como as enzimas PQQ(pirroquinolina quinona)-dependentes) não está disponível comercialmente, e, portanto, necessita-se de processos de extração e purificação em laboratório para obtenção das mesmas [58].

- Transferência eletrônica mediada

Uma vez que na grande maioria dos casos em biocélulas a combustível enzimáticas, as enzimas utilizadas não são capazes de se comunicar com a superfície do eletrodo pelo mecanismo de TED [53], o uso de moléculas mediadoras se faz necessário para realizar a conexão elétrica entre enzima e eletrodo. É fato que a eficiência bioeletrocatalítica de um sistema enzimático em estudos de biocélula a combustível é fortemente regulada pela condutividade elétrica entre o centro redox da enzima e a superfície eletródica. Entretanto, geralmente observa-se na maioria das enzimas oxirredutases o centro redox “enterrado” no interior da matriz proteica, o que dificulta muito a comunicação elétrica com o eletrodo [59, 60].

Apesar da necessidade de se acoplar uma molécula mediadora ao sistema, o processo de TEM é muitas vezes preferido ao processo de TED pelo fato de se obter valores maiores de densidade de potência e pela possibilidade de se utilizar enzimas facilmente obtidas comercialmente, tais como as enzimas álcool desidrogenase (ADH) e GOx. As moléculas mediadoras podem ser utilizadas tanto ancoradas na superfície do eletrodo (como por exemplo, na forma de filme polimérico) como livres em solução, para então realizar o processo de retirada dos elétrons gerados durante a catálise enzimática e transportá-los até o eletrodo [8, 61]. Estes mediadores devem apresentar algumas características essenciais para realizar eficientemente a mediação enzima/eletrodo, destacando-se: uma rápida reação com a forma reduzida da enzima, além de apresentar solubilidade em ambas as formas reduzida e oxidada para difundir rapidamente até o eletrodo e/ou enzima. De maneira geral, estudos mostram que além de características como não-toxicidade, estabilidade e biocompatibilidade, o poder de aplicação de um mediador é bastante relacionado à faixa de potencial redox do mesmo, que deve estar próxima ao par redox da enzima a ser utilizada [18].

A literatura mostra que alguns compostos derivados de ferroceno e quinonas geralmente apresentam essas características e podem ser empregados em estudos de biocélula com mediadores difusionais [61]. Além deles, complexos de ósmio, polipirrol, ftalocianinas, corantes orgânicos, entre outros complexos metálicos tem sido estudados como mediadores estabilizados em uma superfície sólida [62]. Destaca-se também a espécie mais utilizada em estudos mediados em biocátodos, o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico). Vários trabalhos na literatura apontam a grande eficácia deste composto na mediação da reação de redução de oxigênio à água, com a enzima laccase [63].

Um dos casos mais observados em estudos de biocélulas enzimáticas com transferência mediada são os sistemas nos quais enzimas redox possuem como cofator as espécies NAD^+ ou NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) fracamente ligadas; essas espécies têm a capacidade de difundir até o eletrodo carregando consigo os elétrons provenientes da catálise enzimática [8]. Um ponto chave deste tipo de sistema mediado está relacionado ao sobrepotencial da reação de regeneração de sua espécie oxidada que ocorre na superfície do eletrodo; no sentido de que, sobrepotenciais muito elevados inviabilizam a regeneração destas espécies e tornam o processo energeticamente desfavorável. Por esse motivo, vários eletrocatalisadores com grupamentos azo vêm sendo utilizados com o objetivo de diminuir o sobrepotencial de regeneração da espécie reduzida. Compostos como o verde de metileno, azul de metileno, azul A, azul de toluidina e tionina possuem vários potenciais redox formais e várias reações eletrocatalíticas relacionadas à oxidação do cofator, e assim possuem vasto potencial de aplicabilidade para este tipo de sistema [5].

1.2.2.4. Metodologias de imobilização de enzimas

A etapa de imobilização de biomoléculas em superfícies sólidas é de grande interesse científico, uma vez que existem inúmeras possibilidades de utilização de enzimas em diferentes áreas de interesse biotecnológico, principalmente na área industrial e analítica [8]. O crescente interesse no desenvolvimento e melhoria das técnicas de imobilização justifica-se, já que esta etapa influenciará diretamente na eficiência do bioeletrodo preparado e consequentemente no tempo de vida da enzima imobilizada. O processo de retirada das enzimas de seu ambiente natural em solução, no qual se tem maior facilidade de entrada/saída de substrato/produto, para uma superfície sólida requer metodologias que mantenham a conformação das proteínas, além de conservar suas propriedades catalíticas. Desse modo, o processo de imobilização deve garantir um microambiente adequado para que a enzima resista às mudanças bruscas de temperatura, pH e composição da solução, que frequentemente desnaturam ou inativam as mesmas, além de fornecer uma camada mecânica e quimicamente estável sem formar uma região capacitiva na superfície do eletrodo [10].

Devido à presença de diversos grupos funcionais na estrutura das proteínas, diferentes metodologias de imobilização podem ser empregadas para ancorar enzimas em superfícies sólidas. De maneira geral, as metodologias de imobilização podem ser agrupadas em dois grandes grupos: métodos químicos e métodos físicos. Dentre as metodologias químicas, nas quais as enzimas são ligadas diretamente a um suporte sólido, destacam-se o processo via ligação cruzada, sol-gel, e ligação covalente [64, 65]. A metodologia de ligação cruzada (*cross-linking*, em inglês) é um dos métodos mais utilizados, principalmente, por sua simplicidade. Geralmente realizada em reações com glutaraldeído, esta técnica acabou sendo preterida em estudos de biocélula devido à diminuição da atividade enzimática, geralmente observada durante o processo de preparação [48].

Matrizes sol-gel têm sido utilizadas tanto para fabricação de biosensores quanto para bioeletrodos em estudos de biocélula, para encapsular as enzimas e conectá-las diretamente ao eletrodo, obtendo-se resultados bastante satisfatórios, muito devido à formação de uma estrutura contendo diversas cavidades [66]. Já a ligação covalente direta entre enzima e substrato sólido desenvolvida, usualmente, na forma de modificação de superfícies eletródicas que posteriormente são capazes de formar ligações covalentes com as enzimas, é geralmente, o tipo de sistema idealizado para preparação de monocamadas.

Muitas vezes, as ligações químicas não se fazem necessárias, e graças à simplicidade e grande eficácia, processos físicos acabam sendo mais vantajosos e são preferidos em relação aos químicos. Nesse sentido, o aprisionamento em microcápsulas e géis poliméricos, além de processos de adsorção, são geralmente utilizados em biocélulas a combustível enzimáticas [64, 65]. Heller mostrou a possibilidade de imobilização de várias enzimas em hidrogéis poliméricos, geralmente contendo um centro redox de ósmio [45].

O processo físico de micro-encapsulamento se caracteriza pelo aprisionamento das enzimas nos poros de uma membrana. Esta metodologia vem sendo utilizada com grande sucesso por Minteer *et al.*, empregando-se a membrana Nafion[®] modificada para imobilizar enzimas desidrogenases em superfícies de carbono [42, 49, 50]. O tratamento da membrana Nafion[®] com brometo de tetrabutilamônio (TBAB, em inglês) resulta em um ambiente favorável à imobilização de biomoléculas, uma vez que este tratamento retém as propriedades físicas da membrana sem modificação, diminuindo a acidez da mesma, além de aumentar o transporte de massa através da membrana. Resultados mostram que quitosana pode ser facilmente modificada tornando-a hidrofóbica e fornecendo assim um bom ambiente para o encapsulamento de biomoléculas. Klotzbach *et al.* descrevem resultados satisfatórios na imobilização de enzimas desidrogenases com quitosana modificada [67].

Várias enzimas e proteínas podem ser eficientemente imobilizadas sobre substratos sólidos utilizando arquiteturas de multicamadas, na qual as biomoléculas podem ser ancoradas tanto por meio de interações físicas (eletrostáticas) quanto por interações covalentes. No primeiro caso, utiliza-se a técnica de automontagem, que consiste na imobilização de biomoléculas via adsorção física (a partir de uma solução tampão em condições otimizadas de pH e força iônica), em temperatura ambiente. Esse método tem-se mostrado excelente para imobilizar enzimas e preservar sua atividade por um período de tempo considerável [68]. A **Figura 8** ilustra o procedimento experimental para adsorção no processo de automontagem [69]. Tipicamente, esse processo é caracterizado pela adsorção sequencial de materiais com cargas opostas a partir de uma solução apropriada. Por exemplo, um substrato sólido inicialmente com carga negativa (que pode ser uma lâmina de vidro, ou vidro recoberto com óxido de índio-estanho, ITO) é imerso em uma solução contendo um polycation (por exemplo, um polímero catiônico) resultando em uma atração eletrostática entre o substrato e as moléculas da solução. Após a adsorção da primeira camada, o substrato passa por uma solução de lavagem e secagem (geralmente com nitrogênio que contribui para maior homogeneidade do filme). Para a adsorção da segunda camada, o substrato é imerso em uma solução polianiônica (tal como uma solução contendo enzimas) e novamente lavada e seca, formando então uma bicamada. Este procedimento pode ser repetido de acordo com o número desejado de bicamadas [69].

Figura 8: Representação esquemática do procedimento de imobilização por meio de interações físicas utilizando arquiteturas de multicamadas.

O dendrímero PAMAM

Os dendrímeros são uma classe especial de moléculas orgânicas que podem sofrer uma série de modificações químicas em sua superfície, mantendo sua estrutura interna com cavidades. As moléculas de dendrímeros possuem 3 componentes básicos em sua arquitetura: um núcleo central (tal como etilenodiamina), do qual o dendrímero inicia sua estruturação; camadas interiores, chamadas de “geradoras”; e uma extremidade, que serve de ancoramento para diversos grupos funcionais [70, 71]. O processo de retenção de moléculas pelos dendrímeros depende basicamente, da natureza da molécula “hospedeira”, da composição interna e periférica do dendrímero, além do tamanho das cavidades.

O dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) representa uma classe de polímeros ramificados e monodispersos e, diferentemente dos polímeros clássicos, exibe elevada uniformidade, estreita distribuição de peso molecular e superfície terminal altamente funcionalizada [70]. A nomenclatura utilizada para o dendrímero PAMAM está, basicamente, 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. De fato, o dendrímero PAMAM geração 1 possui uma massa molecular de 1043 g mol^{-1} com 6 grupos terminais; enquanto o dendrímero PAMAM geração 8 possui uma massa molecular de $174779 \text{ g mol}^{-1}$ com 768 grupos terminais [72]. Os principais grupos funcionais presentes na estrutura periférica do dendrímero PAMAM são grupamento amina e hidroxilas.

Essa macromolécula tem atraído o interesse de pesquisadores em diversos campos científicos e 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, o promovendo, assim, como um atrativo material na

fabricação de biosensores. A **Figura 9** apresenta um esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM geração 4, utilizado neste trabalho. Ambos dendrímeros PAMAM geração 4-NH₂ e geração 4-OH têm aproximadamente 4.5 nm de diâmetro com 62 grupos funcionais internos e 64 periféricos.

Figura 9: Esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM geração 4.

Perinotto *et al.* mostraram que a enzima ADH pode ser imobilizada em conjunto com o dendrímero PAMAM sobre eletrodos de Au utilizando o processo de automontagem. O processo de imobilização foi acompanhado em tempo real usando a 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 [73]. 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. 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 [68].

1.2.2.5. Combustíveis

No início de seu desenvolvimento, o combustível geralmente utilizado em estudos de biocélula enzimática era a glicose, bastante motivado pelo vislumbre de utilização *in vivo* deste dispositivo como baterias para aparelhos marca-passo [11]. Após várias décadas de desenvolvimento, a literatura mostra que os estudos de biocélulas a combustível enzimáticas geralmente buscam a utilização de combustíveis renováveis, sendo que as enzimas utilizadas na produção de bioanodos promovem a catálise desde combustíveis simples (tais como o hidrogênio e o metano) até substâncias mais complexas (tais como piruvato e lactato, além de açúcares e álcoois, como a glicose, o metanol e o etanol) [12].

Visto como sinônimo de combustível renovável e com grande potencial para substituir os combustíveis não renováveis extraídos do petróleo, o etanol ocupa lugar de destaque no cenário energético brasileiro e também começou a ser desejado por vários outros países. O Brasil e os Estados Unidos respondem por 70% do mercado mundial de etanol, porém o Brasil possui vantagem no custo de produção deste combustível [74]. De acordo com dados da União da Agroindústria Canavieira de São Paulo (Unica), os produtores de cana investiram cerca de US\$ 40 milhões anuais na produtividade das lavouras, nas últimas duas décadas, a qual cresce a uma média de 4% ao ano. Em relação à utilização deste combustível, o maior interesse ainda está em relação ao seu uso como combustível em automóveis, no entanto, seu uso como fonte energética em outras áreas tem despertado bastante interesse nos últimos anos. Atualmente, pesquisadores têm estudado o etanol em células a combustível, utilizando principalmente eletrodos a base de platina para catalisar sua oxidação. Na literatura, são encontrados também, trabalhos que mostram boa eficiência de oxidação do etanol por micro-organismos (*Pseudomonas aeruginosa* [75], *acetobacter* [76], *gluconobacter* [77]), e enzimas (ADH [42] e PQQ-ADH [58]).

1.2.2.6. Enzimas desidrogenases

Uma ampla gama de enzimas redox tem sido utilizada na construção de eletrodos enzimáticos, e a escolha das mesmas é geralmente feita de acordo com o tipo de reação a ser catalisada, ou seja, o combustível de interesse. Dentre elas, destacam-se a ADH, aldeído desidrogenase (AldDH), GOx, glutaminase, peroxidase, catalase, xantina oxidase, colina oxidase, uréase, bilirrubina oxidase, lactato oxidase, entre outras [5].

Todas as enzimas que catalisam reações de oxirredução pertencem à classe das enzimas oxirredutases. A classificação utilizada dentro dessa classe é realizada de acordo com o comportamento do substrato em relação à enzima, ou seja, se o substrato em questão é um doador de prótons ou elétrons. Nesse contexto, as enzimas nomeadas desidrogenases são aquelas receptoras de prótons, enquanto que a nomenclatura oxidase é utilizada somente quando o oxigênio é o aceptor final de elétrons da reação [78]. Dentre as enzimas desidrogenases, a grande maioria delas possui como centro redox as espécies NADH/NAD⁺ ou NADPH/NADP⁺, que podem estar fracamente ligados ou fortemente ligados à estrutura proteica da enzima. Quando fracamente ligados, estes grupos são responsáveis por atuar como carregadores de elétrons (uma de suas funções naturais no processo de transferência eletrônica celular), processo aproveitado em sistemas de biocélula a combustível [8].

- A enzima ADH

A enzima ADH obtida a partir de levedura (*yeast alcohol dehydrogenase*, em inglês) foi uma das primeiras enzimas a ser isolada e purificada. A levedura *Saccharomyces Cerevisiae* fornece três isoenzimas de ADH contendo o elemento zinco em sua estrutura: YADH-1, YADH-2, YADH-3, sendo a enzima YADH-1 responsável pela maior parte da atividade das enzimas desidrogenases em levedura [79]. Geralmente abreviada como YADH ou apenas ADH, esta enzima apresenta classificação enzimática (E.C., em inglês) 1.1.1.1. O significado desta nomenclatura segue a seguinte padronização: o primeiro algarismo representa sua classe (oxirredutase); o segundo algarismo representa sua subclasse (desidrogenase); o terceiro algarismo representa outra subclasse (NAD^+ dependente) e; o quarto algarismo indica o número serial da enzima dentro da última subclasse.

A estrutura primária da enzima ADH é um tetrâmero compostos por 4 subunidades idênticas de peso molecular 36 kDa cada. Cada subunidade da enzima é dividida em dois domínios, o sítio catalítico e o sítio de ligação da coenzima (NAD^+), além de estar firmemente ligada a um átomo de zinco, que é essencial para a catálise. Os domínios são separados por uma fenda que contém uma bolsa profunda que acomoda o substrato, mais a parte correspondente à nicotinamida da coenzima. Um dos domínios se liga à coenzima e o outro faz a ligação com o átomo de zinco, assim como a maior parte dos grupos que controla a especificidade do substrato. Para que a catálise ocorra, o sítio ativo da enzima deve se ligar então a uma molécula de substrato e uma molécula de coenzima de modo que possa ocorrer então a transferência de um hidreto entre eles [80]. Na **Figura 10** é apresentada uma representação da estrutura da enzima ADH com respectivas subunidades e sítios de ligação.

Figura 10: Figura representativa de um tetrâmero da enzima ADH com respectivo sítio ativo, baseado na estrutura obtida por cristalografia de raios x [81].

O sítio de ligação da adenosina fica bastante acessível à solução, enquanto o sítio da nicotinamida fica no centro da molécula em uma cavidade profunda da proteína. O sítio de ligação do substrato, próximo ao átomo de zinco é bastante estreito e fica inacessível à solução. A importância do átomo de zinco na oxidação do álcool se deve ao fato dele estabilizar o íon alcoolato para a etapa de transferência de hidreto. A estrutura da enzima ADH sugere fortemente que a integridade do sistema de liberação de próton é indispensável para a atividade da enzima [80].

Mecanismo cinético da enzima ADH

A enzima ADH obtida a partir de levedura é responsável pela catálise da primeira etapa de oxidação do etanol, até acetaldeído:

A especificidade da enzima ADH é restrita a álcoois primários de cadeia alifática não ramificada, sendo o etanol, de longe, o melhor substrato para esta enzima. Existem três principais fatores que governam a efetividade da ligação enzima-substrato: dimensão molecular, caráter nucleofílico do álcool e a orientação do mesmo [82]. Além disso, a enzima ADH possui uma fraca atividade para a catálise da reação de oxidação de acetaldeído a ácido acético ($K_{\text{cat}} = 2,3 \text{ s}^{-1}$ em pH 8,8 a 22 °C) [83].

O mecanismo cinético do estado-estacionário da enzima ADH foi conduzido por diversos autores, e eles apontam conclusivamente que a enzima ADH segue um mecanismo randômico do estado-estacionário, ilustrado na **Figura 11** [81, 84-86]. Este mecanismo sugere que a espécie NAD^+ se liga à enzima (EA) antes do etanol (EB) para formação de um complexo ternário (EAB). Após uma reação intra-molecular, forma-se então o complexo EPQ. Os resultados indicam também que a etapa determinante da reação é a dissociação da espécie NADH do complexo EQ. Do mesmo modo, a espécie NAD^+ se dissocia muito mais rápido do complexo EA do que a espécie NADH se dissocia do complexo EQ.

Figura 11: Representação esquemática do mecanismo de ação da enzima ADH na catálise de oxidação do etanol. E $\equiv$ ADH, A $\equiv$ NAD⁺, B $\equiv$ etanol, P $\equiv$ acetaldeído, Q $\equiv$ NADH [79].

Ressalta-se que a regeneração do complexo enzima-NADH é acompanhada por uma competição direta entre NAD⁺ e NADH pelo sítio ativo da enzima. Além disso, acrescenta-se que uma vez que o mecanismo indica uma sequência do tipo,

se a espécie NADH é continuamente removida da solução, têm-se a velocidade de reação de ordem zero, desde que a espécie NAD⁺ esteja em excesso [87].

- A enzima AldDH

A enzima AldDH faz parte de um conjunto de três isoenzimas nomeadas como AldDH A, B e C. Com certo controle na obtenção das enzimas, é possível obter em maior quantidade uma das enzimas, nomeada como AldDH A. Uma das principais fontes da enzima AldDH é também a levedura de fermento de pão (*yeast* AldDH), esta enzima possui um peso molecular de aproximadamente 200 kDa, com E.C. 1.2.1.5. A enzima AldDH é responsável pela catálise da reação de oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos; apresentando atividade para uma grande diversidade de aldeídos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos que possuem diferentes taxas de conversão e valores de K_m de acordo com cada estrutura [88].

Além de ser uma enzima do tipo NAD^+ dependente, a enzima AldDH necessita também de elevada concentração de íons potássio em solução para manter sua atividade e apresenta baixa estabilidade na ausência de íons K^+ . Acrescenta-se ainda, que a enzima possui elevada atividade enzimática na faixa de pH de 6,5 a 9,3 [89]. Outra característica peculiar da enzima AldDH é sua inibição em elevadas concentrações de substrato, ou seja, maiores quantidades de aldeído em solução podem diminuir o efeito catalítico da enzima [90].

Após muitos anos sendo motivo de discussão, chegou-se ao consenso de que a enzima AldDH possui uma estrutura “ativa” composta por 2 subunidades idênticas [91]. Cada subunidade contém três domínios, sendo um sítio de ligação para a coenzima, NAD^+ , um sítio catalítico (onde ocorre a transferência de hidreto do aldeído para o NAD^+), além de uma ponte (“*arm-like*” *bridge*, em inglês) que ajuda a estabilizar a forma de dímero da AldDH. A **Figura 12** mostra uma representação da enzima AldDH com respectivos sítios de ligação.

Figura 12: Figura representativa do dímero da enzima AldDH com respectivos sítios de ligação.

A transferência de hidreto entre aldeído e NAD^+ ocorre via formação de um intermediário tetraédrico, e a importância da presença de um grupo $-\text{SH}$ na estrutura enzimática da AldDH reside no fato deste grupo estar envolvido na ligação entre a coenzima (NAD^+) com o sítio ativo [91].

Mecanismo cinético da enzima AldDH

O mecanismo de ação da enzima AldDH foi durante muitos anos motivo de discussão e divergência, alguns trabalhos apontavam a não existência de uma ligação específica entre AldDH e NAD^+ ; posteriormente, um mecanismo sequencial de dois substratos/dois produtos foi proposto para a enzima AldDH, envolvendo a presença de complexos binários (enzima- NAD^+) e ternários (enzima- NAD^+ -aldeído) [92]. A **Figura 13** apresenta o mecanismo proposto para catálise oxidação de aldeído a acetato catalisado pela enzima AldDH. Inicialmente têm-se a ligação do cofator à enzima, seguido da ligação do aldeído pela formação do complexo hemitioacetal, resultando então na formação do primeiro complexo ternário. Em seguida ocorre a transferência de hidreto e posterior liberação do ácido carboxílico.

Figura 13: Representação esquemática do mecanismo de ação da enzima AldDH na catálise de oxidação do etanol. $E \equiv \text{AldDH}$, $A \equiv \text{NAD}^+$, $B \equiv \text{acetaldeído}$, $P \equiv \text{ácido acético}$, $Q \equiv \text{NADH}$.

1.2.2.7. Enzimas PQQ-dependentes

Como já mencionado, em estudos de biocélula a combustível é de grande interesse científico a utilização de enzimas não-dependentes de espécies como o NAD^+ e FAD^+ ; isto porque, tais enzimas simplificam o processo, tornando-o, assim, energeticamente favorável. Nesse sentido, a utilização de enzimas desidrogenase não dependentes dessas espécies, visando à construção de bioeletrodos com TED sem requerimento de nenhuma espécie mediadora adicional para transferência de elétrons, tem grande vislumbre pelos pesquisadores da área [57]. As enzimas PQQ-dependentes são enzimas que contém seu cofator (PQQ) ligado covalentemente à sua estrutura proteica, juntamente com múltiplos complexos do grupamento heme-c (grupamento proteico composto por um átomo de ferro circundado por um anel orgânico porfirínico ligados a resíduos de cisteína), ilustrados na **Figura 14**.

Figura 14: Estruturas moleculares do grupamento heme-c (à esquerda) e do cofator PQQ (à direita).

- PQQ-Álcool desidrogenase (PQQ-ADH) e PQQ-Aldeído desidrogenase (PQQ-AldDH)

A enzima PQQ-ADH (E.C. 1.1.99.8.) catalisa uma larga gama de álcoois primários de cadeia não ramificada, tendo o etanol como principal substrato. Essa enzima possui 3 subunidades, a maior delas com 80 kDa contendo um grupo PQQ e um grupo heme-c; a segunda com 50 kDa contendo 3 grupamentos heme-c; e uma terceira subunidade de 15 kDa com funções estruturais [93]. Estas enzimas apresentam a capacidade de realizar transferência eletrônica direta com determinadas superfícies eletródicas, sendo que a velocidade desse processo irá depender tanto da estrutura do eletrodo quanto da enzima estudada [94]. A literatura sugere que a reação de catálise do substrato ocorre no sítio ativo contendo o grupo PQQ, e os elétrons gerados nesta reação são, então, transferidos através da estrutura proteica da enzima até o sítio contendo o grupamento heme-c e posteriormente à superfície do eletrodo, como ilustrado na **Figura 15**.

Figura 15: Ilustração do mecanismo de transferência eletrônica em enzimas PQQ-dependentes, no caso a enzima PQQ-ADH que contém 3 subunidades [95].

A enzima PQQ-AldDH (E.C. 1.2.99.3.) obtida a partir da bactéria *Gluconobacter* possui duas subunidades, sendo a maior delas de 86 kDa e a menor delas com 55 kDa, com

elevada especificidade na catálise do acetaldeído a acetato, apresentando mecanismo de oxidação similar à PQQ-ADH [96].

Uma vez que estas enzimas não estão disponíveis comercialmente, sua extração e purificação necessitam ser realizadas em laboratório. As principais fontes para extração das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH são as bactérias *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, e *Commamonas*. A enzima PQQ-ADH extraída da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 está localizada no lado periplasmático da membrana do citoplasma, atuando diretamente na cadeia respiratória, sendo que estas bactérias possuem crescimento controlado em elevadas concentrações de açúcar e pH ácido [53, 58]. Além da enzima PQQ-ADH, PQQ-AldDH, glicose, frutose, e sorbitol desidrogenases são algumas das outras enzimas desidrogenases ligadas à membrana dessa bactéria [97].

1.2.2.8. Extração e purificação de enzimas

Fontes de obtenção de enzimas

As enzimas, assim como outros biocatalisadores (organelas, proteínas, etc.) são derivadas de fontes naturais (tecidos de animais e plantas, além de micro-organismos). Estas fontes naturais são renováveis e tem um relativo menor custo em relação às fontes de catalisadores metálicos. As fontes naturais de biocatalisadores são capazes de produzir apenas baixas quantidades de enzimas, uma vez que seus sistemas não são otimizados para superprodução de enzimas. Muitas vezes, a estratégia utilizada para se obter maiores quantidades de enzimas em quantidades satisfatórias é a clonagem e expressão. Normalmente, o gene da enzima desejada pode ser transferido e super-expressado em micro-organismos recombinantes que irão desempenhar a função desejada [98].

Nos casos em que as enzimas são extracelulares, o isolamento e a purificação das mesmas podem ser feitos diretamente a partir dos meios de crescimento sem necessidade de procedimentos que envolvem ruptura de membranas celulares. Já no caso das enzimas que estão ligadas diretamente a membranas celulares, se faz necessário uma etapa de rompimento da membrana celular e subsequente preparo da amostra antes da etapa de purificação.

O objetivo do procedimento de purificação deve ser o isolamento de uma determinada enzima com o máximo possível de rendimento em relação à atividade enzimática inicial da enzima no extrato, além de se obter boa pureza em relação a proteínas que não são de interesse. Nesse sentido, os protocolos geralmente utilizados para purificação de enzimas envolvem procedimentos cromatográficos, que devem compreender o menor número possível de etapas, a fim de se obter maior rendimento e maior pureza das enzimas de interesse. As principais técnicas cromatográficas utilizadas para purificação de enzimas são a cromatografia de troca iônica, exclusão molecular, hidrofobicidade, e bioafinidade [98]. Das quais serão destacadas a cromatografia de troca iônica e a de exclusão molecular.

Cromatografia de troca iônica

Em teoria, praticamente todas as moléculas que possuem grupos ionizáveis expostos podem ser purificadas pela técnica de cromatografia de troca iônica. A fase estacionária neste tipo de cromatografia contém excesso de grupos ionizáveis, de maneira que muitas moléculas podem se ligar e desprender diversas vezes à medida que as mesmas passam através da coluna. Nesse sentido, as propriedades físicas e químicas da matriz são críticas para a eficiência do processo de separação das espécies de interesse contidas em uma determinada amostra; essa matriz deve ser robusta para não sofrer alterações durante o processo, apresentando ainda boa uniformidade para que a separação ocorra consistentemente. Além disso, essa matriz deve também apresentar elevada área superficial que seja acessível tanto para a fase móvel quanto para as moléculas da amostra de interesse. Durante o procedimento, o processo de coleta das amostras em pequenas frações do efluente da coluna permite uma melhor separação das diferentes moléculas contidas na amostra inicial [99].

A cromatografia de troca iônica com resinas contendo grupos facilmente trocáveis tais como dietilaminoetil (DEAE) - resina trocadora de ânions, ou carboximetil (CM) - resina trocadora de cátions, são bastante úteis para separação de moléculas que diferem levemente quanto à carga. A **Figura 16** apresenta a estrutura de ambas as resinas geralmente utilizadas neste tipo de cromatografia, DEAE e CM.

Figura 16: Representação da estrutura molecular das resinas DEAE (A) e CM (B).

O equilíbrio de distribuição das moléculas entre o solvente e a fase estacionária é afetado pela presença de grupos carregados na superfície (que pode ser controlado pelo pH) e pela presença de contra íons alternativos (tais como Na^+ e H^+ frequentemente utilizados em cromatografia trocadoras de cátions, e Cl^- e OH^- frequentemente utilizados cromatografia trocadoras de ânions). Em determinados valores de pH e concentração de contra íons, as moléculas irão se ligar à coluna de acordo com suas características e vão eluir da fase estacionária de acordo com a força de sua carga.

Na prática, soluções proteicas são normalmente fracionadas permitindo-se a adsorção das proteínas na fase estacionária em baixas concentrações de contra íons, e são depois eluídas conforme a concentração de contra íons na solução é aumentada. Esse comportamento de eluição pode ser compreendido uma vez que com o aumento da concentração de contra íons, tem-se a competição destas espécies com as proteínas por íons de cargas opostas presentes na fase estacionária [99]. Este tipo de procedimento cromatográfico, no qual a concentração do contra íon é aumentada gradativamente durante o processo de eluição de proteínas é comumente conhecido como eluição em gradiente.

Este tipo de cromatografia tem se mostrado excelente para estágios de purificação iniciais, uma vez que a amostra pode ser aplicada em grandes volumes, e as moléculas de interesse podem ser recuperadas em volumes relativamente pequenos. Durante a eluição em gradiente, as várias moléculas são focalizadas ao passo em que fluem pela coluna. As moléculas próximas ao topo da coluna são liberadas quando o gradiente de concentração chega a um determinado ponto; já as moléculas ligadas na parte de baixo da coluna não são eluídas até que elevadas concentrações de sais junto com moléculas já eluídas da parte de cima cheguem até elas.

Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular ou de filtração em gel é uma forma de cromatografia de coluna, na qual as moléculas são separadas com base em suas massas moleculares ou raios de Stokes (raio efetivo de uma molécula que flui rapidamente em uma solução, por exemplo, uma molécula longa tem um maior raio de Stokes comparado a uma molécula compacta que possui a mesma massa molecular) [99]. A fase estacionária nesse tipo de técnica consiste de uma coluna contendo poros de tamanho controlado; e ambas as fases estacionária e móvel são escolhidas de modo a prevenir o máximo possível de interações das proteínas com partes da coluna que não sejam os poros de tamanhos definidos (ou seja, prevenir interações hidrofóbicas ou eletrostáticas das proteínas com a coluna); comportamento este, oposto ao observado em cromatografia de troca iônica, na qual a base da técnica se baseia nas interações das proteínas com a fase estacionária.

O processo de separação de diferentes moléculas numa mesma amostra ocorre de modo que as moléculas maiores eluem primeiro (ou seja, não conseguem ficar retidas nos poros da coluna), enquanto que as moléculas menores (que ficam parcialmente ou completamente aderidas aos poros da coluna) são eluídas por último. Nesse sentido, é encontrada uma grande variedade de materiais de fases estacionárias, capaz de realizar a separação de biomoléculas em várias faixas de tamanho. Geralmente, estas fases consistem de oligossacarídeos com ligações cruzadas, tais como agaroses, dextranas, além de acrilamidas, que são as mais comumente utilizadas.

A cromatografia de exclusão molecular é geralmente utilizada em estágios finais de purificação, nos quais já se empregou algum tipo de procedimento prévio, explorada para separação de moléculas na faixa de aproximadamente 10^2 a 10^6 Da. A coluna Sephadex G-100, por exemplo, apresenta uma faixa de peso molecular que varia de $8 \cdot 10^3$ - $8 \cdot 10^4$ Da, com uma faixa de exclusão de $1 \cdot 10^5$ Da, faixa esta razoável para enzimas desidrogenases.

1.2.2.9. Técnicas de caracterização de bioeletrodos

- Técnicas eletroquímicas

A eletroquímica foca na inter-relação entre efeitos químicos e elétricos de um processo. Este campo inclui vários importantes fenômenos (tais como a eletroforese e a corrosão), dispositivos (tais como sensores eletroanalíticos, baterias e células a combustível), além de processos de grande interesse tecnológico (tais como a produção em larga escala de alumínio e cloro), entre outros [100]. Dentre as diversas técnicas eletroquímicas utilizadas em estudos de biocélula a combustível, a voltametria cíclica e as curvas de polarização são as técnicas comumente empregada tanto em estudos de semi-célula quanto de biocélulas completas.

A técnica de voltametria cíclica fornece um método simples e rápido para caracterização inicial da reversibilidade de processos redox de um sistema. Geralmente, por meio da análise dos perfis voltamétricos de um determinado sistema, pode-se obter e caracterizar os processos anódicos e catódicos além da quantidade de elétrons sendo transferidos em cada processo [100]. No caso das biocélulas a combustível enzimáticas com TEM, na qual as enzimas não estão diretamente em contato com a superfície de um eletrodo, a caracterização eletroquímica é geralmente baseada nas interações e comportamentos obtidos com a espécie mediadora, tais como o potencial de redução desta espécie. Nos casos em que se observa conexão elétrica direta entre enzima/eletrodo, tem-se a caracterização dos perfis redox associados diretamente ao(s) processo(s) catalítico(s) de uma determinada biomolécula.

As curvas de polarização (gráfico que mostra o perfil de potencial em função da corrente produzida por um determinado sistema) simplificam o resultado mais expressivo que se espera de uma célula a combustível; ou seja, o perfil de potência (no caso, obtida pela simples multiplicação do potencial pela corrente de um sistema) do sistema; resultado este,

diretamente associado ao desempenho de catalisadores tanto em células a combustível convencionais quanto em biocélulas enzimáticas.

Outra técnica eletroquímica muito utilizada pelos pesquisadores em estudos de biocélula são as medidas de impedância, utilizada para melhor compreender os processos que ocorrem em uma biocélula enzimática. Por meio desta técnica, é possível compreender todas as resistências envolvidas na célula, e também as resistências envolvidas nos processos de transferência eletrônica tanto no anodo quanto no catodo; esse comportamento terá importância crítica para futura construção de protótipos de biocélulas, uma vez que limitações quanto à potência do sistema serão bastante afetadas por todas as resistências internas do sistema em operação [101].

- Espectrofotometria, Fluorescência e Microscopia eletrônica

A utilização da espectrofotometria em biocélulas a combustível enzimática se baseia principalmente na detecção dos produtos formados durante a catálise enzimática, permitindo a quantificação do número de enzimas imobilizadas na superfície de um eletrodo que estão ativas após o processo de imobilização. A medida pode ser realizada pela simples imersão do substrato sólido contendo as enzimas imobilizadas no fundo de uma cubeta espectrofotométrica, monitorando-se então as mudanças de absorbância provocadas pelo consumo de substrato e/ou cofatores presentes em solução [102].

Medidas de fluorescência vêm sendo empregadas em estudos de biocélula enzimática com o intuito de avaliar as interações entre enzima e a matriz de imobilização além de proporcionar dados sobre como o processo de ancoramento irá influenciar o preenchimento, distribuição, estabilidade e tempo de vida das enzimas imobilizadas. A interação entre enzimas desidrogenases com quitosana caracterizadas por técnicas de fluorescência é um dos exemplos de utilização desta técnica [5].

As principais técnicas de caracterização de superfície de bioeletrodos utilizadas em estudos de biocélula são as metodologias físico-químicas utilizando isothermas de Langmuir e BET (descritas na literatura para caracterização quanto ao perfil de preenchimento das enzimas nos bioeletrodos baseados em estruturas de poros); análises de difração de raios-X (também demonstrando o perfil de formação de estruturas porosas); além de análises de imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV, geralmente realizada com o intuito de avaliar a formação e espessura de filmes em superfícies condutoras) [5].

1.2.2.10. Principais características de desempenho em biocélulas a combustível

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

$$E_{cel} = E_c - E_a - \sum IR_e \quad (13)$$

Na qual E_c e E_a são respectivamente os potenciais do catodo e do anodo, enquanto I está associada à corrente obtida pelo sistema e o parâmetro $\sum IR_e$ associado a todas as resistências encontradas no sistema em questão. Um melhor desempenho em uma biocélula a combustível será obtido então, com maximização da chamada janela de potencial ($E_c - E_a$), conhecida como potencial de circuito aberto (PCA), e minimização de todas as resistências envolvidas no dispositivo. Nesse sentido, as pesquisas em biocélulas enzimáticas visam tanto à preparação/obtenção de bioeletrodos que possibilitem a ocorrência das reações catalíticas com maior facilidade; e assim aumentar o PCA de uma biocélula, como a busca de desenhos e protótipos de célula que diminuam as resistências apresentadas por cada sistema, aumentando assim a facilidade com que a corrente elétrica possa fluir através do sistema.

Para qualquer tipo de célula a combustível, o parâmetro fundamental de avaliação de desempenho é a potência (P) gerada pelo sistema, parâmetro este determinado pela seguinte relação:

$$P_{cel} = E_{cel} \int Idt \quad (14)$$

Caso a corrente seja constante, têm-se:

$$P_{cel} = E_{cel} \cdot I \quad (15)$$

Outra forma de apresentação da potência fornecida por um biocélula geralmente utilizada pela literatura é a relação de densidade de potência:

$$\text{Densidade de potência} = \frac{P_{cel}}{A} \quad (16)$$

na qual a corrente (I) produzida pelo sistema reflete a taxa de produção de elétrons gerados na catálise enzimática, além dos processos de transporte. O objetivo de utilização desta notação é a padronização da potência fornecida por um sistema em função da área do bioeletrodo empregado.

1.2.2.11. Breve histórico do desenvolvimento das biocélulas a combustível

A utilização de células a combustível empregando enzimas como catalisadores surgiu do desejo de se obter reações específicas e bem definidas ocorrendo na superfície de um eletrodo [8]. Motivada pela possibilidade de aplicação *in vivo* como bateria para marca-passo, durante muito tempo, a glicose foi utilizada como combustível padrão em estudos de biocélula, com a primeira biocélula enzimática glicose/O₂ sendo demonstrada em 1964 por Yahiro *et al.*. Neste primeiro estudo, a enzima GOx foi utilizada como biocatalisador, utilizando como cátodo a platina em contato direto com o ar. O PCA obtido ficou na faixa de 625 a 750 mV; porém, a densidade de corrente obtida foi bastante baixa, apenas 30 nA cm⁻² em 330 mV [9].

O desenvolvimento das biocélulas ressurgiu nos anos 80, com alguns trabalhos focando na oxidação do metanol utilizando a enzima ADH e etosulfato de fenazina como molécula mediadora. Um PCA de 300 mV foi obtido, com uma densidade de corrente máxima de 30 µA cm⁻² [103]. Nos anos 90, Palmore *et al.* apresentaram um estudo bastante avançado envolvendo a utilização de três enzimas em cascata (ADH, formaldeído desidrogenase, e formato desidrogenase) para oxidação completa do metanol [104]. Em 1998, Willner e Katz demonstraram uma biocélula sem membrana composta de anodo e catodo enzimáticos. Uma monocamada de PQQ e microperoxidase-11 em eletrodos de Au foram utilizados como bioanodo e biocatodos, respectivamente. O dispositivo apresentou uma densidade de potência de 8 µW cm⁻² e um PCA de 320 mV [14]. Em 1999, Palmore e Kim descreveram a preparação de biocatodos com a enzima laccase, com TEM utilizando o ABTS [63].

O processo de aceleração das reações de transferência eletrônica utilizando as enzimas em contato direto com a superfície de um eletrodo foi inicialmente observado no final da década de 70 com o citocromo c9 em eletrodos de óxido de índio [105]. No final da

década de 80, a TED despertou um interesse maior dos pesquisadores, onde se observou vários trabalhos com diferentes enzimas, inclusive com a enzima GOx, atuando sem moléculas mediadoras [54].

Em 2001, a literatura começa a apresentar trabalhos com microdispositivos para dispositivos médicos implantáveis. Chen *et al.* descreveram uma biocélula glicose/O₂ composta de bioeletrodos com 7 µm de diâmetro, que forneceu uma potência de 600 nW. O lado anódico foi preparado pela co-imobilização da enzima GOx com polímero de ósmio, e o lado catódico preparado pela imobilização da enzima laccase [44].

Outro foco dos trabalhos em biocélulas a combustível é o desenvolvimento da modificação/melhoramento genético de certas enzimas, com o objetivo de conseguir melhores taxa de oxidação. Em 2002, Halliwell *et al.* descreveram a utilização da enzima mutante lactato desidrogenase como material anódico imobilizadas com poli(anilina)poli(vinilsulfonato). O chamado sistema PANi-enzima apresentou resultados satisfatórios com potencial aplicação em biosensores e biocélulas [106]. Já em 2003, ocorreu a primeira descrição de uma biocélula com sistema de interruptor, empregando GOx e citocromo oxidase no anodo e no catodo, respectivamente. O sistema elaborado por Katz e Willner utilizou uma matriz híbrida de Cu⁺²/Cu⁰ com ácido-poliacrílico, que permitiu um controle de ativação e desativação da biocélula [17].

Percebe-se que, até aqui, o foco da discussão fica bastante centrado na utilização de açúcares e álcoois como combustíveis; entretanto, o hidrogênio é desde muito tempo, o combustível padrão em estudos de célula a combustível. Nesse sentido, alguns não menos importantes trabalhos da literatura mostram resultados para utilização de enzimas hidrogenases ao invés dos tradicionais catalisadores de Pt [107]. Trabalhos envolvendo a imobilização das enzimas laccase e bilirrubina oxidase sem mediador mostram bons

resultados na oxidação de hidrogênio; entretanto, a inativação de enzimas hidrogenases por traços de oxigênio tornam o processo difícil em várias situações [108].

Mais recentemente, alguns pesquisadores focam também na utilização de álcoois no desenvolvimento de biocélulas a combustível, tais como etanol/ O_2 . Embora muitos avanços tenham sido obtidos com esse sistema e grande potencial tenha sido observado, obstáculos para se obter um dispositivo eficiente e estável ainda são relatados [42, 109, 110]. Em 2008, Sokic-Lazic e Minteer descreveram a oxidação completa do etanol a gás carbônico, simulando o ciclo do ácido cítrico na superfície de um bioeletrodo. Para tal, enzimas desidrogenases foram imobilizadas em cascata em eletrodos de carbono, onde se observou aumento na densidade de potência de acordo com o número de enzimas imobilizadas [49]. O mesmo grupo apresentou outro trabalho de simulação de ciclo bioquímico, no qual enzimas desidrogenases foram imobilizadas com o objetivo de oxidação completa do piruvato [111].

Em 2009, a empresa de tecnologia em eletroeletrônico Sony[®] apresentou o primeiro protótipo de biobateria a partir de uma biocélula glicose/ O_2 com o objetivo de fornecer energia para dispositivos portáteis de baixa potência [22]. Nesta biocélula, foi utilizada a enzima GOx no lado anódico e a enzima bilirrubina oxidase no lado catódico com TEM utilizando uma MTP.

Confirmando, numericamente, o crescente interesse pelas biocélulas a combustível, vários trabalhos importante de revisão sobre o tema são encontrados na literatura, destacando-se Barton *et al.*, 2004, que fazem uma revisão completa desde métodos de imobilização, aplicações, diferenças entre biocélulas e biosensores, além de grande ênfase em processos de TEM [18]. Em 2006, Bullen *et al.* revisam os trabalhos publicados entre o período de 1994 a 2006, tendo como foco principal parâmetros como densidade de potência, PCA e condições das biocélulas desenvolvidas [8]. Em 2007, Minteer *et al.* apresentam um trabalho de revisão destacando os aspectos práticos de aplicação em biocélulas enzimáticas (tais como

estabilidade e tempo de vida), e tendências futuras no desenvolvimento deste dispositivo [12]. Cooney e Minteer revisaram, em 2008, os processos de transferência eletrônica em biocélulas enzimáticas, além dos aspectos associados à configuração dos eletrodos e técnicas de caracterização [5].

Em 2010, Ivanov *et al.* focaram sua discussão nas metodologias de preparação de bioeletrodos, além de modelagem, e aspectos que ainda limitam possível aplicação desta técnica [112]. Em 2011, Osman *et al.* apresentaram os recentes progressos obtidos no desenvolvimento de biocélulas enzimáticas, assim como novos materiais eletródicos, métodos de imobilização, nanoestruturação, e aspectos do ponto de vista da engenharia de construção destes dispositivos [23]., Ainda em 2011, Opallo *et al.* apresentaram os mais recentes aspectos no desenvolvimento de bioeletrodos nanoestruturados com foco na catálise da reação de redução de oxigênio [113]. No início de 2012 Yang *et al.* revisaram aspectos associados à etapa de imobilização da enzima em superfícies eletródicas [114]; e Falk *et al.* apresentaram uma mini revisão discutindo o processo de TED em biocélulas enzimáticas [57].

As biocélulas a combustível enzimáticas proporcionam meios de se obter energia limpa e renovável e têm apresentado uma crescente importância científica e tecnológica nos últimos anos com vários trabalhos recentes mostrando, cada vez mais, características promissoras deste dispositivo [23, 57, 112, 114]; todavia, mesmo com os diversos avanços obtidos com o contínuo desenvolvimento dessa tecnologia, vários desafios ainda precisam ser alcançados para se obter uma futura aplicação desse sistema. Algumas questões-chaves no desenvolvimento das biocélulas a combustível enzimáticas, tais como 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 são ainda importantes objetos de pesquisa.

Capítulo 2

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é a preparação e caracterização de bioanodos para biocélula a combustível etanol/O₂ utilizando enzimas desidrogenases, tanto com transferência eletrônica mediada como com transferência eletrônica direta.

Para o desenvolvimento deste trabalho, as seguintes etapas foram investigadas:

- Caracterização cinética das enzimas comerciais ADH e AldDH de forma comparativa em solução e imobilizada em plataformas de carbono utilizando o dendrímero PAMAM como matriz de imobilização das enzimas;
- Avaliar o desempenho de bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva com o dendrímero PAMAM em biocélula a combustível etanol/O₂, focando a preparação e caracterização dos bioeletrodos, além de medidas de densidade de potência e testes de estabilidade;
- Preparação de bioeletrodos em plataformas de carbono, por meio da imobilização de enzimas desidrogenases utilizando a técnica de automontagem com o dendrímero PAMAM;
- Avaliar o desempenho de bioeletrodos com transferência eletrônica direta contendo as enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH, utilizando duas metodologias de imobilização; o dendrímero PAMAM e a membrana Nafion[®] modificada em plataformas de carbono contendo nanotubos de carbono.

Capítulo 3

3. 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 transferência mediada ou direta) possuem particularidades e, por isso, as etapas experimentais em cada tipo de processo são apresentadas de maneira independentes.

Parte 1

3.1. Transferência eletrônica mediada

As enzimas comerciais utilizadas nesta etapa, ADH (E.C. 1.1.1.1. e atividade inicial de 331 U mg⁻¹) e AldDH (E.C. 1.2.1.5. e atividade inicial de 1,02 U mg⁻¹) ambas extraídas de *Saccharomyces Cerevisiae* e comercializadas na forma de pó liofilizado, foram obtidas da Sigma - Aldrich e utilizadas como recebidas. A coenzima NAD⁺ e o polieletrólito PAMAM-NH₂ geração 4 com núcleo de etilenodiamina solução 10 % em metanol também foram obtidos da Sigma - Aldrich. O PAMAM G4-NH₂ apresentam um diâmetro de aproximadamente 4,5 nm contendo 62 grupos aminas internos e 64 grupos periféricos. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹) purificada pelo 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.

3.1.1. Determinação da atividade enzimática pelo método contínuo

A atividade de hidrólise dos diferentes substratos catalisados pelas enzimas desidrogenases foi realizada a 25°C, acompanhando-se a redução de NAD^+ a NADH em 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{pH } 7,5} = 6220 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 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 fosfato pH 7,2 contendo o substrato e a coenzima em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ou do substrato contendo as enzimas imobilizadas, 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 as enzimas de interesse. Já no caso das enzimas imobilizadas em substratos de carbono, a reação foi iniciada pela imersão dos substratos sólidos na cubeta espectrofotométrica (**Figura 17**).

Figura 17: Ilustração da cubeta utilizada nos experimentos de cinética enzimática contendo o substrato de carbono com as enzimas imobilizadas.

Uma vez que esta reação ocorre com o consumo de NAD^+ (que tem a proporção 1:1 com os respectivos substratos), o monitoramento da atividade resulta no aumento da leitura de absorbância em 340 nm (representado na **Figura 18**). No caso dos estudos com a enzima em

solução, os valores de absorbância foram coletados por 3 min com intervalo de medida de 2 s e a velocidade 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 18: Espectro representativo de absorção UV das espécies NAD⁺ e NADH, após 2 minutos de cinética utilizando-se a enzima ADH.

A influência tanto do pH quanto da temperatura na cinética das enzimas desidrogenases foi determinada por meio de ensaios de 15 a 55 °C em vários pHs entre 4 e 10. Para tal, os seguintes tampões 0,02 mol L⁻¹ foram utilizados: tampão acetato (NaAc/HAc) para pH de 4 - 5; tampão fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) para pH 6 - 7; e tampão tris-hidroximetil amino metano-HCl (Tris⁺) para pH 8 - 10.

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. K_m e $v_{m\acute{a}x}$ do substrato e da coenzima foram calculados por meio do gráfico de Lineweaver-Burk [115], e os resultados apresentados correspondem às médias obtidas com respectivo desvio padrão.

3.1.2. Eletropolimerização dos eletrocatalisadores da espécie NADH

O processo de regeneração da coenzima NAD^+ em biocélulas a combustível que empregam enzimas desidrogenases dependentes desta espécie (tais como a biocélula etanol/ O_2 com as enzimas ADH e AldDH) é um processo de fundamental importância para a viabilidade energética do processo global; nesse sentido, alguns corantes orgânicos apresentam boa atividade catalítica para oxidação da espécie NADH e consequentemente conseguem diminuir o sobrepotencial desta reação eletródica, tornando o processo mais vantajoso [5]. Dentre os chamados “mediadores de NADH” ou “eletrocatalisadores de NADH” encontrados na literatura, neste trabalho foram testados os seguintes compostos: verde de metileno, azul de metileno, azul de toluidina, e azul básico; sendo que o objetivo foi a utilização desses compostos na forma de filme estável eletropolimerizado na superfície do eletrodo.

Previamente ao processo de eletropolimerização, os eletrodos de carbono vítreo foram polidos com alumina 0,3 μm e limpos eletroquimicamente por voltametria cíclica sob um 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} . 10 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. Em seguida, os eletrodos foram lavados em água deionizada, posteriormente secos com N_2 e, finalmente deixados por 24 horas em dessecador para secagem completa.

Os filmes de corantes catalisadores da espécie NADH 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 $4 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} do respectivo corante e 0,1 mol L^{-1} de nitrato de sódio. 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 $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio [42]. Para os corantes azul de metileno, azul de toluidina, e azul básico, os voltamogramas foram registrados entre -0,5 a 1,5 V vs. ECS.

Caracterização morfológica de superfície dos filmes preparados foi realizada por meio de imagens de MEV utilizando um microscópio eletrônico de varredura *Leica-Zeiss* modelo *LEO 440* acoplado a um analisador *Oxford 7060*.

3.1.3. Caracterização eletroquímica da espécie NAD^+

O desempenho dos diferentes electrocatalisadores da espécie NADH foi avaliado por meio de caracterização eletroquímica dos filmes eletropolimerizados em eletrodo de carbono vítreo, na presença da espécie NAD^+ . Os voltamogramas cíclicos foram registrados no intervalo de -0,6 a 0,6 V *vs.* ECS em solução tampão fosfato pH 7,2, 0,1 mol L⁻¹ de nitrato de sódio contendo 1 10⁻³ mol L⁻¹ de NAD^+ . A solução foi desaerada durante 20 minutos com N_2 antes de cada experimento realizado em uma célula de compartimento único (**Figura 19**).

Figura 19: Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de caracterização da espécie NAD^+ .

3.1.4. Preparação dos bioanodos pelo método de adsorção passiva

Na preparação dos bioanodos para testes de biocélula, foram utilizados como suporte dois materiais a base de carbono, o papel de carbono (*carbon fiber paper*, TGP-H-060, Fuel Cell Earth, Stoneham, MA.) e um tecido de carbono composto de uma camada difusora (HT1400W, ELAT® GDL - BASF), ambos com 1 cm². Uma vez finalizada a etapa de eletropolimerização dos eletrocatalisadores da espécie NADH (idêntica ao procedimento descrito no item 3.1.2.), os eletrodos foram lavados com água deionizada, secos em N₂ e deixados por 24 horas em dessecador antes da imobilização das enzimas.

Posteriormente, procedeu-se com a deposição por adsorção passiva de uma solução enzima/dendrímero. As soluções ADH/PAMAM foram preparadas na razão 1:2 em meio de 1,9 10⁻³ mol L⁻¹ de NAD⁺, mantendo o volume final em 600 µL em tampão fosfato 0,1 10⁻³ mol L⁻¹ (pH 7,2). Após homogeneização, 50 µL desta solução foram adicionados diretamente na superfície do suporte, seguido de secagem por 12 h. Na **Figura 20** é apresentada uma representação esquemática do bioanodo preparado.

Figura 20: Representação esquemática do bioanodo preparado pela metodologia de adsorção passiva.

A seguir, os bioanodos recém-preparados e secos foram imersos em solução tampão e mantidos por 12 h a 4 °C antes de cada ensaio.

3.1.5. Preparação dos bioanodos pelo método de automontagem

Tratamento do suporte de carbono

Devido à necessidade de um suporte rígido além de elevada hidrofilicidade requerida pelo processo de automontagem, para a preparação dos bioanodos por esta técnica, utilizou-se como suporte apenas o papel de carbono. Todos os suportes utilizados nesta preparação foram previamente tratados, com o objetivo de aumentar a hidrofilicidade da superfície do material a ser utilizado. Inicialmente, os suportes de carbono foram aquecidos a 450 °C durante 1 h para remoção de impurezas e da pequena camada de Teflon[®] presente na superfície deste material. A seguir, grupos carboxílicos foram introduzidos na superfície de carbono por meio de tratamento com ácido nítrico [116]. Esse procedimento envolve o aquecimento das amostras de carbono em refluxo com ácido nítrico concentrado (200 mL) a 80 °C durante 24 horas; a seguir, as amostras foram filtradas e lavadas exaustivamente com água deionizada, para remoção completa de resíduos de ácido e, secas a 110 °C por 2 horas.

Uma camada de difusão gasosa com baixo teor de Teflon[®] foi preparada em nosso laboratório com o intuito de melhorar os processos difusionais na superfície do eletrodo sem impedir o processo de automontagem. A preparação dessa camada foi realizada pela mistura de politetrafluoretileno (PTFE, 30-N, Dupont[®] *aqueous dispersion*), carbono *vulcan* (*Carbon Vulcan XC- 72*) e isopropanol. 100 mg de carbono vulcan foi adicionado a 5 mL de isopropanol contendo 10 % em massa de PTFE sob constante agitação até completa secagem; a seguir, mais 5 mL de isopropanol foram adicionados à pasta sob agitação por 3 horas. Esta pasta foi adicionada ao suporte de carbono tratado por pincelamento, seguido de secagem a 240 °C por 30 min e sinterização a 350 °C por 1h.

Quantificação das enzimas durante o processo de automontagem

A quantificação de proteínas adicionadas em cada bicamada durante o processo de preparação dos bioanodos via automontagem foi realizado de acordo com o método descrito por Bradford [117]. O procedimento utilizado foi a determinação da quantidade de enzima restante em solução após cada etapa de adsorção. O limite de detecção da metodologia empregada é de 1 ng de enzima. 100 mg do corante azul brilhante de Coomassie G-250 foi dissolvido em 50 mL de etanol; a seguir, 100 mL de ácido fosfórico foi adicionado à solução do corante, seguido de diluição para 1 L. Esta solução foi então filtrada duas vezes antes de seu uso. Para o ensaio, 1,5 mL da solução ácida do corante foi adicionada a 1 mL de uma solução diluída contendo as enzimas. Após 5 min de equilíbrio, foi medida a absorbância em 595 nm, utilizando uma solução idêntica, porém sem proteínas, como branco. Para quantificação das proteínas, uma curva de calibração utilizando a enzima ADH foi construída no intervalo de 1 - 50 μ g, e que apresentou uma linearidade de 0,998 (**Figura 21**).

Figura 21: Curva de calibração utilizada para quantificação das enzimas adsorvidas durante o processo de preparação dos bioanodos via automontagem.

Preparação dos bioanodos via automontagem

Antes do processo de imobilização das enzimas, um filme estável de eletrocatalisador da espécie NADH (descrito no item 3.1.2.) foi eletropolimerizado no suporte de carbono. A preparação dos bioanodos via automontagem procedeu de acordo com o esquema experimental ilustrado na **Figura 8**. A imobilização das enzimas e do dendrímero PAMAM em ambos os lados do suporte de carbono foi realizada pela imersão consecutiva do substrato na solução catiônica (PAMAM, 2 mg mL^{-1}) e aniônica (solução das enzimas 1 mg mL^{-1}) em meio de tampão Tris⁺, pH 8,6, por 5 e 15 minutos respectivamente. Os substratos foram lavados após cada etapa de deposição e secos com N₂. A seguir, os bioanodos recém-preparados e secos foram imersos em solução tampão e mantidos por 12 h a 4 °C antes de cada ensaio. Na **Figura 22** é apresentada uma representação esquemática do bioanodo preparado pela metodologia de automontagem.

Figura 22: Representação esquemática do bioanodo preparado pela metodologia de automontagem.

3.1.6. Teste de biocélula etanol/ O_2

As medidas de densidade de potência e corrente foram realizadas em uma cela eletroquímica de dois compartimentos separados por uma membrana Nafion[®] (**Figura 23**), similar à descrita por Moehlenbrock e Minteer [48]. Uma membrana de difusão gasosa (ELAT[®]) composta de 20 % Pt em C (E-TEK) prensada a quente foi utilizada como material catódico, sendo mantido em contato direto com o ar. As medidas foram realizadas em uma solução contendo $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ da coenzima NAD^+ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol, para um volume final de solução de 10 mL em meio de tampão fosfato. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) 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 potência. Todos os resultados apresentados são baseados em medidas de triplicata.

Figura 23: Esquema representativo da cela eletroquímica utilizada para as medidas de densidade de potência.

Parte 2

Esta etapa do trabalho foi realizada como atividades do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDDE) da CAPES em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof. Dr^a Shelley D. Minter nos departamentos de química, materiais e engenharia da Universidade de Utah nos Estados Unidos.

3.2. Transferência eletrônica direta

O polieletrólito PAMAM-NH₂ geração 4 com núcleo de etilenodiamina solução 10 % em metanol e a solução 5 % de Nafion[®] 117 foram obtidos da Sigma - Aldrich. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (em inglês, *multi walled carbon nanotubes*, MWCNTs) 1,23 % em massa funcionalizados com grupos COOH (diâmetro externo = 20 - 30 nm, diâmetro interno = 5 - 10 nm, comprimento = 10 - 30 µm) foram obtidos da *Cheaptubes.com*. *Gluconobacter* sp. 33 DSMZ 3504 foi obtido da Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células (em inglês, *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, DSMZ). Todos os outros reagentes utilizados foram obtidos da Sigma – Aldrich e utilizados sem purificação prévia.

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹) purificada pelo sistema *Milli-Q* da *Millipore Inc.* As medidas de pH foram realizadas com um eletrodo de pH acoplado a um pHmetro *Fisher Scientific Accumet AB15+ Basic pH meter*. Todas as soluções de enzimas e coenzima foram preparadas e utilizadas rapidamente.

3.2.1. Extração e purificação das enzimas PQQ-dependentes

- Crescimento das células de *Gluconobacter* sp. 33

Durante todo o procedimento de inoculação e crescimento das células, toda vidraria e acessórios utilizados foram devidamente esterilizados utilizando procedimento padrão de autoclavagem.

Inicialmente, as células comerciais de *Gluconobacter* sp. 33 (DSM 3504) foram cultivadas anaerobicamente em 150 mL de um meio de cultura basal de D-mannitol 10 g L^{-1} contendo extrato de levedura (*yeast extract*, Sigma - Aldrich) 5 g L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g L^{-1} e 2 mL de CaCl_2 10 mg L^{-1} , pH 5,5. A solução foi mantida sob agitação de 150 rpm a 30°C por 20 horas, na ausência de O_2 . Na **Figura 24** é apresentada uma foto da solução final após 20 horas de crescimento das células. Esta solução se mostrou estável por aproximadamente 2 meses quando mantida a 4°C .

Figura 24: Meio de cultura de D-mannitol contendo as células de *Gluconobacter* sp. 33 após 20 horas de crescimento anaeróbico.

Após a etapa de inoculação das células comerciais, seguiu-se com o procedimento de crescimento aeróbico das células de *Gluconobacter* sp. 33. Para tal, 9 mL da solução obtida após a inoculação das células foi adicionada a um frasco de fermentação de 5 L contendo 3 L de meio de cultura idêntico ao utilizado na etapa de inoculação das células. O frasco de

fermentação foi mantido por 24 horas a 30 °C em uma câmara de incubação com agitação de 150 rpm, além de borbulhamento constante de O₂ (**Figura 25**).

Figura 25: Meio de cultura de D-mannitol durante o crescimento aeróbico das células de *Gluconobacter* sp. 33.

Após a etapa de crescimento, uma pasta contendo as células foi coletada via centrifugação a 5000 g durante 1 hora, e então lavada com solução de NaCl 0,9 % (**Figura 26**). Este extrato de células foi mantido a -20 °C antes do uso.

Figura 26: Figura ilustrativa de um tubo do tipo “falcon” contendo o extrato celular.

- Lise das células

Devido ao fato das enzimas desidrogenases PQQ-dependentes de interesse estarem ligadas a membrana celular, se faz necessário uma etapa de rompimento da membrana para coleta das enzimas. Após o procedimento de crescimento e coleta das células, procedeu-se com a etapa de ruptura da membrana celular, e coleta das enzimas para posterior purificação das mesmas. Para o procedimento de lise, as células coletadas foram re-suspendidas com 50 mL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,2) em um béquer de 100 mL; a seguir, adicionou-se 2,7 mL de uma solução 10 % de deoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich), 20 mg de lisozima, e 10 mg de inibidor de protease. Essa solução foi incubada a 4°C durante 2 horas sob constante agitação. A seguir utilizou-se um homogeneizador *Powermax AHS 200* para auxiliar no processo de rompimento da membrana celular. Finalmente, essa pasta celular foi centrifugada por 1 hora a 12000 g. Após a separação dos resíduos celulares das enzimas de interesse, realizou-se a troca (diálise) do tampão por 12 h a 4°C , utilizando uma solução tampão Tris⁺ $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 contendo $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e 1 % de sacarose.

Após o processo de diálise do tampão, removeu-se um resíduo de precipitado sólido via centrifugação a 12000 g por 15 min, e a solução contendo a mistura de enzimas foi então purificada por duas etapas cromatográficas, ilustradas na **Figura 27**.

Figura 27: Esquema representativo do processo de purificação das enzimas PQQ-dependentes via cromatografia.

- Cromatografia de troca iônica

O ponto isoelétrico (pH no qual a enzima possui carga líquida zero) da grande maioria das enzimas se encontra na faixa de 5 a 9 [99]; no caso das enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH derivadas de *Gluconobacter* sp. 33, o ponto isoelétrico teórico dessas proteínas são respectivamente 6,1 e 5,3 [118]. Deste modo, além garantir um pH no qual as enzimas mantenham atividade, quando o pH da solução tampão da cromatografia está acima do ponto isoelétrico das enzimas, as mesmas ficam negativamente carregadas, e resinas de troca aniônica são empregadas. Além disso, devido ao fato de ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH estarem ligadas à membrana celular, a presença do detergente *Triton-X* 100 se faz necessário para solubilização das enzimas de interesse durante as diferentes etapas cromatográficas.

Após a etapa de rompimento da membrana celular, o extrato bruto contendo as enzimas PQQ-dependentes foi concentrado utilizando um *Centriprep*[®] com corte de massa molecular de 10 kDa (este peso molecular nunca deve ser maior do que a menor subunidade da enzima a ser purificada). A seguir, 50 mL do extrato bruto de enzimas foram aplicados em uma coluna de troca aniônica DEAE *Toyopearl 650M*[®] (2,5 x 25 cm) que foi previamente equilibrada com o mesmo tampão da diálise (Tris^+ $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 contendo $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e 1 % de sacarose) [93, 119].

A coluna foi então lavada aplicando-se 200 mL de solução do mesmo tampão, e posteriormente com 200 mL de solução tampão Tris^+ $75 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 contendo $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e 1 % de sacarose. As frações de enzimas PQQ-dependentes (que possuem uma coloração avermelhada típica) foram então eluídas com uma solução tampão Tris^+ $75 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 contendo 0,2% de *Triton X-100* (Sigma - Aldrich). O processo de eluição das amostras foi feito por meio de acoplamento com um espectrofotômetro, de modo que o aumento em absorbância indica a saída das proteínas da coluna. A seguir, a amostra de

Experimental

enzimas coletada foi concentrada para um volume total de 5 mL, seguido de uma troca de tampão via diálise utilizando uma solução de tampão fosfato $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, contendo $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl .

- Cromatografia de exclusão molecular

Para se conseguir uma melhor separação das enzimas obtidas após o processo de cromatografia de troca aniônica, 5 mL da solução de enzimas purificadas em tampão fosfato $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, contendo $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl , foram aplicados em uma coluna de exclusão molecular *Sephadex G-100* (2,5 x 30 cm). As frações de enzimas purificadas contendo ambas PQQ-ADH e PQQ-AldDH foram eluídas utilizando o mesmo tampão. Após a coleta das enzimas, as mesmas foram concentradas via *Centriprep*[®] para um volume final de 2 mL. Esta solução final de enzimas purificada apresenta uma coloração rosa típica (devido à presença dos grupos heme-c), e possui uma estabilidade de alguns dias quando mantida a 4 °C e aproximadamente 30 dias quando mantida -20 °C,

Figura 28.

Figura 28: Solução final das enzimas contendo ambas as enzimas PQQ-dependentes PQQ-ADH e PQQ-AldDH.

3.2.2. Determinação da atividade enzimática das enzimas PQQ-dependentes

A determinação da atividade enzimática das enzimas desidrogenases PQQ-dependentes pode ser realizada na presença dos aceptores de elétrons 2,6-diclorofenol indofenol (DCIP, em inglês) e metasulfato de fenazina (PMS, em inglês) [119]. Os elétrons gerados pela oxidação do substrato específico da enzima são “aceitos” pelas moléculas de DCIP com PMS, que atuam como um mediador neste método espectroscópico. As medidas de atividade foram realizadas em 600 nm, e a mudança na absorbância do DCIP corresponde a transição do composto de seu estado oxidado para seu estado reduzido, devido aos elétrons produzidos pela oxidação do substrato (equação 17).

Após o processo de purificação das enzimas PQQ-dependentes, obteve-se uma mistura contendo as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH. Para cada enzima de interesse, a mistura reacional consiste de 1,5 ml de tampão fosfato $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1}$, 200 μL de uma solução $60 \cdot 10^{-6} \text{ mol}^{-1}$ de PMS, 100 μL de uma solução $70 \cdot 10^{-6} \text{ mol}^{-1}$ de DCIP, 200 μL do substrato (soluções recém-preparadas de etanol ou acetaldeído), e 10 μL da solução purificada de enzima [119]. A medida de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro *Thermo Spectronic Genesys 20 Spectrophotometer* durante 2 minutos para cada amostra a 25 °C. A absorvidade molar (ϵ) do DCIP foi determinada experimentalmente, $1,55 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 29**).

Figura 29: Determinação experimental da absorvidade molar (ϵ) do DCIP.

A atividade específica a ser determinada se baseia na atividade total da enzima dividido pela massa de proteína que é determinada utilizando um kit de quantificação de enzima da *Pierce*[®] (*BCA protein assay*). O teste se baseia na detecção colorimétrica e quantificação da quantidade total de proteína pela combinação da redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} em meio alcalino, catalisada pelas proteínas, com detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva dos íons Cu^{+1} pelo reagente contendo o ácido bicinonínico [120]. A **Figura 30** apresenta a curva de calibração utilizada na quantificação das enzimas PQQ-dependentes.

Figura 30: Curva de calibração utilizada para quantificar as enzimas PQQ-dependentes purificadas.

Na equação 18 é apresentado o cálculo de determinação da atividade específica das enzimas PQQ-dependentes em U / mg:

$$U/mg = \frac{\frac{A-A_0}{2}}{\varepsilon} \times \frac{V_t}{V_e \times \frac{Q}{1000}} \quad (18)$$

Onde: A = absorbância em 600 nm após 2 min;

A₀ = absorbância inicial em 600 nm;

ε = absortividade molar;

V_t = volume total no ensaio (2,01 mL);

V_e = volume de enzima (10 µL);

Q = quantidade de enzima em mg determinada pelo teste de BCA.

3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) em gel de poliacrilamida (conhecida em inglês pela sigla SDS-PAGE) é uma técnica de separação de proteínas de acordo com seus tamanhos em um campo elétrico. Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas do detergente (SDS) carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína conferindo-lhe uma carga negativa, que faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando uma voltagem é aplicada. A técnica se baseia na migração de moléculas através do gel durante a aplicação de uma diferença de potencial, que proporciona uma separação das mesmas de acordo com seus tamanhos, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato das moléculas também influi, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel. Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular. As proteínas majoritárias são facilmente detectadas corando-se as proteínas do gel com um corante, tal como o azul de coomassie [99].

Para o procedimento de SDS-PAGE, inicialmente, a amostra contendo as proteínas purificadas foi preparada numa razão 4:1 com tampão apropriado (tampão comercial contendo SDS e íons tióis da *Pierce*[®]), seguido de aquecimento em água fervente para desnaturação das proteínas por 3 minutos, e posterior resfriamento antes de aplicação no gel. A seguir, foi utilizado um gel comercial da *Pierce*[®] em um sistema da *Owl Separations*[®], onde a solução e proteínas foi inserida no gel aplicando-se 100 mA a 150 V utilizando uma solução tampão de corrida HEPES (ácido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansulfônico). Para detecção das bandas das diferentes proteínas após a corrida, utilizou-se uma solução de corante também da *Pierce*[®] (*Gel Code Blue*[®]). Finalmente, os géis foram lavados por 12 horas com água deionizada.

3.2.4. Preparação dos bioanodos e caracterização eletroquímica

Nesta etapa do trabalho, dois diferentes polímeros foram testados na etapa de imobilização das enzimas em superfície de carbono, o dendrímero PAMAM e a membrana Nafion[®]-modificada; consequentemente, diferentes protocolos foram utilizados durante a preparação dos bioanodos para realização de caracterização eletroquímica, em função de cada tipo de matriz de imobilização.

- Preparação dos bioanodos utilizando a membrana Nafion[®]-modificada

Modificação da membrana Nafion[®]

O objetivo do tratamento da membrana Nafion[®] para utilização como matriz de imobilização é torná-la em um ambiente favorável para retenção da atividade de biomoléculas; assim, o processo de modificação é feito no sentido de manter as propriedades físicas da membrana original, porém diminuindo-se a acidez da membrana e aumentando o transporte de massa através da mesma.

A modificação da membrana Nafion[®] foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura [121]. A primeira etapa do processo envolve a mistura de 2 mL da solução de Nafion[®] 117 5 % (Sigma - Aldrich) com excesso (3 vezes superior) de TBAB em relação a concentração de ácido sulfônico presente na membrana sem modificação, o que corresponde a 0,07838 g do sal. Essa mistura foi agitada em aparelho do tipo *Vortex* por 10 - 15 minutos, e posteriormente seca em uma “barca” de pesagem durante 24 horas em dessecador. A seguir, a membrana é lavada com excesso de água deionizada e deixada em repouso por mais 24 horas em água deionizada. Após esse período, retira-se a água da membrana e a mesma é mantida em dessecador por no mínimo 24 horas até completa secagem. Finalmente, a membrana Nafion[®] modificada seca é re-suspensa com 2 mL de etanol e pronta para utilização.

Preparação dos bioanodos para caracterização eletroquímica

Os bioanodos foram preparados por meio da imobilização de ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH purificadas em eletrodos de carbono vítreo de $0,070 \text{ cm}^2$ (previamente polidos com alumina $0,3 \text{ }\mu\text{m}$, limpos eletroquimicamente por voltametria cíclica, em meio de HNO_3 1 mol L^{-1} , e lavados em água deionizada; posteriormente secos com N_2 e, finalmente deixados por 24 horas em dessecador para secagem completa). Nessa etapa, duas diferentes amostras foram preparadas; uma apenas na presença da membrana Nafion[®] modificada (amostra 1), e outra na presença também de MWCNTs (amostra 2), ambas ilustradas na **Figura 31**.

Figura 31: Ilustração das duas amostras de bioanodos preparadas para caracterização eletroquímica, na ausência (amostra 1, à esquerda) e na presença de MWCNTs (amostra 2, à direita).

Ambas as amostras foram preparadas pela metodologia de adsorção passiva; no caso da amostra 1, o bioanodo foi preparado pela adição de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo uma mistura da solução purificada de enzimas com a membrana modificada (na razão 1:2 de enzima : membrana) diretamente na superfície do eletrodo de carbono vítreo, seguido de secagem por 12 horas.

Para a preparação do bioanodo na presença de MWCNTs (amostra 2), procedeu-se inicialmente com a dispersão do nanomaterial de carbono, por meio da mistura de 5 mg do

nanotubos comercial em 600 μL de uma solução 1:1 etanol 0,2 mol L^{-1} : tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} , pH = 7,2. Após 2 horas de ultra-sonificação, 30 μL da solução de membrana Nafion[®]-modificada foi adicionado à mistura e agitado em “vortex” por mais 30 minutos. Finalmente, uma mistura de enzimas/MWCNTs/membrana Nafion[®]-modificada na razão 1:1 : 1 em volume foi preparada, e a amostra 2 foi preparada pela adição de 10 μL desta mistura diretamente na superfície do eletrodo de carbono vítreo, seguido de secagem por 12 horas.

- Preparação dos bioanodos utilizando o dendrímero PAMAM

Para a preparação dos bioanodos utilizando o dendrímero PAMAM, utilizou-se a estratégia de preparação com a metodologia de automontagem. Para este fim, foi utilizado um eletrodo de ouro previamente modificado com ácido 4,4-ditiobutírico (em inglês, DTBA).

Inicialmente, os eletrodos de ouro de $0,031 \text{ cm}^2$ foram polidos com alumina $0,05 \text{ nm}$ e posteriormente limpos com ácido sulfúrico, seguidos por ultra-sonificação em uma solução 1:1 etanol : água. O procedimento de modificação da superfície de ouro foi realizado pela imersão dos eletrodos de ouro em uma solução de DTBA $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por 24 horas, seguido de lavagem com solução 1:1 etanol : água, e secagem por 24 horas.

Após o processo de modificação da superfície de ouro, o bioanodo foi preparado pela imersão dos substratos modificados em um solução de PAMAM 2 mg mL^{-1} em meio de tampão Tris^+ $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,6$ durante 30 minutos, seguido de lavagem com solução tampão, e posteriormente imersão em solução contendo as enzimas PQQ-dependentes por 1 hora. A arquitetura final deste bioanodo é apresentada na **Figura 32**.

Figura 32: Ilustração do bioanodo preparado utilizando o dendrímero PAMAM via automontagem em eletrodo de ouro previamente modificado DTBA.

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados em uma célula de compartimento único (similar à ilustrada na **Figura 19**), utilizando uma rede de platina como eletrodo auxiliar, além de um ECS como eletrodo de referência. A caracterização eletroquímica foi realizada em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2, contendo 0,5 mol L⁻¹ de nitrato de sódio, em várias concentrações de etanol, no intervalo de -0,60 a 0,60 V vs. ECS.

3.2.5. Preparação dos bioanodos e medidas de densidade de potência

Para os testes de biocélula etanol/O₂ com TED, os bioanodos foram preparados por meio da imobilização das enzimas PQQ-dependentes em superfície de papel de carbono de 1 cm². Ambas as matrizes de imobilização de enzimas já mencionadas (PAMAM e membrana Nafion[®]-modificada) foram empregadas também nos testes de biocélula. Nesta etapa, foi utilizada a mesma metodologia de preparação com ambos os polímeros utilizando a metodologia de adsorção passiva, sendo preparadas amostras na presença e na ausência de MWCNTS.

Para a preparação dos bioanodos na ausência de nanotubos, 50 µL de uma solução 1:2 de enzima : polímero foi adicionada diretamente na superfície de carbono, seguido de secagem por 12 horas em dessecador (ilustrado à esquerda da **Figura 33**).

Para investigar a influência dos nanotubos de carbono no desempenho do bioanodo preparado com TED, foram preparados bioanodos na presença deste nanomaterial utilizando a mesma metodologia descrita no item **3.2.4.**; neste caso, o procedimento utilizado na preparação dos bioanodos com a membrana Nafion[®]-modificada foi explorado também com o dendrímero PAMAM. A única particularidade desta etapa é a adição de uma quantidade maior da solução enzima/polímero/MWCNTs diretamente na superfície de papel de carbono, ou seja, 50 µL (à direita da **Figura 33**).

Figura 33: Ilustração dos bioanodos utilizados nos testes de biocélula etanol/ O_2 com TED utilizando o dendrímero PAMAM na ausência (à esquerda), e na presença de MWCNTs (à direita).

As medidas de densidade de potência foram realizadas em uma célula similar à ilustrada na **Figura 23**, com dois compartimentos separados por uma membrana Nafion[®], além de uma membrana de difusão gasosa (ELAT) composta de 20 % Pt em C (E-TEK) prensada a quente como material catódico, sendo mantido em contato direto com o ar. O compartimento da célula (10 mL) foi preenchido com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, nitrato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol. Ambos os testes de potência e voltametria cíclica foram realizados a 25°C em um potenciostato *CH Instruments 611C*. As medidas de PCA foram realizadas por 1 hora, e as curvas de polarização foram feitas a 1 mV s^{-1} , das quais foram obtidas as curvas de densidade de potência, baseado na área geométrica do anodo. Todos os resultados apresentados são baseados em medidas de triplicata.

Capítulo 4

4. Resultados e discussão

PARTE 1

4.1. Transferência eletrônica mediada

4.1.1. Caracterização cinética das enzimas desidrogenases em solução

Na primeira etapa deste trabalho buscou-se avaliar e compreender a cinética enzimática de todas as enzimas a serem utilizadas durante a preparação dos bioanodos com transferência eletrônica mediada. Uma vez que o objetivo final deste estudo é alcançar um bioanodo com desempenho satisfatório, é de fundamental importância avaliar e entender todos os parâmetros que influenciam a atividade das enzimas empregadas. Foram realizados inicialmente os ensaios de cinética enzimática com as enzimas em solução para posteriormente realizar os experimentos com a enzima imobilizada na superfície de carbono.

A **Figura 34** apresenta o perfil obtido em todos os ensaios de cinética enzimática, dos quais são obtidos os valores de velocidade inicial da reação de conversão de ambos os substratos (etanol ou acetaldeído), que é determinada por regressão linear durante os primeiros segundos de reação.

Figura 34: Curva de absorvância (em 340 nm) em função do tempo obtida nos ensaios de atividade enzimática com as enzimas ADH e AldDH em meio de tampão fosfato, pH 7,2.

Desta maneira, os estudos de cinética enzimática foram realizados verificando a influência de parâmetros como concentração de substrato (etanol e acetaldeído) e coenzima (NAD^+), quantidade de enzima utilizada na determinação de atividade enzimática, além de parâmetros externos, como o pH e a temperatura, que influenciam as proteínas tanto estruturalmente como também na atividade das mesmas em solução ou quando imobilizadas em superfícies sólidas.

4.1.1.1. Caracterização da enzima ADH

Inicialmente, foi realizado o estudo de cinética enzimática com a enzima que catalisa a primeira etapa do metabolismo do etanol **Figura 35**, a enzima ADH.

Figura 35: Primeiras etapas do metabolismo de oxidação do etanol.

- Efeito da quantidade de enzima ADH na cinética enzimática

Para avaliar o efeito da quantidade de enzima ADH na cinética enzimática (**Figura 36**) foram realizados experimentos variando-se a quantidade de enzima de 0,01 a 0,6 U (sendo que 1 unidade de atividade enzimática, U, é definida como a quantidade que catalisa a conversão de $1\text{ }\mu\text{mol}$ de etanol a acetaldeído por minuto por mg de enzima). Para um volume final de solução igual a 1 mL, a concentração final dos reagentes foi mantida em: $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de etanol, $1,9\text{ }10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

Figura 36: Influência da quantidade de ADH na cinética enzimática, $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de etanol, $1,9\text{ }10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

O gráfico da **Figura 36** mostra que a quantidade de enzima empregada nos ensaios influencia diretamente na velocidade de conversão do substrato; observa-se também, que acima de valores da ordem de 0,2 U, tem-se perda de linearidade e posterior formação de um patamar. Em vista dos resultados obtidos, escolheu-se a quantidade equivalente a 0,2 U de enzima como valor de referência para os próximos experimentos de cinética enzimática com a enzima em solução.

- Efeito da concentração de etanol na cinética enzimática

Para avaliar o efeito da concentração de substrato na cinética enzimática, foram realizados experimentos variando-se a quantidade de etanol de $0,5 \cdot 10^{-3}$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Para um volume final de solução igual a 1 mL, a concentração final dos reagentes foi mantida em: 0,2 U de enzima, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

A **Figura 37 A** mostra o efeito da concentração de substrato na velocidade de formação de NADH (por mg de enzima) catalisada pela enzima ADH. Em concentrações relativamente baixas de substrato, a velocidade de formação de NADH aumenta linearmente com a concentração de etanol, a seguir tem-se uma diminuição da velocidade inicial com posterior formação de um patamar, originado uma curva do tipo hipérbole equilátera. Além do perfil cinético observado que segue o modelo de Michaelis-Menten (considerando o etanol como substrato), acrescenta-se que o complexo $\text{ADH} \cdot \text{NADH}$ formado (cuja dissociação é a etapa determinante da velocidade da reação) é estabilizado em elevadas concentrações de etanol devido a mudanças nas propriedades dielétricas do meio [122].

Figura 37: (A) Influência da concentração de substrato na cinética enzimática; (B) Gráfico do duplo recíproco, 0,2 U de enzima, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

Para obter os parâmetros cinéticos $v_{\text{máx}}$ e K_m , foi traçado o gráfico do duplo recíproco na faixa de $0,5 \cdot 10^{-3}$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (**Figura 37 B**) em função da velocidade de formação de NADH ($\mu\text{mol NADH}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Os valores de velocidade de formação de NADH em baixas concentrações de etanol foram eliminados devido ao baixo coeficiente de relação dos ensaios nestas condições. Os valores obtidos de $v_{\text{máx}}$ e K_m foram respectivamente $69,4 \mu \text{ mol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, e $18,18 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de etanol.

- Efeito da concentração de NAD^+ na cinética enzimática

Para avaliar o efeito da concentração de coenzima na cinética enzimática (**Figura 38 A**) foram realizados experimentos variando-se a quantidade de NAD^+ de $0,12$ a $7,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração final dos reagentes foi mantida em: $0,2 \text{ U}$ de enzima, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de EtOH em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

Figura 38: (A) Influência da concentração de NAD^+ na cinética enzimática; (B) Gráfico do duplo recíproco, $0,2 \text{ U}$ de enzima, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de EtOH em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

A **Figura 38 A** mostra que o comportamento cinético esperado para a enzima ADH em relação à coenzima NAD^+ se apresenta como uma curva do tipo hipérbole equilátera até valores da ordem de $2,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NAD}^+$; após este ponto, observa-se uma queda brusca na velocidade de conversão do substrato. O perfil observado sugere uma possível inibição por excesso de substrato, o qual é sustentado pelo mecanismo cinético da enzima ADH que indica como estágio crucial do processo catalítico, a dissociação da espécie NADH do complexo formado. De fato, em elevadas concentrações de NAD^+ , deve existir uma competição das espécies reduzidas na catálise com as espécies NAD^+ ainda em solução, uma vez que ambas competem pelo mesmo sítio de ligação da enzima. Este resultado se mostra bastante relevante,

devendo ser considerado para maximização do desempenho das enzimas tanto em solução quanto imobilizadas em superfícies de carbono.

Para se obter os parâmetros cinéticos de $v_{\text{máx}}$ e K_m foi traçado, o gráfico do duplo recíproco (**Figura 38 B**). Os valores de velocidade de formação de NADH em concentrações de NAD^+ superiores a $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram eliminados devido à diminuição da velocidade de formação de NADH que ocorre nestas condições. Os valores obtidos de $v_{\text{máx}}$ e K_m foram respectivamente $70,74 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $0,14 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ .

Uma comparação entre os valores das constantes cinéticas obtidas neste trabalho, tanto para o substrato (etanol) como para a coenzima (NAD^+), mostra que os mesmos estão de acordo com os valores encontrados na literatura (**Tabela 2**). Uma interpretação prática da constante de Michaelis-Menten indica que quanto maior o valor de K_m menor será a afinidade de enzima pelo substrato, e analogamente quanto menor o valor desta constante, maior será esta afinidade. Logo, para a enzima ADH tem-se uma maior afinidade entre a enzima com a espécie NAD^+ do que com seu substrato, o etanol, sugerindo que a coenzima se liga primeiro à enzima com posterior ligação do substrato. Além disso, a grande diferença observada entre os valores obtidos para o K_m do substrato e da coenzima corrobora com a estrutura da enzima ADH; na qual o sítio de ligação da coenzima NAD^+ se apresenta facilmente disponível à entrada desta espécie, enquanto o sítio de ligação do substrato é bastante estreito e praticamente inacessível à solução, o que dificulta bastante o acesso das moléculas de etanol neste sítio de ligação [79].

Tabela 2: Parâmetros cinéticos da enzima ADH em solução

K_m (EtOH) / 10^{-3} mol L ⁻¹	K_m (NAD ⁺) / 10^{-3} mol L ⁻¹	Referência
18	0,14	Trabalho atual
18	0,17	[123]
13	0,75	[86]
22	0,11	[124]
17	0,17	[85]

O estudo cinético da enzima ADH mostrou que todos os parâmetros de ensaio avaliados apresentam influência direta na atividade enzimática. Tanto a quantidade de enzima utilizada, quanto a concentração de substrato e coenzima são fatores que devem ser controlados de forma a se obter maior atividade enzimática. Para futura preparação do bioanodo, todos esses parâmetros deverão ser considerados a fim de se obter a atividade máxima desse material.

4.1.1.2. Caracterização da enzima AldDH

Antes dos ensaios em função da concentração de substrato (acetaldeído) e coenzima (NAD^+), foi inicialmente avaliada a dependência da enzima AldDH por íons potássio (K^+) e tióis. Os resultados da **Figura 39** evidenciam que, para apresentar atividade satisfatória, a enzima é altamente dependente de ambas as espécies avaliadas. Os ensaios foram realizados em função da concentração de íons K^+ de $10 \cdot 10^{-3}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e em função da concentração de 2-mercaptoetanol de 1 a $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 39: Efeito da presença de potássio e íons tiol na atividade da enzima AldDH.

AldDH = $0,05 \text{ U}$, $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

Observa-se que na ausência de íons K^+ a enzima AldDH apresenta atividade cinética ao redor de zero, já os valores de velocidade de conversão de substrato obtidos na presença de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e na presença de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + 2-mercaptoetanol ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foram respectivamente $10,2$ e $29,7 \mu \text{ mol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

- Efeito da quantidade de enzima AldDH na cinética enzimática

Para avaliar o efeito da quantidade de enzima AldDH na cinética enzimática (**Figura 40**) foram realizados experimentos variando-se a quantidade de enzima de 0,025 a 0,125 U. Para um volume final de solução igual a 1 mL, a concentração final dos reagentes foi mantida em: $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

Figura 40: Influência da quantidade de AldDH na cinética enzimática, em meio de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol, em meio de tampão fosfato, pH 7,2.

O gráfico da **Figura 40** mostra que a quantidade de enzima utilizada influencia diretamente na velocidade de conversão de substrato até valores de aproximadamente 0,05 U, com posterior perda de linearidade e posterior formação de um patamar por volta de 0,1 U. Em vista dos resultados obtidos, escolheu-se a quantidade equivalente a 0,5 U de enzima como referência para os próximos experimentos de cinética enzimática.

- Efeito da concentração de acetaldeído na cinética enzimática

Para avaliar o efeito da concentração de substrato na cinética enzimática (**Figura 41**) foram realizados experimentos variando-se a quantidade de acetaldeído de $0,5$ a $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para um volume final de solução igual a 1 mL , a concentração final dos reagentes foi mantida em: $0,05 \text{ U}$ de AldDH, $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em meio de solução tampão fosfato, $\text{pH } 7,2$.

Figura 41: Influência da concentração de substrato na cinética enzimática da enzima AldDH, em meio de $0,05 \text{ U}$ de enzima, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em meio de solução tampão fosfato, $\text{pH } 7,2$.

A **Figura 41 A** mostra que assim como a enzima ADH, a enzima AldDH também apresenta um perfil cinético que segue o modelo de Michaelis-Menten; ou seja, em concentrações relativamente baixas de acetaldeído a velocidade de formação de NADH aumenta linearmente com a concentração de substrato, a seguir tem-se uma diminuição da velocidade inicial originando então a curva do tipo hipérbole equilátera. Entretanto, diferentemente da enzima ADH, o comportamento cinético da enzima AldDH indica uma forte inibição por excesso de substrato em concentrações acima de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A inibição se mostra bastante específica entre aldeído e enzima, sugerindo que as moléculas de

acetaldeído podem também estar se ligando ao complexo ternário formado, assim diminuído a atividade enzimática da enzima em questão [90]. Para se obter os parâmetros cinéticos de $v_{\text{máx}}$ e K_m , foi traçado o gráfico do duplo recíproco (**Figura 41 B**) até valores de concentração de aldeído onde não se observa inibição. Os valores obtidos de $v_{\text{máx}}$ e K_m foram respectivamente $24,1 \mu\text{ mol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $16,9 \mu\text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído. Comparativamente aos valores de constante de afinidade observados na literatura (que variam de 9 a $28 \mu\text{ mol L}^{-1}$), observa-se que os resultados aqui obtidos estão numa faixa bastante semelhante [89, 125].

- Efeito da concentração de NAD^+ na cinética enzimática

Para avaliar o efeito da concentração da coenzima na atividade da enzima AldDH em solução (**Figura 42 A**), foram realizados ensaios de cinética variando-se a quantidade de NAD^+ de 0,1 a $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração final dos reagentes foi fixada em 0,05 AldDH, $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoethanol, pH 7,2.

Figura 42: Influência da concentração de NAD^+ na cinética enzimática da enzima AldDH, em meio de 0,05 U de enzima, $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acetaldeído, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2.

Diferentemente dos resultados de cinética enzimática obtidos com a enzima ADH em solução, os dados de cinética enzimática em função da quantidade de NAD^+ mostraram que, na faixa de concentração avaliada, não se observa nenhum processo de inibição com a enzima AldDH. De fato, o comportamento cinético que se adequa ao modelo de Michellis-Menten também é observado em função da quantidade de coenzima; ou seja, um comportamento cinético na forma de uma curva de hipérbole equilátera. Do gráfico duplo recíproco traçado (**Figura 42 B**), ambos $v_{\text{máx}}$ e K_m foram determinados; sendo respectivamente 23,2 μmol

$\text{NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $4,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^{+} , valor este que se encontra na mesma ordem de grandeza de trabalhos encontrados na literatura [88].

Mais uma vez, uma interpretação prática das constantes de Michaelis-Menten obtidas experimentalmente mostra que a enzima AldDH apresenta uma afinidade muito maior com seu substrato, o acetaldeído, em relação à sua coenzima, NAD^{+} , o que indica uma facilidade maior em relação ao acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima. Assim como observado nos estudos com a enzima ADH, todos os parâmetros avaliados nos ensaios de cinética enzimática com a enzima AldDH mostraram influência direta na atividade da mesma. Tanto a quantidade de enzima utilizada, quanto a concentração de acetaldeído e coenzima são fatores que devem ser controlados de forma a se obter maior atividade enzimática. Para futura preparação do bioanodo, os resultados obtidos serão de suma importância para se obter atividade máxima nos estudos com o eletrodo.

4.1.1.3. Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática das enzimas desidrogenases ADH e AldDH

A **Figura 43** apresenta o comportamento cinético de ambas as enzimas desidrogenases em solução, em função do pH do meio e também da temperatura dos ensaios. Por meio de ambas as curvas, é possível determinar tanto o parâmetro de temperatura ótima (**Figura 43A**) quanto o pH ótimo (**Figura 43B**) das enzimas ADH e AldDH.

Figura 43: Influência da temperatura (A) e do pH (B) na atividade enzimática da enzima ADH e da enzima AldDH em solução. (●) ADH 0,2 U, 0,1 mol L⁻¹ EtOH, 1,67 10⁻³ mol L⁻¹ NAD⁺, tampão fosfato, pH 7,2. (○) AldDH 0,05 U, 1,67 10⁻³ mol L⁻¹ NAD⁺, KCl 0,1 mol L⁻¹, 2-mercaptoethanol 0,01 mol L⁻¹.

Os ensaios com a enzima ADH mostraram que a mesma possui atividade catalítica bastante dependente do pH do meio reacional, com baixa atividade tanto em condições mais ácidas ou básicas, sendo que o máximo de atividade com esta enzima é obtido na faixa de pH de 7 a 8. Já com a enzima AldDH, observa-se uma relação entre a atividade catalítica e pH bastante diferente; ou seja, com uma baixa influência do pH do meio na atividade enzima na faixa avaliada, sendo observado um máximo de atividade por volta do pH 7. No caso dos ensaios em função da temperatura, confirma-se a tendência das enzimas desidrogenases de

possuir baixa atividade em condições drásticas de temperatura; no caso da enzima ADH, observa-se uma temperatura ótima entre 35 - 40 °C, e em torno de 35 °C com a enzima AldDH.

Os resultados obtidos nos ensaios de cinética tanto em função do pH do meio quanto da temperatura, com ambas as enzimas desidrogenases em solução estão de acordo com resultados descritos na literatura [89, 126, 127]. Os dados mostram também, que para se manter um ambiente no qual ambas as enzimas possam apresentar satisfatória atividade catalítica e fornecer condições para futura aplicação tecnológica, condições de pH fisiológico e temperatura de operação ambiente podem satisfatoriamente ser aplicados em sistemas enzimáticos que utilizam enzimas desidrogenases.

- Análise dos produtos formados

Com o intuito de verificar a formação dos produtos para cada enzima após os ensaios de cinética enzimática em solução, foram realizadas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após ensaios de cinética empregando-se as melhores condições de ensaio para cada enzima. Um comportamento altamente específico foi verificado com ambas as enzimas desidrogenases. Considerando o comportamento cinético da enzima ADH, 92 % dos produtos formados após o ensaio de cinética foram determinados como sendo acetaldeído (deve ser salientado que perda por volatilização de acetaldeído pode ocorrer durante as medidas de CLAE), muito justificado pela altíssima especificidade desta enzima em relação a álcoois de cadeia não ramificada de baixo peso molecular, tais como o etanol [83].

No caso da enzima AldDH, os resultados mostraram aproximadamente 90 % de ácido acético formado após os ensaios de cinética enzimática em solução.

4.1.2. Caracterização cinética das enzimas desidrogenases imobilizadas

4.1.2.1. Resultados obtidos com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva

Os estudos de cinética enzimática com os bioanodos visam avaliar de forma indireta o desempenho de cada eletrodo. Uma vez obtidos os valores cinéticos com os bioanodos, tais resultados são um indicativo da quantidade de enzimas ativas na superfície do eletrodo que serão responsáveis pela oxidação do etanol e, conseqüentemente, da potência gerada pelo bioanodo. Inicialmente, os ensaios foram realizados apenas com a enzima ADH imobilizada pela metodologia de adsorção passiva (item 3.1.4.). Os ensaios foram realizados nas mesmas condições dos experimentos com a enzima ADH em solução; para um volume final de solução igual a 1 mL, a concentração final dos reagentes foi mantida em: 0,1 mol L⁻¹ de etanol, 1,9 10⁻³ mol L⁻¹ de NAD⁺, pH 7,2. A **Figura 44** apresenta o perfil de atividade da enzima ADH em solução e imobilizada na superfície do bioanodo, mantendo-se a mesma quantidade de enzima em ambos os ensaios, ou seja, 0,2 U.

Figura 44: Comparação entre atividade da enzima ADH em solução e imobilizada na superfície do bioanodo em meio de tampão fosfato pH 7,2, 0,1 mol L⁻¹ de etanol, 1,9 10⁻³ mol L⁻¹ de NAD⁺, ADH = 0,2 U.

A partir dos resultados apresentados na **Figura 44**, fica evidente que tanto a quantidade de enzima quanto o tempo de ensaio necessitam ser ampliados para que atividade espectroscópica possa ser observada com as enzimas imobilizadas. Deste modo, ao aumentar a quantidade de enzima imobilizada além do tempo de ensaio, tornou-se possível a detecção de atividade enzimática espectrofotometricamente. Os resultados mostraram que apenas com 7 U de enzima ADH imobilizada na superfície de carbono, foi observada atividade enzimática satisfatória (o que representa cerca de 35 vezes a quantidade de enzima utilizada nos ensaios de cinética em solução).

Nesse sentido, foram realizados ensaios de cinética enzimática com a enzima ADH imobilizada na superfície de carbono, variando-se a quantidade de enzima de 0,2 a 250 U. Os resultados mostraram que a velocidade de conversão de substrato aumenta quase que linearmente com a quantidade de enzima imobilizada (**Figura 45**). Tendo como referência o bioanodo preparado com 28 U de enzima ADH (que posteriormente foi utilizado nos testes de potência), a velocidade máxima de conversão de substrato obtida foi de $0,021 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Figura 45: Comportamento cinético da enzima ADH em função da quantidade de enzima imobilizada em superfície de carbono, em meio de tampão fosfato pH 7,2, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ .

- Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $v_{m\acute{a}x}$

Similar aos ensaios de cinética realizados com a enzima ADH em solução, os parâmetros cinéticos K_m e $v_{m\acute{a}x}$ foram determinados para ambos, etanol e NAD^+ , nas mesmas condições de ensaio, agora com a enzima ADH imobilizada na superfície de carbono. A **Tabela 3** apresenta todas as constantes obtidas de forma comparativa com a enzima ADH em solução, além das constantes obtidas com a mesma imobilizada em suporte de carbono (incluindo os parâmetros K_{cat} e K_{cat}/K_m , também utilizados como referência em estudos de cinética enzimática).

Tabela 3: Parâmetros cinéticos da enzima ADH em solução e imobilizada em superfícies de carbono pelo método de adsorção passiva

Ambiente da enzima	Variável	Fixo (mM)	K_m (mM)	v_{max} ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Em solução	NAD^+	EtOH (100)	$0,14 \pm 0,002$	$70,7 \pm 0,2$	$176,7 \pm 0,2$	$1,3 \cdot 10^6 \pm 200$
	EtOH	NAD^+ (1,9)	$18,2 \pm 0,1$	$69,4 \pm 0,1$	$172,6 \pm 0,1$	9500 ± 10
Imobilizada	NAD^+	EtOH (100)	$0,16 \pm 0,002$	$0,020 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,002$	320 ± 2
	EtOH	NAD^+ (1,9)	$25,2 \pm 0,1$	$0,021 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,001$	$2 \pm 0,1$

Por meio da comparação entre os valores de $v_{m\acute{a}x}$ obtidos com a enzima ADH com base nas medidas espectrofotométricas de atividade enzimática em ambos os casos, fica claro a maior facilidade de entrada/saída de substrato/produto na condição da enzima em solução em relação ao mesmo processo observado com a enzima imobilizada, que se mostra bastante lento. Os valores de K_{cat} e K_{cat}/K_m também evidenciam a pronunciada redução de atividade após o processo de imobilização, uma vez que os valores destas constantes são bastante inferiores comparados aos mesmos em solução. O valor obtido de K_{cat} mostra que o comportamento cinético da enzima em solução indica mais de 170 ciclos de reação completas

em um segundo; ao passo que o mesmo processo, com a enzima imobilizada, ocorre de maneira bem mais lenta. O parâmetro de eficiência catalítica, K_{cat}/K_m , também sustenta tal observação, uma vez que o mesmo se apresenta com uma ordem de magnitude cerca de 3 vezes maior na condição da enzima em solução.

Embora tenham sido obtidos valores de velocidade de conversão de substrato bastante baixos com a enzima imobilizada em superfície de carbono, os valores de K_m obtidos para a enzima imobilizada revelam um comportamento bastante similar ao observado com a enzima em solução; indicando uma boa retenção da afinidade com ambos NAD^+ e etanol após o processo de ancoragem das enzimas.

Para compreender a razão de tal redução de atividade após a etapa de imobilização, observada via espectrofotometria, alguns fatores devem ser considerados. Primeiramente, a estrutura da enzima em solução permite o acesso do substrato de modo tridimensional, assim facilitando o acesso ao sítio ativo da mesma. Quando imobilizada na superfície do eletrodo, a enzima ancorada pode ter a face do sítio ativo voltado para o lado do dendrímero PAMAM, o que dificulta ou mesmo impossibilita o acesso às moléculas de substrato. Ou seja, limites difusionais ao sítio catalítico da enzima ADH impostos pela presença do dendrímero PAMAM são, provavelmente os principais fatores responsáveis pela atividade enzimática bastante inferior observada durante os ensaios espectrofotométricos com a enzima imobilizada em superfície de carbono.

Outro fator também a ser considerado é a metodologia de imobilização empregada, que não permite muito controle a cerca da disposição da enzima no eletrodo. É possível que as enzimas adotem um arranjo randômico; de modo que seu sítio ativo possa ser bloqueado. Além disso, é importante salientar que processos de desnaturação enzimática sempre devem ser considerados após processos de imobilização de enzimas; tal fato, porém, não foi observado em estudos nos quais o dendrímero PAMAM foi empregado para imobilização da

enzima Cl-catecol 1,2 deoxigenase, revelado por experimento de dicroísmo circular [68]. Entretanto, tal consideração não pode ser completamente descartada, até mesmo em virtude de tamanha quantidade de enzima necessária para se observar atividade espectroscópica quando imobilizada em superfície sólida.

4.1.2.2. Resultados obtidos com os bioanodos preparados pelo método de automontagem

- Cinética enzimática da enzima ADH

Na primeira etapa dos ensaios de cinética com os bioanodos preparados via automontagem, investigou-se o bioanodo mono-enzimático (somente com a enzima ADH) para a oxidação do etanol a acetaldeído. Neste caso, a influência da quantidade de enzima na cinética do bioanodo foi avaliada na faixa de 1 a 36 bicamadas de ADH/dendrímico. Por meio da quantificação realizada durante o processo de deposição das enzimas utilizando o método descrito por Bradford [117], a quantidade de enzima ADH depositada no suporte de carbono foi de 95 ng cm⁻² por bicamada. Resultados similares são encontrados na literatura com eletrodos de Au, com uma massa média de 52,1 ng em cada deposição [73]. Desconsiderando as diferenças experimentais, estes dados sugerem que a maior massa depositada se deve à maior área superficial do suporte de carbono usado neste trabalho.

A **Figura 46** apresenta os resultados de cinética enzimática em função do número de bicamadas adsorvidas, considerando a conversão de etanol à acetaldeído pela enzima ADH imobilizada em plataforma de carbono pelo método de automontagem. Os resultados indicam uma relação quase linear entre o número de bicamadas e a velocidade de conversão de substrato até cerca de 10 bicamadas, com perda de linearidade acima deste valor e subsequente formação de um patamar. Esses resultados indicaram ainda que valores de atividade enzimática satisfatórios são obtidos com quantidades bastante inferiores às aquelas empregadas nos ensaios com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva.

Figura 46: Cinética enzimática da enzima ADH imobilizada em superfície de carbono em função do número de bicamadas, em meio de tampão fosfato pH 7,2, 0,1 mol L⁻¹ de etanol, 1,9 10⁻³ mol L⁻¹ de NAD⁺.

Apesar dos resultados mostrarem que acima de 12 bicamadas não se observa alteração substancial na velocidade de conversão de substrato, o valor de 36 bicamadas foi tomado como referência para os ensaios subsequentes, devido a maior estabilidade desta amostra.

Para determinar as constantes cinéticas da enzima ADH imobilizada, foram realizados ensaios em função da concentração tanto de etanol como de NAD⁺, utilizando as mesmas condições de ensaio empregadas com a enzima em solução. Considerando os ensaios de variação de substrato, os valores determinados de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ foram respectivamente 17,9 10⁻³ mol L⁻¹ de etanol e 0,45 μmol NADH min⁻¹ mg⁻¹. A partir dos experimentos de variação de concentração de coenzima, determinaram-se também os respectivos valores de K_m e $v_{m\acute{a}x}$, 0,15 10⁻³ mol L⁻¹ de NAD⁺ e 0,46 μmol NADH min⁻¹ mg⁻¹. A **Figura 47** apresenta o perfil cinético da enzima ADH em solução e imobilizada em superfície de carbono pela

metodologia de automontagem, além dos respectivos gráficos de duplo recíproco em função da concentração de coenzima.

Figura 47: Perfil cinético da enzima ADH em solução e imobilizada em superfície de carbono pela metodologia de automontagem em meio de solução tampão fosfato pH 7,2 e 0,1 mol L⁻¹ de etanol; (▲) 0,2 U de ADH em solução, (●) 36 bicamadas de ADH imobilizada. Em detalhe, respectivos gráficos de duplo recíproco.

Uma comparação entre os dados cinéticos obtidos com a enzima ADH em solução e os dados obtidos com a enzima imobilizada demonstra que, apesar de se observar uma velocidade de conversão muito inferior daquela obtida em solução ($v_{\text{máx}} = 70 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$), justificada por alguns fatores já mencionados (principalmente devido a limites difusionais impostos pela presença do dendrímero); os resultados obtidos com o bioanodo preparado via automontagem ($v_{\text{máx}} = 0,45 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) evidenciam que a técnica utilizada favorece bastante a obtenção de um sistema com melhor disposição das enzimas na superfície de carbono, assim, facilitando entrada/saída de substrato produto e

consequentemente favorecendo a detecção espectrofotométrica da atividade enzimática, comparado aos dados obtidos com o bioanodo preparado pela simples adsorção passiva ($v_{\text{máx}} = 0,02 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, item 4.1.2.1.).

Nesse contexto, a incorporação de enzimas e dendrímeros em estrutura de camadas tende a diminuir a densidade de superfície da enzima imobilizada, ou seja, permite que as moléculas de proteína se reorientem na superfície do bioanodo, facilitando assim o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Além disso, a estrutura porosa da camada do dendrímero PAMAM também tende a facilitar os processos difusionais na superfície do bioeletrodo [73, 128]. Acrescenta-se ainda, que o comportamento de afinidade entre enzima e substrato parece permanecer bastante similar na situação da enzima ADH imobilizada, tanto com seu substrato quanto para a coenzima.

- Estabilidade da enzima ADH imobilizada

Para avaliar a estabilidade das enzimas imobilizadas em função do tempo, foram realizados ensaios de cinética enzimática utilizando uma mesma amostra do bioanodo contendo 36 bicamadas de ADH imobilizada por um período de 90 dias (as amostras foram mantidas em solução tampão a 4 °C nos intervalos entre cada medida). Os resultados mostraram que não se observa relevante diminuição de atividade nos primeiro 30 dias de testes (**Figura 48**), o que demonstra a capacidade do sistema dendrímero/enzima em apresentar atividade espectroscópica, além de retê-la por um longo período de tempo.

Figura 48: Atividade da enzima ADH imobilizada em superfície de carbono em função do tempo, bioanodo contendo 36 bicamadas de ADH, 0,1 mol L⁻¹ de etanol, tampão fosfato, pH 7,2.

- Cinética enzimática da enzima AldDH

De modo semelhante aos resultados obtidos com a enzima ADH, os ensaios em função da quantidade de enzima AldDH imobilizada por meio da técnica de automontagem mostrou que considerável atividade enzimática é obtida apenas acima de 20 bicamadas dendrímero/enzima. A mesma arquitetura empregada nos estudos com a enzima ADH (suportes de carbono com 36 bicamadas de enzima) foi utilizada também nos ensaios subsequentes com a enzima AldDH.

Mantendo as mesmas condições de ensaio descritas no item 4.1.1.2. nos estudos utilizando a enzima AldDH em solução, ambos K_m e $v_{\max}$ foram determinados com a enzima imobilizada em função da concentração de acetaldeído (**Figura 49**) e NAD^+ .

Figura 49: Perfil cinético da enzima AldDH em solução e imobilizada em superfície de carbono pela metodologia de automontagem em meio de solução tampão fosfato pH 7,2, $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoethanol. (▲) AldDH em solução, 0,05 U; (●) 36 bicamadas de AldDH imobilizada. Em detalhe, respectivos gráficos de duplo recíproco.

Mais uma vez, o comportamento cinético obtido por meio das medidas espectrofotométricas com a enzima imobilizada indica uma atividade enzimática bastante inferior da enzima na condição imobilizada; entretanto, apesar das menores taxas de conversão obtidas com a enzima AldDH ancorada, as constantes de afinidade demonstram uma retenção do comportamento das enzimas em ambas as situações analisadas. Os valores determinados de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ para enzima imobilizada em relação ao seu substrato foram respectivamente $16,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acetaldeído e $0,13 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Considerando os ensaios em função da concentração de coenzima, as constantes obtidas foram respectivamente $0,53 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,12 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, para K_m e $v_{m\acute{a}x}$. A **Tabela 4** apresenta todas as constantes cinéticas determinadas para ambas as enzimas desidrogenases ADH e AldDH em solução e imobilizada em plataforma de carbono.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos em relação aos respectivos substratos para ambas as enzimas desidrogenases em solução e imobilizadas em plataformas de carbono pela metodologia de automontagem

Enzima		Parâmetros			
		K_m ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	v_{max} ($\mu \text{ mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
ADH	Em solução	$18,2 \pm 0,1$	$69,4 \pm 0,1$	$172,6 \pm 0,1$	9500 ± 10
	Imobilizada	$17,9 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,02$	59 ± 1
AldDH	Em solução	$17 \cdot 10^{-3} \pm 1$	$24,1 \pm 0,2$	$80,3 \pm 0,2$	$4,7 \cdot 10^6 \pm 2$
	Imobilizada	$16 \cdot 10^{-3} \pm 1$	$0,13 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,01$	$26,8 \cdot 10^3 \pm 1$

- Sistema enzimático duplo

Com o objetivo de obter a oxidação completa de combustíveis, geralmente, são utilizados sistemas nos quais múltiplas enzimas desidrogenases são imobilizadas em uma plataforma sólida na forma de cascata [49, 50, 111]. Apesar dos baixos valores de velocidade de conversão de substrato obtidos com a enzima AldDH em relação à enzima ADH, a grande afinidade entre AldDH e seu substrato, acetaldeído, torna possível a obtenção de um sistema integrado eficiente utilizando ambas as enzimas; isto é, logo que a enzima ADH catalisa o primeiro passo de oxidação do etanol, a enzima AldDH é capaz de catalisar rapidamente a segunda etapa de oxidação.

Desse modo, a fim de simular esse tipo de comportamento nos ensaios cinéticos, a técnica de automontagem foi empregada para a imobilização de ambas ADH e AldDH em plataformas de carbono. Para este fim, uma amostra com 36 bicamadas contendo ambas as enzimas desidrogenases foi preparada imobilizando as enzimas em camadas separadas, com uma arquitetura final de sequência ADH/PAMAM/AldDH. Os resultados cinéticos obtidos com as duas enzimas imobilizadas em plataforma de carbono utilizando a metodologia de automontagem indicaram um valor máximo de atividade catalítica de $0,62 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, o que evidencia um melhor desempenho catalítico desse sistema em relação aos sistemas individuais (**Tabela 4**).

Comparando-se os valores obtidos no sistema enzimático duplo com aqueles obtidos no sistema individual que emprega a enzima ADH, fica claro que a utilização de enzimas desidrogenases em cascata aumenta o desempenho cinético do sistema global, sem causar danos à primeira etapa de oxidação. Além disso, esses resultados indicam que um bom arranjo das enzimas imobilizadas no suporte de carbono é fornecido pela estrutura em camadas, o que facilita os processos de difusão durante a catálise e contribui para o desempenho global do sistema.

Embora todos os resultados cinéticos indiquem que a utilização da técnica de automontagem fornece um bom controle da disposição da enzima sobre a plataforma de carbono, proporcionando assim boas taxas de conversão de substrato com as enzimas imobilizadas; uma grande diminuição na atividade enzimática ainda é observada, quando se compara os resultados da condição tridimensional em solução e da situação bidimensional no suporte de carbono. Nesse contexto, a questão que se coloca está relacionada ao efeito da técnica de imobilização empregando dendrímeros sobre a atividade das enzimas. Na verdade, alguns fatores devem ser considerados para compreender o comportamento cinético de enzimas desidrogenases imobilizadas com dendrímeros.

Considerando as enzimas em solução, limitações difusionais podem normalmente ser desconsideradas; no entanto, no caso de enzimas imobilizadas em dendrímeros, os efeitos da transferência de massa devem ser muito relevantes. Desta forma, uma melhor taxa de difusão proporciona maior atividade das enzimas imobilizadas. Assim, os melhores resultados cinéticos obtidos com o sistema enzimático duplo em comparação ao sistema individual é uma indicação de que uma boa transferência de massa é fornecida pela metodologia de automontagem.

Conclusões parciais

De modo geral, os resultados de cinética enzimática mostraram claramente que os vários parâmetros cinéticos analisados, tais como a concentração de substratos e coenzima, que podem inibir a ação das enzimas, devem ser considerados, a fim de se obter atividade máxima com as enzimas imobilizadas. Além disso, baseado em todos os resultados obtidos, a etapa de imobilização das enzimas confirma ser crucial para a obtenção de um sistema viável, e nesse sentido, a escolha de um processo de imobilização deve ser cuidadosa e específica para cada tipo de sistema e aplicação desejada [129].

4.1.3. Preparação e caracterização eletroquímica dos catalisadores da espécie NAD^+

4.1.3.1. Eletropolimerização dos catalisadores da espécie NAD^+

Durante o processo catalítico de conversão dos substratos em uma biocélula a combustível, ambas as enzimas desidrogenases NAD^+ -dependentes ADH e AldDH transferem dois elétrons e um próton para a forma oxidada do cofator NAD^+ , gerando em solução espécies na forma reduzida, NADH. O potencial redox formal da espécie NADH é de 0,52 V vs. Ag/AgCl em pH 7; entretanto, sua oxidação em eletrodo de carbono vítreo na ausência de uma molécula mediadora exibe um sobrepotencial de aproximadamente 1,1 V [130]. Este comportamento bastante conhecido é o motivo que limita a utilização de enzimas desidrogenases NAD^+ -dependentes em sistemas não mediados, para biocélulas a combustível enzimáticas.

Nesse contexto, a utilização de compostos que catalisem a reação de oxidação da espécie NADH em sobrepotenciais bastante inferiores a 1,1 V permite um ganho de energia bastante significativo, tornando possível a aplicação de enzimas NAD^+ -dependentes em sistemas tais como fontes de energia (**Figura 50**). O critério de avaliação do desempenho de um eletrocatalisador da espécie NADH geralmente envolve os seguintes parâmetros: potencial redox formal (que define o sobrepotencial de oxidação do cofator), a taxa da reação eletrocatalítica e, a estabilidade em condições de operação [5].

Figura 50: Representação esquemática do processo de regeneração da espécie NAD^+ .

Num sistema mediado, desse tipo, duas possibilidades de utilização destes eletrocatalisadores são possíveis: de forma homogênea (em solução) ou imobilizados na superfície do eletrodo. No primeiro caso, o fato de se ter uma espécie de mediador livre em solução, concomitante com as espécies de coenzima não apresenta poder de aplicação para construção prática de um eletrodo, logo, a utilização de mediadores na forma homogênea é geralmente preterida em relação à imobilizada [5].

Neste trabalho, optou-se pelo processo de eletropolimerização dos eletrocatalisadores da espécie NADH em superfícies de carbono, obtendo-se, assim, um sistema no qual as espécies de coenzima reduzidas necessitam difundir (carregando consigo os elétrons gerados na reação catalítica) até à superfície do eletrodo para então reagir com o eletrocatalisador e transferir os elétrons aos substratos de carbono. A razão da utilização de eletrocatalisadores que contém grupamentos azina na forma de filme polimérico se origina da observação que seu potencial redox formal é bastante superior à sua forma monomérica, fato este que melhora bastante sua atividade eletrocatalítica [5].

Dos chamados “mediadores de NADH ” encontrados na literatura, neste trabalho foi testada a eletropolimerização dos seguintes compostos: verde de metileno, azul de metileno, azul de toluidina, e azul básico. A **Figura 51** apresenta os voltamogramas cíclicos representativos registrados durante a eletropolimerização do corante verde de metileno em

tecido de carbono. O crescimento do filme polimérico de poli(verde de metileno) pode ser observado pelo aumento nos picos redox III e III', referentes à formação do polímero, além do decréscimo dos picos redox do monômero de verde de metileno (I, II e II') [131].

Figura 51: Voltamogramas cíclicos registrados durante o processo de eletropolimerização do corante verde de metileno ($4 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em eletrodo de tecido de carbono a 50 mV s^{-1} no intervalo de -0,3 a 1,3 V vs. ECS, em meio de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de sódio e $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio.

Posteriormente, foram realizados, também, testes em função do número de ciclos voltamétricos, entre 5 e 25 ciclos. Os resultados mostraram que a partir de 10 ciclos, já se observa visualmente a formação do filme do eletrocatalisador. Por meio dos resultados eletroquímicos de voltametria cíclica e potência, observou-se que filmes mais espessos promovem maior resistência ao sistema e conseqüentemente, pior resultado. Deste modo, todos os filmes de eletrocatalisador foram preparados por meio da eletropolimerização de 12 ciclos voltamétricos.

4.1.3.2. Caracterização eletroquímica da espécie NAD^+

A caracterização eletroquímica da espécie NAD^+ foi realizada utilizando-se a técnica de voltametria cíclica, por meio da qual se torna possível à determinação do potencial redox da coenzima. A **Figura 52** apresenta os perfis voltamétricos obtidos na caracterização eletroquímica da espécie NAD^+ com os diferentes filmes de eletrocatalisadores eletropolimerizados em eletrodo de carbono vítreo, em meio de tampão fosfato pH 7,2, $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , na faixa de -0,4 a 0,4 V vs. ECS a 50 mV s^{-1} .

Figura 52: Perfil voltamétrico obtido com os diferentes eletrocatalisadores da espécie NAD^+ , em meio de tampão fosfato pH 7,2, $1,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NAD^+ , na faixa de -0,4 a 0,4 V vs. ECS a 50 mV s^{-1} .

Os dados da **Figura 52** mostram que a regeneração da espécie NADH ocorre em potencial bastante inferior com o corante verde de metileno, o qual indica um potencial de oxidação em torno de 0,050 V vs. ECS. A seguir, os corantes azul de metileno e azul de

toluidina apresentaram potenciais de oxidação em torno de 0,26 e 0,35 V *vs.* ECS, respectivamente. Já com o corante azul básico, não se observou picos definidos da coenzima.

Apesar de ser um indicativo da eficiência de cada eletrocatalisador testado (uma vez que menor potencial indica maior facilidade de ocorrência de uma reação), o potencial de oxidação da espécie NADH deve ser considerado de forma concomitante com outros parâmetros de desempenho e uma biocélula a combustível enzimática, tais como o potencial de circuito aberto, potência, além da estabilidade do filme preparado; para então ser possível, uma melhor avaliação de cada eletrocatalisador testado.

Para avaliar possíveis diferenças quanto ao fluxo das espécies NAD^+/NADH através dos diferentes filmes de eletrocatalisador testados, foram realizados também experimentos de voltametria cíclica em função da velocidade de varredura. Entretanto, os resultados desses ensaios não indicaram diferença significativa com os diferentes compostos testados e por isso não são apresentados.

4.1.3.3. Caracterização do filme de eletrocatalisador de NADH

Os filmes de eletrocatalisadores de NADH foram caracterizados pela técnica de MEV, por meio da qual foi possível examinar a morfologia superficial destes filmes, ou seja, sua microestrutura. Essa análise foi realizada com eletrodos recém-preparados sem qualquer contato prévio com solução. A **Figura 53** apresenta as micrografias dos filmes de verde de metileno em suporte de carbono em diversas ordens de aumento. De modo geral, as imagens demonstram a formação de um filme uniforme e densamente formado na estrutura fibrosa do suporte de carbono utilizado, confirmando a eficácia da técnica de eletropolimerização empregada na preparação dos eletrocatalisadores testados.

Figura 53: Imagens de MEV obtidas com o filme de verde de metileno em suporte de carbono em diferentes ordens de aumento. (A) Vista superior com 250 x de aumento. (B) Vista frontal com 2000 x de aumento. (C) Vista superior com 3000 x de aumento. (D) Vista frontal com 5000 x de aumento.

4.1.4. Caracterização dos bioanodos preparados pela metodologia de adsorção passiva

4.1.4.1. Caracterização por MEV dos bioanodos preparados

A principal preocupação para a escolha de um material para atuar como suporte de um eletrodo é geralmente baseada na condutividade elétrica e na durabilidade do mesmo. Nesse sentido, os materiais eletródicos geralmente empregados para a preparação de bioeletrodos são: ouro, platina, além de vários materiais de carbono (papel, pasta, vítreo, fibra, nanotubo etc). Com base em fatores como porosidade, resistência, condutividade e relativo baixo custo, dois suportes de carbono foram escolhidos neste trabalho para a preparação de bioanodos para testes de potência e estabilidade: o papel e o tecido de carbono contendo uma camada de difusão gasosa composta basicamente de teflon e carbono vulcan. A **Figura 54** apresenta imagens de MEV obtidas com ambos os suportes utilizados, nas quais se observa elevada uniformidade e grande porosidade das fibras de carbono no papel (**Figura 54 A e B**) e no tecido (**Figura 54 C e D**). Acrescenta-se ainda, que a camada difusora presente na superfície do tecido de carbono utilizado (**Figura 54 C e D**) proporciona melhor aderência e maior porosidade que auxilia nos processos difusionais que ocorrem no sistema enzima/dendrímero.

Figura 54: Imagens de MEV obtidas com ambos os suportes de carbono utilizados nos testes de potência e estabilidade em diferentes ordens de aumento. Papel de carbono em vista frontal com 250 x de aumento (A) e 5000 x de aumento (B). Tecido de carbono em vista frontal com 250 x de aumento (C) e 500 x de aumento (D).

Na **Figura 55** são apresentadas as imagens de MEV obtidas com o bioanodo preparado pela metodologia de adsorção passiva utilizando o dendrímero PAMAM. Comparando-se as imagens apresentadas na **Figura 54 A** e **Figura 55 A e B**, tem-se a confirmação da formação de um filme contendo as enzimas e dendrímeros com bom preenchimento entre as fibras de carbono. Além disso, as imagens da **Figura 55 C e D** indicam a obtenção de um filme polimérico com razoável homogeneidade e elevado grau de recobrimento, respectivamente.

Uma possível estimativa da espessura do filme formado torna-se bastante difícil com a técnica utilizada devido à grande variação em espessura do filme observada ao longo da área analisada.

Figura 55: Imagens de MEV obtidas com os bioanodos preparados pela metodologia de adsorção passiva em diferentes ordens de aumento. (A) Vista frontal com 250 x de aumento. (B) Vista superior com 250 x de aumento. (C) Vista frontal com 5000 x de aumento. (D) Vista superior com 5000 x de aumento.

4.1.4.2. Testes de semi-célula etanol/ O_2

O parâmetro mais comum utilizado para avaliar e comparar diferentes trabalhos na literatura em células a combustível é a densidade de potência [5]. Este parâmetro é obtido a partir de uma curva de polarização, e determina de forma direta o desempenho de um sistema que visa à produção de energia. Uma curva de polarização é um gráfico de potencial em função da corrente produzida por uma célula a combustível em várias cargas elétricas, que pode ser obtida tanto por ensaios com controle potencioestático como galvanostático. Uma típica curva de polarização obtida em estudos de célula a combustível é representada na **Figura 56**.

Figura 56: Representação esquemática de uma curva de polarização obtida em testes de potência em células a combustível.

As curvas de polarização podem ser realizadas tanto para testes de célula completa, quando de semi-célula, e as respectivas curvas de potência são obtidas pela simples multiplicação dos valores obtidos de potencial e corrente. Nesse contexto, as curvas de potência são utilizadas para indicar a potência máxima de uma célula a combustível, enquanto

as curvas de polarização são utilizadas para melhor entender as limitações de uma célula a combustível. Geralmente, a primeira queda do potencial em função da corrente está associada ao sobrepotencial de ativação; a segunda queda, associada à queda ôhmica; e a terceira queda, associada ao transporte de massa [23]. Em baixas correntes, perdas por transferência de carga são dominantes, que surgem da barreira energética para se transferir carga entre mediador ou enzima até o eletrodo; essa perda pode ser diminuída pela melhoria do processo catalítico em questão, tais como aumento de área superficial, e condições de reação [23].

Perdas de queda ôhmica geralmente estão relacionadas ao transporte de carga através dos diferentes componentes da célula, envolvendo tanto resistências iônicas quanto eletrônicas. Maior eficiência nesses processos com o objetivo de diminuir tais perdas está geralmente relacionada a melhorias de transporte através da membrana, além de maior condutividade no meio reacional (sempre considerando que enzimas podem sofrer perda catalítica em elevadas concentrações de sais) [23].

A terceira perda, associada a processos de transporte de massa, é geralmente predominante em elevadas densidades de corrente, e é muitas vezes diminuída com constante agitação e facilitação para entrada de O_2 no lado catódico. Nesse sentido, a maximização da densidade de potência está intrinsicamente associada a todos os fatores mencionados, que irão de forma direta influenciar no desempenho global de uma biocélula a combustível enzimática [23].

Outro parâmetro de grande importância em estudos de biocélula a combustível é o PCA (corrente = 0). O PCA fornece um indicativo da voltagem ou energia máxima associada a um sistema de célula a combustível [132]. Este potencial está diretamente relacionado à diferença entre os potenciais das espécies oxidante e redutoras, além dos aceptores iniciais e finais de elétrons. Em estudos de biocélula a combustível, tal parâmetro será influenciado pelo potencial redox dos sítios ativos, além da espécie mediadora.

Sistema mono-enzimático

- Testes de semi-célula em função da quantidade de enzima

Inicialmente, os testes de potência foram realizados com o sistema mono-enzimático, imobilizando apenas a enzima ADH e utilizando como eletrocatalisador da espécie NADH o corante verde de metileno; para tal, os ensaios foram realizados com bioanodos contendo de 1,4 a 200 U de ADH. A **Figura 57** apresenta as curvas de densidade de potência em função da quantidade de enzima imobilizada no bioanodo. Os resultados mostram que acima de 28 U de ADH a densidade de potência diminui; por isso, são apresentados apenas os dados referentes aos bioanodos preparados com quantidades inferiores a 28 U. Tal fato pode ser compreendido considerando-se que todos os processos difusionais no bioanodo tendem a diminuir com elevadas quantidades de enzima: transferência de elétrons, difusão da espécie NAD^+ , além da chegada do substrato ao sítio ativo da enzima são menos efetivos nesta situação.

Figura 57: Curvas de densidade de potência em função da quantidade de enzima imobilizada nos bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH em tecido de carbono.

As curvas de densidade de potência da **Figura 57** indicam uma estreita relação entre a quantidade de enzima ancorada com os valores de potência, sendo que um aumento na

quantidade de enzima leva a um aumento proporcional na densidade de potência obtida. Os valores de densidade de potência variaram de 0,04 a 0,28 mW cm⁻². O valor máximo de potência foi obtido com o bioanodo preparado com 28 U ADH, que forneceu um valor de potência de 0,28 mW cm⁻² em 0,3 V.

Uma comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com aqueles relatados na literatura (**Tabela 5**), pode-se inferir que a metodologia com os dendrímero PAMAM é capaz de gerar valores de densidade de potência bastante satisfatórios [10]. Comparativamente a uma metodologia estabelecida, uma biocélula a combustível etanol/O₂ na qual se utilizou a membrana Nafion[®]-modificada proporcionou uma densidade de potência de 0,12 mW cm⁻² em sistema mono-enzimático apenas com enzima ADH [111]. Além disso, esses resultados são confirmados quando se comparam os dados obtidos com a literatura empregando outros sistemas enzimáticos. Estudos recentes de biocélulas a combustível utilizando-se frutose, lactato e glicose/O₂, por exemplo, mostram valores de densidade de potência da ordem de 0,12, 0,14, e 0,15 mW cm⁻², respectivamente [133-135].

Antes de cada experimento de voltametria, os bioanodos foram mantidos em solução por 1 hora para medidas de PCA. Os valores de PCA assim como os de densidade de potência e corrente máxima obtidos para os diferentes bioanodos em função da quantidade de ADH, demonstram que há uma estreita relação entre a quantidade de enzima com os valores de PCA. Um aumento na quantidade de enzima leva a um aumento nos valores de PCA, densidade de corrente máxima e potência máxima. Os valores variaram de 520 mV, 0,18 mA cm⁻², e 0,04 mW cm⁻² para o bioanodo com 1,4 U de ADH, até 720 mV, 0,88 mA cm⁻², e 0,28 mW cm⁻² para o bioanodo com 28 U de ADH. Acrescenta-se ainda que, após cada varredura linear, os valores de PCA foram restituídos espontaneamente em cerca de 7 min, demonstrando a reversibilidade e estabilidade do bioanodos preparados.

Tabela 5: Resumo de alguns importantes trabalhos publicados na literatura em biocélulas a combustível nos últimos anos

Metodologia de imobilização	Substrato	Sistema enzimático	Potência / mW cm ⁻²	Referência
Membrana Nafion-modificada	Etanol/ O ₂	ADH/ bilirrubina oxidase	0,46	Topcagic e Minteer [109]
Matriz de sílica sol-gel / nanotubos de carbono	Glicose/O ₂	GOx / bilirrubina oxidase	0,12	Lim <i>et al.</i> [66]
Quitosana modificada	Glicose	Glicose desidrogenase	0,035	Klotzbach <i>et al.</i> [136]
Glutaraldeído	Etanol	PQQ-ADH	0,0015	Ramanavicius <i>et al.</i> [110]
Membrana Nafion-modificada	Etanol	Enzimas desidrogenase em cascata	1,01	Sokic-Lazic e Minteer [49]
Filme de polipirrol	Glicose/O ₂	Glicose desidrogenase / lacase	0,042	Habrioux <i>et al.</i> [137]
Membrana Nafion-modificada	Piruvato	Enzimas desidrogenase em cascata	0,93	Sokic-Lazic e Minteer [111]
Sal ácido de poliacrílico	Glicose/O ₂	Glicose desidrogenase/ bilirrubina oxidase	1,45	Sakai <i>et al.</i> [47]
Polímero condutor copolimerizado com 3-metiltiofeno	Glicose/O ₂	GOx / bilirrubina oxidase	0,15	Kuwahara <i>et al.</i> [135]
Celulose em matriz de nanotubos de carbono	Frutose/ O ₂	D-frutose desidrogenase/ bilirrubina oxidase	0,12	Wu <i>et al.</i> , 2009 [133]
eletrodo “Ketjenblack”	Glicose	Glucose desidrogenase	0,052	Miyake <i>et al.</i> [138]
Pirroquinolina em eletrodo de ouro	Lactato	Lactato desidrogenase	0,14	Lee <i>et al.</i> [134]
Nanopartículas de silicone	Glicose	Glicose desidrogenase	0,0037	Choi <i>et al.</i> [139]
Dendrímero PAMAM	Etanol	ADH	0,28	Forti <i>et al.</i> [140]

- Testes de semi-célula em função do suporte utilizado

Para avaliar a influência do substrato utilizado como suporte para imobilização das enzimas, foram realizados testes de potência com dois suportes de carbono distintos, o papel de carbono e o tecido de carbono. Para tal, os bioanodos foram preparados pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH. (Figura 58).

Figura 58: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH.

A partir dos resultados obtidos, fica claro que o tecido de carbono contendo a camada difusora proporciona significativa melhora no desempenho dos bioanodos avaliados. De fato, o bioanodo preparado em tecido de carbono é capaz de gerar quase o dobro de potencia em relação ao suporte de papel de carbono. A presença da camada difusora no tecido de carbono deve, em muito, justificar o comportamento obtido; além de proporcionar maior área superficial ao sistema enzima/dendrímero, essa camada hidrofóbica facilita bastante os

processos difusionais na superfície do eletrodo e, conseqüentemente tende a facilitar os processos de transferência de massa através do eletrodo, gerando maiores valores de densidade de corrente. Além disso, tal suporte apresentou estabilidade mecânica muito superior ao papel de carbono durante todos os ensaios de potência e, por isso, foi escolhido para ser utilizado nos subseqüentes ensaios de potência.

- Testes de semi-célula em função do eletrocatalisador de NAD^+

Para avaliar o desempenho dos diferentes eletrocatalisadores da espécie NADH em testes de semi-célula, foram realizados testes com os bioanodos recém-preparados com os diferentes eletrocatalisadores polimerizados na superfície de tecido de carbono. A **Figura 59** apresenta as respectivas curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados com 28 U ADH.

Figura 59: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados com os diferentes eletrocatalisadores de NAD^+ pelo método de adsorção passiva utilizando tecido de carbono como suporte, mantendo-se a quantidade de enzima em 28 U de ADH.

A partir dos valores de densidade de potência obtidos, observa-se que o perfil de desempenho dos bioanodos com os diferentes eletrocatalisadores de NADH segue comportamento bastante semelhante aos dados de caracterização eletroquímica, de modo que os eletrocatalisadores com menor sobrepotencial para regeneração da coenzima proporcionam melhor desempenho em termos de corrente produzida e consequentemente densidade de potência. O valor máximo de potência foi obtido com o bioanodo preparado com o corante verde de metileno, que forneceu um valor de potência de $0,28 \text{ mW cm}^{-2}$.

Sistema enzimático duplo

- Testes de semi-célula com ambas as enzimas ADH e AldDH

Outra possibilidade de se aumentar a atividade catalítica dos bioanodos em biocélulas a combustível enzimática é a imobilização de mais de uma enzima no mesmo sistema empregado, com consequente aproveitamento de outros elétrons provindos das novas reações catalisadas. No caso das biocélula etanol/ O_2 , é esperado que a energia do sistema aumente com a imobilização concomitante da enzima que catalisa a segunda etapa de oxidação do combustível (o acetaldeído); ou seja, por meio da imobilização de ambas as enzimas ADH e AldDH na superfície do bioanodo, espera-se o aproveitamento de 4, num total de 12 elétron produzidos pela oxidação completa do etanol. A **Figura 60** apresenta as curvas de densidade de potência obtidas nos ensaios com os bioanodos recém-preparados em sistema enzimático duplo pelo processo de adsorção passiva.

Figura 60: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva em sistema enzimático duplo em tecido de carbono, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH.

Nos experimentos bi enzimáticos foram mantidas as mesmas condições de ensaio dos estudos iniciais, ou seja, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH em suporte de tecido de carbono; a peculiaridade nesses testes foi a necessidade de se adicionar íons K^+ e tióis na solução combustível, para que a enzima AldDH pudesse apresentar atividade.

A partir das curvas de potência obtidas (**Figura 60**), os valores máximos de densidade de corrente e potência alcançados com os sistemas mono e bi enzimático foram respectivamente $0,28 \text{ mW cm}^{-2}$ e $0,90 \text{ mA cm}^{-2}$, $0,31 \text{ mW cm}^{-2}$ e $1,03 \text{ mA cm}^{-2}$. Como notado, o comportamento esperado do sistema com ambas as enzimas imobilizadas não gerou os valores de densidade de potência esperado, ou seja, o dobro de potência (esperada no caso da conversão de etanol a acetato que produz quatro elétrons). Esses resultados indicam que o pequeno aumento proporcionado pela adição de uma segunda enzima (pouco mais de 10 %) pode estar relacionado tanto com fatores de ordem cinética (tais como maior dificuldade de chegada de substrato e obstruções estéricas) quanto pela baixa atividade da enzima AldDH quando imobilizada em superfície de carbono. Além disso, não foram avaliados possíveis processos de inibição da enzima ADH provocados pela presença de íons K^+ e tióis, que possivelmente podem ser responsáveis por menor atividade no eletrodo. Considerando os resultados obtidos, além do maior custo da enzima AldDH, o benefício da adição de uma segunda enzima ao sistema aparentemente não apresentou a produção de energia esperada.

4.1.4.3. Testes de estabilidade dos bioanodos

Na tentativa de avaliar a estabilidade dos bioanodos preparados, foram feitas medidas de densidade de potência em um período de 90 dias, utilizando-se a mesma amostra de bioanodo preparado com 28 U de ADH (baseado nos testes de potência nos quais esse eletrodo apresentou maior atividade) imobilizadas na superfície do eletrodo com dendrímero PAMAM pelo método de adsorção passiva. As curvas de polarização foram feitas em triplicata, e os eletrodos foram mantidos refrigerados em solução tampão por um período de pelo menos 1 semana antes de outro teste. A **Figura 61** ilustra as curvas de densidade de potência em função do tempo de armazenamento.

Figura 61: Curvas de densidade de potência em função do tempo de armazenamento dos bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH e tecido de carbono como suporte.

A partir dos resultados da **Figura 61**, pode-se inferir que os bioanodos preparados apresentaram uma sensível diminuição durante o período investigado. Esses resultados

sugerem que o bioanodo apresenta estabilidade bastante satisfatória, uma vez que não é observada variação significativa na densidade de potência durante os testes realizados. Esses dados também indicam que o método de imobilização utilizado se mostra bastante efetivo, sendo o dendrímero PAMAM um bom ambiente para ancoragem de enzimas, no qual a mesma exibe boa atividade e estabilidade.

Para avaliar a estabilidade dos bioanodos preparados em experimentos de cronoamperometria, foram realizados experimentos aplicando-se 0,3 V (próximo ao potencial de oxidação da espécie NAD^+) durante 14 h. Utilizando a mesma célula dos experimentos de voltametria (porém, agora empregando um sistema fechado) e o mesmo bioanodo com 28 U de ADH ancorada, não foi observada variação significativa nas curvas de densidade de potência após o período do ensaio, o que demonstra satisfatória estabilidade do bioanodo também em testes de cronoamperometria.

Figura 62: Curvas de densidade de potência em experimentos de cronoamperometria com o bioanodo preparado pelo método de adsorção passiva com 28 U de ADH, utilizando o corante verde de metileno como eletrocatalisador da espécie NADH e tecido de carbono como suporte.

Conclusões parciais

Baseado nos testes de cinética enzimática com a enzima imobilizada via adsorção passiva, além dos testes de semi-célula e estabilidade, pode-se inferir que o dendrímero PAMAM, se mostra bastante atrativo na preparação de bioanodos para biocélula a combustível enzimática. Os experimentos de cinética enzimática mostraram que a escolha da metodologia de imobilização é fundamental para bons resultados de célula, uma vez que a diminuição de atividade após a imobilização é bastante significativa. Além disso, o bioanodo preparado permaneceu estável e capaz de gerar elevados valores de densidade de potência comparados a outros métodos de imobilização. Os resultados de densidade de potência dos estudos de semi-célula apresentaram um máximo de eficiência utilizando como eletrocatalisador de NAD^+ o corante verde metileno em tecido de carbono com 28 U de ADH; nessas condições, uma densidade de potência de $0,28 \text{ mW cm}^{-2}$ e um PCA de 0,72 V foram obtidos [140].

4.1.5. Testes de semi-célula etanol/O₂ com os bioanodos preparados pela metodologia de automontagem

4.1.5.1. Sistema mono-enzimático

- Testes de semi-célula em função do número de bicamadas

Inicialmente, os ensaios de potência com os bioanodos recém-preparados foram realizados em sistema mono-enzimático, em função da quantidade de enzima ADH de 3 a 36 bicamadas. As curvas de polarização em função da quantidade de bicamadas são apresentadas na **Figura 63A**. Similar aos resultados obtidos com os bioanodos preparados pela metodologia de adsorção passiva fica claro que tanto a densidade de corrente quanto o valor de potência aumenta conforme o número de bicamadas é aumentado na superfície do bioeletrodo (ou seja, maior quantidade de enzimas), como mostrado em detalhe na **Figura 63B**; observa-se ainda, que acima de 12 bicamadas já ocorre a formação de um patamar.

Figura 63: Curvas de densidade de potência dos bioanodos preparados pelo método de automontagem em função do número de bicamadas em sistema mono-enzimático (A); além da densidade de potência máxima em função da quantidade de enzima (B).

Além dos valores de densidade de potência, que variaram na faixa de 0,02 a 0,06 mW cm⁻², antes de cada experimento de voltametria linear, os bioanodos foram mantidos na

célula eletroquímica por 1 hora para medidas de PCA; os resultados indicaram valores de PCA de 0,52 a 0,63 V, os quais são comparáveis com vários trabalhos recentemente publicados na literatura em biocélulas a combustível enzimáticas [8, 10, 12, 62, 141].

Apesar dos valores máximos de densidade de potência obtidos com os bioanodos preparados pela metodologia de automontagem serem, sensivelmente, inferiores aos dados obtidos com os bioanodos preparados pela metodologia de adsorção passiva (isto é, 0,06 contra 0,125 mW cm⁻² considerando os resultados com o mesmo suporte de carbono), a quantidade bastante inferior de enzima adicionada aos bioanodos preparados pela metodologia de automontagem (cerca de 25 vezes menos, considerando as amostras com maior quantidade de enzima em ambos os casos) acaba sendo um grande atrativo do ponto de vista tecnológico.

- Testes de semi-célula com bioanodos contendo uma camada de difusão gasosa

Além da maior quantidade de enzima empregada na preparação dos bioanodos via adsorção passiva, outro fator que implica em significativa melhora no desempenho dos bioanodos, nesse caso, é o tipo de suporte de carbono utilizado, ou seja, o tecido de carbono contendo uma camada de difusão gasosa. De fato, a presença dessa camada de difusão é responsável por proporcionar sensível aumento na área superficial do bioeletrodo, levando a uma melhora nos processos difusionais e, portanto torna mais eficiente a condução dos elétrons através do sistema. Pelo fato de se utilizar enzimas NAD^+ -dependentes e, conseqüentemente, uma camada do corante verde de metileno como eletrocatalisador para regeneração destas espécies antes da imobilização das enzimas, o suporte de tecido de carbono contendo a camada difusora tende a favorecer a formação de um filme mais denso e compacto, que pode também favorecer um melhor desempenho.

A escolha do material a ser utilizado como suporte de carbono nessa etapa foi feita considerando a hidrofiliabilidade requerida pelo processo de automontagem. Apesar das boas características do suporte comercial contendo uma camada de difusão gasosa, tal característica o torna bastante hidrofóbico o que inviabiliza a utilização deste material em processo de automontagem. Desse modo, para confirmar a importância da camada de difusão gasosa no desempenho dos bioanodos preparados via automontagem, foram preparadas amostras do suporte de carbono utilizado (papel de carbono) com uma camada de difusão gasosa preparada em nosso laboratório.

Para este propósito, a camada de difusão foi especificamente preparada com baixo teor de Teflon[®], a fim de fornecer um suporte com hidrofiliabilidade suficiente e evitar possível interferência no processo de automontagem. A **Figura 64** apresenta as curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos recém-preparados na presença e na ausência da camada de difusão gasosa, com 36 bicamadas de enzima ADH.

Figura 64: Curvas de densidade de potência dos bioanodos preparados pelo método de automontagem com 36 bicamadas em sistema mono-enzimático, na presença e na ausência da camada de difusão gasosa.

A partir das curvas obtidas, os resultados apontam para uma sensível melhora no desempenho dos bioanodos na presença da camada de difusão gasosa, onde se observa um máximo de densidade de potência na ordem de 0,08 mWcm⁻². Apesar da melhora observada na presença da camada hidrofóbica, os testes revelaram que a mesma não se mostrou mecanicamente estável durante os ensaios, e por isso, sua aplicação na preparação de bioanodos via automontagem ainda requer maior estudo.

4.1.5.2. Sistema enzimático duplo

- Testes de semi-célula em sistema enzimático duplo

De modo similar aos testes realizados com os bioanodos preparados via adsorção passiva, foram realizados também testes em sistema enzimático duplo com bioanodos preparados pela metodologia de automontagem, por meio da imobilização concomitante de ambas as enzimas ADH e AldDH na superfície do bioanodo. A preparação do bioanodo nesta etapa foi realizada via automontagem de duas diferentes maneiras. Uma primeira amostra, chamada de A1, foi preparada pela imersão do substrato de carbono na solução policationica (PAMAM) e posteriormente na solução polianiônica (contendo uma mistura das enzimas ADH e AldDH), de modo que a arquitetura final do bioanodo segue a seguinte sequência: ADH + AldDH / PAMAM. Uma segunda amostra, chamada de A2, foi preparada pela imobilização das duas enzimas desidrogenases em camadas separadas na estrutura do bioanodo, de modo que a estrutura final do bioanodo segue a seguinte sequência: ADH / PAMAM / AldDH.

A **Figura 65** apresenta as curvas de densidade de potência obtidas com ambas as amostras preparadas, A1 e A2, contendo 36 bicamadas, mantendo a mesma quantidade de enzima em ambos os casos.

Figura 65: Curvas de densidade de potência dos bioanodos preparados pelo método de automontagem com 36 bicamadas em sistema enzimático duplo.

Os resultados mostram que a amostra do bioanodo contendo a mistura das enzimas ADH e AldDH (A1) na camada polianiônica gerou uma densidade de potência na ordem de 0,072 mW cm⁻²; ao passo que, a amostra de bioanodo contendo as enzimas em camadas separadas (A2) foi capaz de gerar uma densidade de potência da ordem de 0,11 mW cm⁻². É esperado, que a incorporação da enzima que catalisa a segunda etapa do metabolismo do etanol à estrutura do bioanodo aumente em duas vezes a densidade de potência do sistema (uma vez que mais dois elétrons estão sendo gerados pelo sistema); entretanto, tal comportamento foi observado apenas com a amostra A2. No caso da amostra A1, somente um pequeno aumento na densidade de potência foi observado.

Estes resultados indicam que o processo difusional através do bioanodo A2 é, provavelmente, facilitado por uma estrutura de camadas de enzimas intercaladas. Acrescenta-se ainda, que as moléculas de acetaldeído difundindo de uma camada de enzima para outra possam também aumentar a cinética do processo.

Conclusões parciais

O processo de imobilização de enzimas via automontagem em suporte de carbono proposto para preparação de bioanodos em biocélulas a combustível etanol/O₂ se mostrou capaz de produzir bioeletrodos que demonstram valores de densidade de potência comparáveis com vários trabalhos recentemente publicados na literatura. Embora os resultados tenham mostrado um melhor desempenho dos bioanodos na presença de uma camada de difusão gasosa, a mesma não se mostrou mecanicamente estável durante os ensaios de potência; desta maneira, melhorias no processo de preparação do bioanodo que envolvem tanto o suporte utilizado quanto a camada de difusão gasosa necessitam serem mais bem investigados.

Os resultados mostraram também que a densidade de corrente e potência são aumentadas com a imobilização de múltiplas enzimas na superfície do bioanodo. Nesse cenário, os valores máximos de densidade de potência obtidos foram respectivamente 0,063 mW cm⁻² com o sistema mono-enzimático e 0.12 mW cm⁻² com o sistema empregando ambas as enzimas ADH e AldDH.

Finalmente, sabe-se da fundamental importância de uma metodologia eficiente para a preparação de bioeletrodos no desenvolvimento das biocélulas a combustível enzimáticas. A utilização de enzimas imobilizadas para este e outros tipos de aplicações, tem sido limitada por diversos fatores, tais como o elevado custo, baixa estabilidade, e pouca disponibilidade das enzimas. Nesse contexto, a utilização da técnica de automontagem se mostra bastante atrativa na imobilização de enzimas, com grande potencial para sua aplicação na preparação de bioeletrodos com maior controle da disposição de enzimas na superfície do bioanodo, assim como menor consumo de enzimas [142].

Parte 2

4.2. Transferência eletrônica direta

4.2.1. Crescimento da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 e caracterização das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH

- Crescimento da bactéria *Gluconobacter* sp. 33

Dentre os diversos parâmetros que influenciam diretamente no crescimento da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 (tais como pH, temperatura, e quantidade de glicose, os quais se encontram na literatura em condições já otimizadas), a quantidade de oxigênio presente no meio de crescimento foi um dos fatores que afetaram bastante o crescimento da bactéria e por isso necessitou de um maior cuidado durante os experimentos realizados. Basicamente, existem duas formas de controle do crescimento da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 no meio reacional utilizado. O primeiro método se baseia na medida da densidade óptica do meio de crescimento, de modo que uma maior densidade óptica indica um maior crescimento da mesma. O segundo parâmetro utilizado como controle do crescimento da bactéria foi a coloração do extrato celular obtido após a etapa de filtração do meio de crescimento, sendo que a coloração característica do extrato bruto contendo as células filtradas (rosa avermelhado) indica se o crescimento está ocorrendo de forma eficiente ou não.

A **Figura 66** apresenta o gráfico com as medidas de densidade óptica dos meios de crescimento em duas diferentes quantidades de oxigênio. No primeiro caso, utilizando uma bomba peristáltica comum; e no segundo caso, empregando ar comprimido, que apresenta aproximadamente 5 vezes maior pressão comparada ao primeiro caso.

Figura 66: Medidas de densidade óptica dos meios de crescimento da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 em função da quantidade de oxigênio empregada.

De modo geral, observou-se que uma maior quantidade de oxigênio (controlada por meio do uso de ar comprimido) proporcionou um maior crescimento da bactéria; ou seja, no período de tempo empregado para o crescimento da bactéria (24 h) tem-se um aumento próximo ao linear da densidade óptica do meio reacional. Geralmente, o que se observa neste tipo de sistema é que o crescimento atinge seu valor ótimo próximo de 1 unidade de absorbância em 600 nm (que normalmente é atingido ao redor de 24 horas). Ressalta-se que acima de 24 horas, o comportamento de crescimento das células sofre grande alteração, com morte de grande parte das células obtidas no início do crescimento. Acrescenta-se ainda, que na segunda situação de crescimento (com maior quantidade de oxigênio) a coloração rosa do extrato bruto contendo as células apresentou-se de forma bastante intensa.

Nas melhores condições de crescimento da bactéria *Gluconobacter* sp. 33, 5,9 g de células foram obtidas a partir de 3 L de meio reacional de D-mannitol.

- Purificação e eletroforese das enzimas PQQ-dependentes

Após a etapa de rompimento da membrana celular, o extrato bruto contendo as enzimas PQQ-dependentes foi concentrado, e a purificação das enzimas PQQ-dependentes foi realizada em duas etapas cromatográficas. Ao final do processo, 2,3 mg de enzimas purificadas foram coletadas contendo uma mistura das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH (**Figura 28**).

Por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, a pureza de ambas as enzimas PQQ-dependentes coletada foi determinada. As bandas correspondentes às três subunidades da enzima PQQ-ADH totalizando 145 kDa (80 kDa, 50 kDa, e 15 kDa) e às duas subunidades da enzima PQQ-AldDH totalizando 141 kDa (86 kDa e 55 kDa) podem ser observadas na **Figura 67**.

No caso da enzima PQQ-ADH, sua maior subunidade (80 kDa) corresponde à quinoproteína contendo um grupamento PQQ e um heme-c; a segunda subunidade (50 kDa) corresponde à 3 grupamentos heme-c; e a terceira subunidade (15 kDa) corresponde aos peptídeos responsáveis pela expressão da enzima ativa [93, 119]. No caso da enzima AldDH, sua maior subunidade (86 kDa) corresponde à parte desidrogenase da enzima, enquanto a menor corresponde aos grupamentos heme-c (55 kDa) [96].

Figura 67: Géis representativos obtidos nos ensaios de eletroforese com a solução de enzimas PQQ-dependentes purificadas após cada etapa cromatográfica.

Por meio da análise da **Figura 67**, fica claro a eficácia do processo de purificação cromatográfico empregado para purificação das enzimas PQQ-dependentes. Comparando-se os géis obtidos após cada etapa cromatográfica, inicialmente, além da confirmação das bandas específicas de cada subunidade das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH, observa-se uma banda bastante complexa obtida com a solução de enzima purificada via cromatografia de troca aniônica; já o gel obtido após a aplicação das enzimas em coluna de exclusão molecular, demonstra um elevado grau de pureza das enzimas obtidas após duas etapas cromatográficas, com bandas “limpas” e bem definidas das proteínas de interesse.

- Caracterização cinética das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH

As enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH catalisam vários álcoois e aldeídos primários de cadeia não-ramificada, no caso específico deste trabalho, o interesse é focado na obtenção de um bioanodo para biocélula a combustível etanol/ O_2 capaz de realizar a oxidação deste substrato em duas etapas até acetado; deste modo, a caracterização cinética da solução de enzimas purificadas foi realizada com foco nos dois substratos principais, ou seja, etanol e acetaldeído. A **Figura 68** apresenta o perfil obtido em todos os ensaios espectrofotométricos de cinética enzimática em 600 nm com as enzimas PQQ-dependentes na presença dos aceptores de elétrons DCIP e PMS, dos quais são obtidos os valores de velocidade inicial da reação de conversão de ambos os substratos (etanol ou acetaldeído), determinada por regressão linear durante os primeiros minutos de reação.

Figura 68: Curva de absorvância em função do tempo obtida nos ensaios de atividade enzimática com as enzimas ADH e AldDH em meio de tampão fosfato, pH 7,2.

Como uma forma de avaliar a eficácia do processo de purificação empregado, medidas de atividade com ambas as enzimas foram realizadas desde a etapa de extração até a solução final de enzima purificada.

Considerando as medidas de atividade enzimática realizadas com o extrato bruto, os valores iniciais encontrados foram $5,61 \text{ U mg}^{-1}$ e $2,88 \text{ U mg}^{-1}$ com as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH, respectivamente. Após a primeira etapa cromatográfica, a atividade enzimática sofre um considerável aumento, chegando a valores da ordem de $16,1 \text{ U mg}^{-1}$ e $3,7 \text{ U mg}^{-1}$ com as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH, respectivamente. A solução final de enzima purificada apresentou uma atividade enzimática de $29 \pm 0,5$ e $8 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$ em relação a etanol e acetaldeído, respectivamente. Tal comportamento aponta que ao passo que processo de purificação transcorre, a quantidade total de proteína diminui e consequentemente a atividade específica da solução contendo as enzimas purificadas aumenta.

Para avaliar a estabilidade da solução contendo as enzimas purificadas, medidas de atividade enzimática foram realizadas também em função do tempo de armazenamento das mesmas em duas diferentes condições: mantidas em refrigerador (4°C) e em freezer (-20°C). A **Figura 69** apresenta os gráficos de atividade enzimática utilizando o etanol como substrato em ambas as situações avaliadas.

Figura 69: Gráficos de atividade enzimática utilizando o etanol como substrato, em função do tempo de armazenamento em duas diferentes condições de armazenamento, em meio de tampão fosfato pH = 7,2. (A) = 4°C ; (B) = -20°C .

A partir dos resultados obtidos, fica evidente a maior estabilidade da solução de enzimas purificadas, quando armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com diminuição em torno de 50 % de atividade ao longo de 30 dias. No mesmo período avaliado, a solução de enzimas purificada apresenta a mesma diminuição de atividade enzimática em apenas uma semana, quando mantida a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Com o objetivo de avaliar o comportamento cinético das enzimas PQQ-dependentes em solução, além de determinar as constantes cinéticas de ambas, foram realizados ensaios de cinética enzimática em função da concentração de etanol e acetaldeído. Os experimentos foram realizados variando-se a quantidade de etanol e acetaldeído de 0 a $20 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ e de 0 a $40 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em meio de solução tampão fosfato, pH 7,2. A **Figura 70** apresenta ambos os gráficos de cinética enzimática em função da concentração dos respectivos substratos, além de cada gráfico de duplo recíproco em detalhe.

Figura 70: Cinética enzimática das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH em função da concentração dos respectivos substratos; (A) = etanol; (B) = acetaldeído; além dos respectivos gráficos de duplo recíproco.

A partir dos gráficos obtidos, fica claro que ambas as enzimas PQQ-dependentes purificadas também apresentam comportamento cinético que se encaixa no modelo de

Michaelis-Menten, e por meio dos gráficos de duplo recíproco traçados, os parâmetros cinéticos K_m e $v_{m\acute{a}x}$ foram determinados para ambos os substratos; sendo $0,153 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $28,55 \text{ U mg}^{-1}$ em relação ao etanol, e $3,86 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $8.03 \pm 0.2 \text{ U mg}^{-1}$ em relação ao acetaldeído, respectivamente. Comparando-se os resultados aqui apresentados com valores já descritos na literatura, observa-se que todas as constantes determinadas estão na mesma ordem de grandeza, resultados que confirmam a obtenção das enzimas de interesse com elevado grau de pureza e atividade catalítica [96, 119].

Conclusões parciais

A partir dos resultados obtidos desde o processo de extração e lise das células até a última etapa de purificação das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH obtidas a partir da bactéria *Gluconobacter* sp. 33, pode-se concluir que o processo de obtenção das enzimas PQQ-dependentes de interesse empregado neste trabalho se mostrou bastante eficiente e forneceu uma quantidade razoável de proteínas numa condição de atividade dentro do esperado.

Desse modo, torna-se possível a construção de bioanodos com TED para biocélulas a combustível etanol/O₂ por meio da imobilização de ambas as enzimas purificadas na superfície de um eletrodo, visando à oxidação do substrato com concomitante produção de 4 elétrons oriundos das duas reações catalisadas pelas enzimas PQQ-dependentes PQQ-ADH e PQQ-AldDH.

4.2.2. Caracterização eletroquímica do sistema de TED

4.2.2.1. Bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada

Em tese, as enzimas PQQ-dependentes podem realizar TED com várias superfícies condutoras, quando imobilizadas numa condição estérica favorável. A literatura mostra trabalhos com TED entre enzimas PQQ-dependentes e diferentes materiais sólidos como ouro, carbono vítreo, filme condutor de polipirrol, além de outras superfícies de carbono [94, 143, 144]. As reações ocorrem tanto diretamente no grupamento PQQ, como através das subunidades contendo grupos heme-c, desta maneira, essas enzimas são capazes de realizar a oxidação de seus substratos e transferir os elétrons diretamente às superfícies eletródicas sem necessidade de moléculas mediadoras [94].

Uma maneira prática e eficiente de obter maiores informações a cerca do comportamento eletroquímico das enzimas PQQ-dependentes imobilizadas em superfícies sólidas é realizar a caracterização destes bioeletrodos por meio da técnica de voltametria cíclica, verificando assim a capacidade de oxidação e transferência eletrônica das enzimas extraídas e purificadas.

Durante o processo da catálise enzimática com as enzimas PQQ-dependentes, o substrato (etanol ou acetaldeído) é oxidado pelo grupo PQQ e os elétrons gerados nessa reação são então transferidos aos grupamentos heme-c e finalmente à superfície do eletrodo [94]; em outras palavras, esse tipo de sistema enzimático pode ser entendido considerando o grupo PQQ como o sítio ativo, enquanto que os grupamentos heme-c atuam como aceptores de elétrons.

- Caracterização eletroquímica na presença e na ausência de MWCNTs

A **Figura 71** apresenta os voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH imobilizadas na presença e na ausência de MWCNTs em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada. O perfil voltamétrico observado na **Figura 71** com picos redox bem definidos (relacionados aos grupamentos heme-c) confirma a ocorrência de TED entre enzimas e a superfície de carbono.

Figura 71: Voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH imobilizadas na presença e na ausência de MWCNTs em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃, 0,1 mol L⁻¹ de etanol, velocidade de varredura = 30 mV s⁻¹.

Os resultados mostram que ambos os bioanodos preparados foram capazes de realizar TED com a superfície de carbono vítreo; ou seja, picos redox bem definidos são

observados na presença e na ausência de MWCNTs. Além disso, um resultado bastante significativo observado na **Figura 71** é que além da esperada maior área superficial, um deslocamento bastante relevante no pico de oxidação é observado com o bioanodo preparado por meio da imobilização das enzimas PQQ-dependentes em conjunto com nanotubos de carbono. De fato, o bioanodo preparado somente por meio da imobilização das enzimas PQQ-dependentes com a membrana de Nafion-modificada apresentou um pico de oxidação ao redor de 220 mV *vs.* ECS, ao passo que com o bioanodo contendo as mesmas enzimas além do nanomaterial de carbono, a mesma reação ocorre ao redor de 40 mV *vs.* ECS.

É esperado que a presença dos MWCNTs na superfície do eletrodo aumente significativamente a área ativa do mesmo (a qual pode ser verificada pelas maiores correntes obtidas com este material) além de proporcionar ao bioeletrodo uma estrutura com maior porosidade que facilita o transporte de substrato/combustível até os sítios catalíticos das enzimas e, sem dúvidas proporcionar maior condutividade eletrônica através da superfície do eletrodo. Além destes fatores mencionados, baseado nos resultados obtidos, a imobilização das enzimas PQQ-dependentes em superfície de carbono com MWCNTs parece diminuir a distância de transferência eletrônica entre as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH e a superfície de carbono vítreo, além de diminuir a distância dos grupos heme-c ao suporte de carbono, facilitando assim o processo de TED e consequentemente diminuindo o potencial de oxidação.

Como já discutido, as enzimas PQQ-dependentes focadas neste trabalho contém diversos grupos heme-c, que permitem às mesmas realizarem TED; tendo em vista tal afirmação, o substancial deslocamento de 180 mV *vs.* ECS observado com o bioanodo preparado com MWCNTs deve estar bastante associado à ligação/interação das biomoléculas com o nanomaterial empregado. Em outras palavras, a melhor orientação das proteínas na

superfície do bioanodo contendo MWCNTs além da provável menor distância entre os aceptores de elétrons são os principais responsáveis pelos resultados obtidos.

Estudos eletroquímicos em função da concentração de substrato (etanol) foram também realizados, na faixa de 0 a $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ no caso dos eletrodos contendo MWCNTs (**Figura 72 A**) e de 0 a $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para os eletrodos preparados apenas pela imobilização das enzimas PQQ-dependentes com a membrana Nafion-modificada (**Figura 72 B**).

Figura 72: Voltamogramas cíclicos representativos em função da concentração de etanol na presença (A) e na ausência de MWCNTs (B) em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃, velocidade de varredura = 30 mV s⁻¹.

O perfil dos voltamogramas cíclicos obtidos nos ensaios em função da concentração de etanol confirma a ocorrência de TED em ambos os casos testados, no sentido de que maiores concentrações de substrato levam a um proporcional aumento no pico de oxidação

com os dois bioanodos avaliados (em detalhe nas **Figura 72 A e B**). Comparando-se os resultados obtidos com a amostra controle, fica claro que as enzimas PQQ-dependentes catalisam a oxidação do etanol, e maiores concentrações de substrato levam a maiores valores de corrente, as quais são proporcionais ao maior número de elétrons transferidos pelos grupamentos heme-c. Acrescenta-se ainda, que a presença de nanotubos de carbono parece aumentar a sensibilidade dos bioeletrodos, uma vez que quantidades similares de etanol resultam em correntes, aproximadamente ,10 vezes maior no caso dos bioanodos preparados pela imobilização conjunta das enzimas com MWCNTs.

- Caracterização eletroquímica das enzimas PQQ-dependentes nas diferentes etapas de purificação

A caracterização eletroquímica foi realizada também ao longo do processo de purificação das enzimas PQQ-dependentes, a fim de avaliar a eficácia do protocolo empregado. A **Figura 73** apresenta os voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos preparados com a solução contendo uma mistura das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH em cada etapa de purificação, os quais foram preparados na presença de MWCNTs em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada na etapa de imobilização das enzimas.

Figura 73: Voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH ao longo do processo de purificação das enzimas, imobilizadas na presença de MWCNTs em eletrodos de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃, 0,1 mol L⁻¹ de etanol, velocidade de varredura = 30 mV s⁻¹.

Baseado nos ensaios de quantificação de proteínas (BCA), a quantidade total de proteína foi mantida constante em todos os eletrodos preparados. Apesar do fato que satisfatória atividade enzimática foi encontrada em todas as etapas de purificação das enzimas PQQ-dependentes (considerando os dados espectrofotométricos de cinética enzimática em relação a etanol e acetaldeído como substratos, isto é, no extrato celular e após as duas etapas cromatográficas, item 4.4.1.); nem todos os bioanodos testados foram capazes de realizar TED. Na verdade, nenhum pico de oxidação foi observado com os bioanodos preparados com as enzimas do extrato bruto. Já com o bioanodo preparado com a solução de enzimas purificadas via cromatografia de troca aniônica, um pico de oxidação bem definido ao redor de 0,060 V *vs.* ECS pode ser visto. No caso do bioanodo preparado com a solução final de enzimas purificadas via duas etapas cromatográficas, observa-se também um pico de oxidação bastante definido em torno de 0,040 V *vs.* ECS.

É esperado que a utilização de uma solução de enzimas com maior grau de pureza leve à obtenção de bioeletrodos com maior quantidade de enzimas PQQ-dependentes ativas na superfície do eletrodo, o que consequentemente proporciona maior atividade eletroquímica do bioanodo preparado. Além disso, os resultados obtidos sugerem que o processo de purificação empregado leva à obtenção de uma mistura de enzimas em um ambiente no qual o processo de TED ocorre com maior facilidade. De modo geral, possíveis interferências de outras proteínas presentes na solução inicial vão sendo eliminadas ao transcorrer do processo de purificação e, consequentemente facilitam o processo de transferência eletrônica entre os grupamentos heme-c e a superfície do eletrodo. Acrescenta-se ainda, que o deslocamento observado no potencial de oxidação com os bioanodos preparados com a solução de enzimas após cada etapa cromatográfica realizada, ao redor de 20 mV *vs.* ECS, também deve ser um indicativo de maior facilidade de ocorrência do processo de TED, com maior corrente catalítica obtida.

4.2.2.2. Bioanodos preparados via automontagem PAMAM/ouro

- Caracterização eletroquímica dos bioanodos preparados via automontagem

A técnica de automontagem é caracterizada por proporcionar maior controle da disposição das enzimas em superfícies sólidas, assim proporcionando maior cinética das enzimas imobilizadas. Levando em consideração tais características com propriedades importantes dos dendrímeros como uniformidade e superfície terminal altamente funcionalizada, torna-se viável a preparação de bioanodos via automontagem para caracterização eletroquímica das enzimas PQQ-dependentes.

Nesse contexto, com o objetivo de facilitar a ocorrência do processo de TED, os bioanodos foram preparados em superfícies de ouro modificadas com DTBA por meio da imobilização das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH em camada intercalada com o dendrímero PAMAM (**Figura 32**). A caracterização eletroquímica dos bioeletrodos recém-preparados foi realizada em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2, 0,5 mol L⁻¹ de nitrato de sódio e 0,1 mol L⁻¹ de etanol. De forma comparativa, a **Figura 74** apresenta o comportamento eletroquímico obtido com os bioanodos preparados pelas duas metodologias testadas nesta etapa do trabalho (utilizando a membrana Nafion-modificada na presença de MWCNTs em eletrodo de carbono vítreo, além da metodologia de automontagem em eletrodo de ouro modificado com DTBA).

Figura 74: Voltamogramas cíclicos representativos obtidos com os bioanodos contendo ambas as enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH, imobilizadas com MWCNTs em eletrodo de carbono vítreo utilizando a membrana Nafion-modificada, e também em eletrodos de ouro modificado com DTBA utilizando o dendrímero PAMAM. Tampão fosfato pH 7,2, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol, velocidade de varredura = 30 mV s^{-1} .

O perfil voltamétrico obtido com o bioanodo preparado pela metodologia de automontagem em eletrodo de ouro modificado com DTBA confirma a ocorrência de TED também com a metodologia de automontagem, no qual se observa um pico de oxidação ao redor de 220 mV vs. ECS . Comparando-se os resultados obtidos no caso do bioanodo preparado pela metodologia de automontagem (apresentados na **Figura 74**) com o voltamograma obtido com o bioanodo preparado pela imobilização das enzimas PQQ-dependentes utilizando a membrana Nafion-modificada sem MWCNTs (**Figura 71**), tem-se um perfil voltamétrico bastante similar, nos quais se observam potenciais redox bastante próximos; tal comportamento, indica que ambas as metodologias proporcionam um ambiente no qual as enzimas PQQ-dependentes são capazes de realizar TED. Além disso, baseado nos

perfis voltamétricos obtidos, tem-se a impressão que o arranjo proporcionado aos grupamentos heme-c das enzimas PQQ-dependentes tanto em superfície de ouro quanto em carbono vítreo não é muito influenciado pela metodologia de imobilização, uma vez que em ambos os casos se observa um pico de oxidação bastante similar.

Em relação aos voltamogramas comparativos da **Figura 74**, deve-se salientar que a corrente capacitiva bastante inferior observada no bioeletrodo preparado via automontagem em superfície de ouro modificada (em relação ao bioeletrodo contendo MWCNTs utilizando a membrana Nafion-modificada) não é apenas devido à ausência do nanomaterial mas também à menor quantidade de enzima imobilizada durante o processo de automontagem. Os resultados obtidos nesse caso confirmam que a presença dos nanotubos de carbono na estrutura do bioeletrodo proporciona um melhor arranjo das enzima/grupamentos heme-c em relação a ambas as situações sem a presença do nanomaterial; e consequentemente apontam para um processo de TED facilitado com o bioeletrodo preparado na presença de MWCNTs.

Efeitos de transferência de massa devem desempenhar um papel importante nos processos que ocorrem dentro do bioeletrodo com maior área superficial, no entanto, a mudança observada no pico de oxidação de aproximadamente 180 mV vs. ECS em relação ao bioanodo preparado via automontagem em superfície de ouro modificada, deve ser considerado o mais importante efeito deste nano material; talvez abrindo uma gama mais ampla de aplicação para bioeletrodos com TED, nos quais se obtém melhor arranjo dos grupos doadores de elétrons tais como os grupos heme-c das enzimas PQQ-dependentes com o nanomaterial de carbono.

Para confirmar o comportamento eletroquímico de TED com os bioanodos preparados pela metodologia de automontagem em eletrodo de ouro modificado com DTBA, foram realizados também ensaios em função da concentração de substrato. A **Figura 75** apresenta os voltamogramas cíclicos representativos obtidos neste ensaio.

Figura 75: Voltamogramas cíclicos representativos em função da concentração de etanol com os bioanodos preparados pela metodologia de automontagem em eletrodo de ouro modificado com DTBA utilizando o dendrímero PAMAM, em meio de tampão fosfato pH = 7,2, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , velocidade de varredura = 30 mV s^{-1} . Em detalhe, os picos de oxidação em aumento, além do gráfico de corrente de pico em função da concentração de substrato.

Por meio do perfil voltamétrico obtido, fica claro que à medida que a concentração de substrato é aumentada, observa-se um aumento quase que proporcional na corrente catalítica do bioanodo; dados que comprovam a ocorrência de TED com o bioeletrodo preparado via automontagem empregando o dendrímero PAMAM em superfície de ouro modificada.

Além de confirmar a eficácia desta metodologia na preparação de bioanodos contendo as enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH com capacidade de realizar TED; os resultados de caracterização eletroquímica utilizando a metodologia de automontagem na construção bioanodos com TED proporciona grandes vantagens como a baixa quantidade de enzima empregada e bom controle do arranjo das mesmas na superfície do eletrodo, características estas que fornecem à este material grande atrativo na obtenção de eletrodos tanto para atuar como biosensor como em biocélula a combustível.

4.2.3. Testes de biocélula etanol/O₂ com TED

Os testes de biocélula etanol/O₂ com TED foram realizados utilizando-se bioanodos estruturados em plataformas de carbono na presença e na ausência de MWCNTs. Os bioanodos foram preparados com ambas as metodologias descritas até aqui (Nafion-modificada e PAMAM) por meio do método de adsorção passiva.

4.2.3.1. Bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada

De modo similar aos estudos de caracterização eletroquímica, foram realizados testes de semi-célula etanol/O₂ com os bioanodos preparados por meio da imobilização das enzimas PQQ-dependentes purificadas após duas etapas cromatográficas via metodologia de adsorção passiva utilizando a membrana Nafion-modificada. A **Figura 76** apresenta as curvas de polarização e densidade de potência obtida com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono.

Figura 76: Curvas de polarização e densidade de potência obtida com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono via metodologia de adsorção passiva utilizando a membrana Nafion-modificada.

De modo similar aos resultados obtidos durante a caracterização eletroquímica (nos quais se observou deslocamento do potencial de oxidação da reação de interesse em aproximadamente 180 mV vs. ECS, além de maior corrente catalítica e capacitiva), os testes de biocélula etanol/O₂ com TED mostram que este processo ocorre com maior facilidade em bioeletrodos estruturados com nanotubos de carbono e proporcionam maiores densidades de potência além de maior PCA. Especificamente, os resultados mostram valores de potencial de circuito da ordem de 0,59 V e 0,69 V e de densidade de potência da ordem de 29,4 e 38,3 $\mu\text{W cm}^{-2}$ com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono, respectivamente.

Em conjunto, os resultados de caracterização eletroquímica e os testes de potência com TED empregando os bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada apontam o melhor desempenho/taxa de transferência eletrônica das enzimas PQQ-dependentes na presença do nanomaterial de carbono; que graças a suas excelentes características de condução e transferência de carga, além de grande área superficial proporcionou melhor distribuição/arranjo das enzimas (grupamentos heme-c) na superfície do eletrodo.

4.2.3.2. Bioanodos preparados com o dendrímero PAMAM

Diferentemente da caracterização eletroquímica das enzimas PQQ-dependentes utilizando o dendrímero PAMAM (realizada em eletrodo de ouro modificado via automontagem), os testes de potência com TED utilizando o dendrímero foram realizados em suporte de carbono via adsorção passiva; tal fato se deve à necessidade de maior quantidade de enzima na superfície do eletrodo além de maior área superficial do suporte utilizado. A **Figura 77** apresenta as curvas de polarização e densidade de potência obtidas nos testes de biocélula etanol/ O_2 com TED utilizando os bioanodos preparados na presença e na ausência de nanotubos de carbono.

Figura 77: Curvas de polarização e densidade de potência obtida com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono via metodologia de adsorção passiva utilizando o dendrímero PAMAM.

De modo semelhante aos resultados dos bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada, os testes de biocélula etanol/ O_2 com TED utilizando os bioanodos preparados com o dendrímero PAMAM mostram o melhor desempenho dos bioeletrodos

estruturados com nanotubos de carbono que proporcionam maiores densidades de potência além de maior PCA. Por meio de análise da **Figura 77**, os resultados mostram valores de potencial de circuito da ordem de 0,58 V e 0,69 V e de densidade de potência da ordem de 19,4 e 24,9 $\mu\text{W cm}^{-2}$ com os bioanodos preparados na ausência e na presença de nanotubos de carbono, respectivamente.

- Testes de biocélula durante a purificação das enzimas PQQ-dependentes

Para avaliar a eficiência do protocolo de extração e purificação empregado, foram realizados também testes de potência em semi-célula etanol/O₂ com os bioanodos preparados com as enzimas PQQ-dependentes, obtidas em cada etapa de purificação (sempre mantendo a quantidade total de proteínas constante, em todos os casos avaliados). A **Tabela 6** resume todos os valores de potenciais de circuito aberto e densidade de potência obtidos nos testes de semi-célula com os bioanodos preparados com as enzimas PQQ-dependentes obtidas em cada etapa de purificação, utilizando ambas as metodologias de imobilização testadas, na ausência de nanotubos de carbono.

Tabela 6: Potenciais de circuito aberto e valores de densidade de potência obtidos nos testes de semi-célula etanol/O₂ com os bioanodos preparados com as enzimas PQQ-dependentes obtidas em cada etapa de purificação utilizando ambas as metodologias de imobilização testadas

Metodologia de imobilização	Extrato		Após cromatografia de troca iônica		Após cromatografia de exclusão molecular	
	PCA (mV)	Potência (μW)	PCA (mV)	Potência (μW)	PCA (mV)	Potência (μW)
Nafion-modificado	521 ± 9	12,0 ± 0,8	540 ± 8	16,6 ± 1,3	597 ± 8	29,4 ± 1,7
PAMAM	508 ± 8	8,1 ± 0,6	522 ± 8	12,2 ± 0,7	584 ± 9	19,4 ± 1,5

Para se alcançar a oxidação completa de combustíveis, muitos trabalhos visam à imobilização de várias enzimas em cascata em superfícies sólidas; nesse sentido, a primeira

consideração que pode ser feita a partir dos dados obtidos é que, em todas as situações, valores de PCA e densidade de potência satisfatórios foram obtidos, quer com a mistura mais complexa de proteínas ou com a solução de enzimas PQQ-dependentes mais purificada. Como esperado, independentemente do método de imobilização empregado, a utilização de uma solução de enzimas mais purificada resulta em maiores densidades de potência gerada. Além disso, ressalta-se que em todos os casos, um desempenho sensivelmente maior é obtido com os bioanodos preparados com a metodologia de imobilização utilizando a membrana Nafion-modificada em relação ao dendrímero PAMAM.

- Testes de potência em função da metodologia de imobilização

A **Figura 78** apresenta as curvas de densidade de potência representativas dos testes de semi-célula etanol/ O_2 obtidas com os bioanodos preparados com a solução final de enzimas purificadas, sendo avaliadas ambas as metodologias de imobilização testadas na presença e na ausência de nanotubos de carbono.

Figura 78: Curvas de densidade de potência obtidas com os bioanodos preparados com a solução final de enzimas PQQ-dependentes purificadas, na presença e na ausência de nanotubos de MWCNTs, utilizando ambas as metodologias de imobilização, membrana Nafion-modificada e dendrímero PAMAM.

Como já mencionado, os valores típicos de densidade de potência fornecidos por biocélulas a combustível enzimáticas estão na faixa de micro a alguns mili watts de potência, que são suficientes para possíveis aplicações em pequenos dispositivos eletrônicos; nesse sentido, considerando os testes de semi-célula etanol/ O_2 com os bioanodos preparados com o dendrímero PAMAM, os valores máximos de densidade de potência obtidos variaram de 19,4 $\mu W\ cm^{-2}$ nos bioanodos preparados na ausência de nanotubos de carbono a 25,7 $\mu W\ cm^{-2}$ com

os bioeletrodos preparados na presença de MWCNTs. De modo similar, nos testes de semi-célula utilizando os bioanodos preparados com a membrana Nafion-modificada, os resultados em termos de potência indicam valores da ordem de 27,9 e 38,4 $\mu\text{W cm}^{-2}$, respectivamente.

Comparando-se os resultados, neste trabalho, dos testes de semi-célula etanol/ O_2 com TED utilizando bioanodos preparados por meio da imobilização das enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH com resultados de outros trabalhos descritos na literatura também com TED em biocélulas a etanol, pode-se inferir que ambas as metodologias testadas neste trabalho são capazes de proporcionar valores compatíveis de densidade de potência. Dados de uma biocélula a combustível enzimática sem mediador, na qual o bioeletrodo foi preparado por meio da imobilização da quino-hemoproteína ADH, demonstram valores de densidade de potência da ordem de 1,5 $\mu\text{W cm}^{-2}$ [110]. Além disso, os valores de densidade de potência obtido nessa etapa do trabalho em testes de biocélula com TED podem ser considerados significativos quando se comparam esses resultados com diferentes sistemas enzimáticos; tais como a utilização de bioanodos modificados baseados na imobilização da enzima celobiose desidrogenase que forneceram densidades de corrente da ordem 112 $\mu\text{A cm}^{-2}$ e densidade de potência da ordem 32 $\mu\text{W cm}^{-2}$ [145].

Levando em consideração todos os resultados obtidos tanto na caracterização eletroquímica dos bioanodos quanto nos testes semi-célula etanol/ O_2 , algumas informações relevantes que são úteis para o campo da bioeletrônica em geral devem ser enfatizados. O primeiro resultado substancial demonstrado neste trabalho foi que a introdução de nanotubos de carbono na estrutura do bioanodo é responsável pelo deslocamento do potencial de oxidação da reação de interesse, o que facilita bastante o processo de transferência eletrônica através do bioeletrodo contendo as enzimas PQQ-dependentes; além disso, a introdução deste nanomaterial forneceu maior área superficial que facilitou os processos de transferência de carga. Estes resultados mostraram a importância da escolha adequada da metodologia de

imobilização a ser utilizado tanto na área de biosensores quanto de biocélulas a combustível enzimática.

Acrescenta-se ainda que, com base em todos os resultados dos ensaios com TED, ambas as metodologias de imobilização investigadas (membrana Nafion-modificada além do dendrímero PAMAM) apresentaram desempenhos bastante semelhantes; indicando que ambos os protocolos de preparação são bons candidatos para proporcionar um ambiente em que as enzimas conservam a sua atividade catalítica (que é uma das grandes preocupações no desenvolvimento de dispositivos enzimáticas) além de proporcionar boa condutividade e satisfatórios valores de densidade de corrente e potência.

Em termos comparativos entre os bioanodos com TEM preparados na primeira etapa do trabalho (com as enzimas comerciais ADH e AldDH) com os resultados obtidos na segunda etapa do trabalho com bioeletrodos capazes de realizar TED (preparados com as enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH obtidas em laboratório), fica claro que mesmo com uma estruturação de eletrodo mais elaborada (com a presença de nanotubos de carbono), tal sistema ainda necessita de melhorias significativas para que se alcance valores de densidade de potência comparáveis aos obtidos em sistema com transferência mediada. Diferenças experimentais em relação à quantidade de enzima empregada em cada caso, além do suporte de carbono e cátodo utilizado devem, sem dúvida, influenciar no desempenho total de cada biocélula preparada (fatores que dificultam uma comparação mais precisa de desempenho de uma biocélula a combustível); entretanto, tais resultados indicam que a obtenção de um sistema com TED eficiente ainda requer maior desenvolvimento científico.

Conclusões parciais

Nesta etapa do trabalho, que teve como foco principal o desenvolvimento de bioanodos com TED, os resultados mostraram que ambos os protocolos de imobilização empregados foram capazes de proporcionar um ambiente no qual as enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH são capazes de realizar TED com superfícies de carbono e ouro. Durante a caracterização eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica, os resultados obtidos com os bioeletrodos preparados com a membrana Nafion modificada mostraram que a reação de interesse ocorre mais facilmente na presença de MWCNTs; nos quais se acredita que os grupamentos heme-c permanecem em um arranjo mais adequado que facilita o processo de TED e consequentemente fornece maiores correntes catalíticas. No caso dos bioanodos preparados com o dendrímero PAMAM em superfície de ouro modificada com DTBA, os resultados indicaram que o processo de TED também pode ser alcançado com uma quantidade baixa de enzimas imobilizadas por meio da técnica de automontagem. Além disso, é importante notar também que a pureza da solução de enzimas utilizada na preparação dos bioeletrodos influenciou diretamente no desempenho eletroquímico dos bioeletrodos preparados.

Os testes de semi-célula etanol/O₂ demonstraram que os bioanodos preparados foram capazes de gerar densidades de potência competitivas em relação a outros métodos de imobilização; além de confirmar o comportamento obtido durante os ensaios de caracterização eletroquímica, ou seja, com melhor desempenho obtido com os bioanodos preparados na presença de nanotubos de carbono. Por fim, os testes de célula evidenciaram que a preparação de bioanodos com TED para utilização em biocélulas a combustível etanol/O₂ por meio da imobilização de enzimas PQQ-dependentes em superfície de carbono utilizando tanto a membrana Nafion-modificada quanto o dendrímero PAMAM se mostraram bastante viáveis.

Capítulo 5

5. Conclusões

Na primeira etapa do trabalho, os resultados de caracterização cinética das enzimas desidrogenases comerciais ADH e AldDH em solução mostraram claramente que os vários parâmetros cinéticos, principalmente a concentração de substratos e coenzima (que podem inibir a ação das enzimas em elevadas concentrações), devem ser bastante considerados a fim de se obter atividade máxima com ambas as enzimas em solução.

Baseado nos ensaios de cinética com as enzimas comerciais imobilizadas pelo método de adsorção passiva, os dados obtidos indicaram que apesar de ser observada uma diminuição de atividade bastante significativa, nota-se retenção da afinidade entre enzima e substrato em relação ao comportamento obtido com as enzimas em solução; tais resultados confirmam a importância de uma metodologia de imobilização para obtenção de um sistema viável, e nesse sentido, a escolha de um processo de imobilização deve ser cuidadosa e específica para cada tipo de sistema e aplicação desejada. Os testes de semi-célula etanol/O₂ e estabilidade utilizando os bioanodos preparados pelo método de adsorção passiva utilizando o dendrímero PAMAM mostraram que a metodologia empregada é bastante atrativa na preparação de bioeletrodos para biocélula a combustível enzimática. Além disso, o bioanodo preparado se mostrou estável e capaz de gerar elevados valores de densidade de potência comparados a outros métodos de imobilização. Os resultados de densidade de potência dos estudos de semi-célula indicaram um máximo de eficiência utilizando como eletrocatalisador de NAD⁺ o corante verde metileno em tecido de carbono com 28 U de ADH; nessas condições, uma densidade de potência de 0,28 mW cm⁻² e um PCA de 0,72 V foram obtidos.

Considerando os testes realizados com os bioanodos preparados por meio da imobilização das enzimas via automontagem, além de retenção de afinidade com os respectivos substratos; os resultados com as enzimas imobilizadas demonstraram que apesar

de se observar uma velocidade de conversão muito inferior àquela obtida em solução (justificada principalmente pelos limites difusionais impostos pela presença do dendrímero); tais testes evidenciaram que a técnica utilizada favorece a obtenção de um sistema com melhor disposição das enzimas na superfície de carbono, quando comparado aos dados obtidos com o bioanodo preparado pela simples adsorção passiva. Em relação aos testes de semi-célula etanol/O₂ com os bioanodos preparados via automontagem, os resultados demonstram valores de densidade de potência comparáveis com vários trabalhos recentemente publicados na literatura. Embora os resultados tenham mostrado um melhor desempenho dos bioanodos na presença de uma camada de difusão gasosa, a mesma não se mostrou mecanicamente estável durante os ensaios de potência; desta maneira, melhorias no processo de preparação do bioanodo que envolvem tanto o suporte utilizado quanto a camada de difusão gasosa necessitam ser mais bem investigados. Os resultados mostraram também que tanto a densidade de corrente como a potência são aumentadas com a imobilização de múltiplas enzimas na superfície do bioanodo. Finalmente, tendo em vista algumas das limitações imposta pela utilização das enzimas, tais como: elevado custo, baixa estabilidade, e pouca disponibilidade; torna-se cada vez mais importante, a obtenção de uma metodologia eficiente para a preparação de bioeletrodos tanto em biocélulas a combustível como em outros tipos de dispositivos. Nesse contexto, a utilização da técnica de automontagem se mostra bastante atrativa, com grande potencial para aplicação na preparação e bioeletrodos com maior controle da disposição de enzimas na superfície do bioanodo assim como menor consumo de biocatalisadores.

Na segunda etapa do trabalho, a obtenção das enzimas PQQ-ADH e PQQ-AldDH a partir da bactéria *Gluconobacter* sp. 33 se mostrou bastante eficiente, fornecendo uma quantidade razoável de proteínas numa condição de atividade dentro do esperado. Deste modo, tornou-se possível a construção de bioanodos com TED para biocélulas a combustível etanol/O₂ por meio da imobilização de ambas as enzimas purificadas na superfície de um eletrodo, visando à oxidação do substrato e concomitante produção de 4 elétrons oriundos das duas reações catalisadas pelas enzimas PQQ-dependentes PQQ-ADH e PQQ-AldDH.

Na segunda etapa do trabalho, os resultados mostraram que ambos os protocolos de imobilização empregados foram capazes de proporcionar um ambiente no qual as enzimas PQQ-dependentes ADH e AldDH foram capazes de realizar TED em suporte de carbono e ouro. Durante a caracterização eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica, os resultados obtidos com os bioeletrodos preparados com a membrana Nafion modificada mostraram que a reação de interesse ocorre mais facilmente na presença de MWCNTs, nos quais se acredita que os grupamentos heme-c permanecem em um arranjo mais adequado que facilita o processo de TED e consequentemente fornece maiores correntes catalíticas. No caso dos bioanodos preparados com o dendrímero PAMAM em superfície de ouro modificada com DTBA, os resultados indicaram que o processo de TED também pode ser alcançado com uma quantidade baixa de enzimas imobilizadas por meio da técnica de automontagem. Além disso, é importante salientar que a pureza da solução de enzimas utilizada na preparação dos bioeletrodos influenciou diretamente no desempenho eletroquímico dos bioeletrodos preparados.

Os testes de semi-célula etanol/O₂ mostraram que os bioanodos preparados foram capazes de gerar densidades de potência competitivas em relação a outros métodos de imobilização; além de confirmar o comportamento obtido durante os ensaios de caracterização eletroquímica, ou seja, com melhor desempenho obtido com os bioanodos

preparados na presença de nanotubos de carbono. Por fim, os testes de célula mostraram que a preparação de bioanodos com TED para utilização em biocélulas a combustível etanol/ O_2 por meio da imobilização de enzimas PQQ-dependentes, em superfície de carbono, utilizando tanto a membrana Nafion-modificada quanto o dendrímero PAMAM se mostram bastantes viáveis.

Finalmente, uma comparação entre os resultados obtidos com os bioanodos com TEM preparados na primeira etapa do trabalho com aqueles obtidos na segunda etapa com bioeletrodos capazes de realizar TED, fica claro que tal sistema ainda necessita de melhorias significativas para que se alcance valores de densidade de potência comparáveis aos obtidos em sistema com transferência mediada.

Capítulo 6

6. Perspectivas futuras

Enquanto nos últimos anos, as pesquisas em biocélulas a combustível foram focadas principalmente no entendimento/desenvolvimento da química da enzima em superfícies eletródicas, os esforços atuais visam o desenvolvimento de novas metodologias e materiais integrados às enzimas, com o intuito de maximizar o preenchimento das enzimas no eletrodo, saindo de uma condição bidimensional clássica para obtenção de uma estrutura tridimensional com maior ordenação destes biocatalisadores. Nesse sentido, com o objetivo de alçar melhorias significativas nos processos de transferência eletrônica e densidade de potência, as pesquisas atuais têm dado muita atenção ao desenvolvimento de nanocatalisadores híbridos contendo enzimas e nanomateriais, que apresentam grande potencial na preparação de biocatalisadores de elevado desempenho [23, 114, 146-148].

Outro foco das pesquisas atuais são os processos de modificação genética em alguns tipos de enzimas com o intuito de facilitar os processos reacionais das reações catalisadas; em termos de engenharia de proteínas, busca-se principalmente a obtenção de características desejadas das enzimas adaptáveis às metodologias de imobilização utilizadas. Além de aumento quanto à tolerância de pH e maior estabilidade térmica, tais procedimentos visam aumentar taxas cinéticas e constantes de afinidades das enzimas com seus substratos. Acrescenta-se ainda, que uma melhor caracterização dos sítios reacionais das enzimas poderá levar a um melhor desempenho em termos de catálise e transferência eletrônica; e nesse sentido, modificações genéticas que proporcionem maior facilidade nesses processos são também alvos de pesquisa [114].

Do ponto de vista tecnológico, a utilização do sistema com TED apresenta elevado potencial de aplicação em relação ao sistema com TEM; entretanto, para a obtenção de bioeletrodos com TED de elevado desempenho, existe ainda a necessidade de se conseguir

um sistema sem mediador com elevada taxa de transferência eletrônica. Assim, objetiva-se a retirada da membrana da estrutura de uma biocélula a combustível enzimática sem ocasionar perda de potência ao sistema. Nesse contexto, tanto as biocélulas com TED quanto com TEM necessitam de significativas melhoras em termos de densidade de potência para possível aplicação prática, tais como em dispositivos eletrônicos [23, 114]. Ainda em relação ao possível poder de aplicabilidade destes dispositivos, testes de estabilidade em condição de operação são cada vez mais necessários para se obter dados consistentes quanto à retenção de atividade enzimática em longos períodos de tempo.

Capítulo 7

7. Referências bibliográficas

1. Guo, K.W., Green nanotechnology of trends in future energy: a review. *International Journal of Energy Research*, v. 36 (1), p. 1-17, 2012.
2. Dincer, I., Renewable energy and sustainable development: a crucial review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 4 (2), p. 157-175, 2000.
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*, v. 105 (2), p. 283-296, 2002.
4. Cheng, X.; Shi, Z.; Glass, N.; Zhang, L.; Zhang, J.; Song, D.; Liu, Z.S.; Wang, H.; Shen, J., A review of PEM hydrogen fuel cell contamination: Impacts, mechanisms, and mitigation. *Journal of Power Sources*, v. 165 (2), p. 739-756, 2007.
5. Cooney, M.J.; Svoboda, V.; Lau, C.; Martin, G.; Minteer, S.D., Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy & Environmental Science*, v. 1 (3), p. 320-337, 2008.
6. Palmore, G.T.R.; Whitesides, G.M., Microbial and enzymatic biofuel cell, in *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, E. Himmel, Editor: American Chemical Society, 1994. p. 271-290.
7. Potter, M.C., Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, v. 84 (571), p. 260-276, 1911.
8. Bullen, R.A.; Arnot, T.C.; Lakeman, J.B.; Walsh, F.C., Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21 (11), p. 2015-2045, 2006.
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*, v. 88 (2), p. 375-383, 1964.

10. Aquino Neto, S.; Forti, J.C.; De Andrade, A.R., An Overview of Enzymatic Biofuel Cells. *Electrocatalysis*, v. 1 (1), p. 87-94, 2010.
11. Kim, J.; Jia, H.; Wang, P., Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, v. 24 (3), p. 296-308, 2006.
12. Minteer, S.D.; Liaw, B.Y.; Cooney, M.J., Enzyme-based biofuel cells. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18 (3), p. 228-234, 2007.
13. Wingard Jr, L.B.; Shaw, C.H.; Castner, J.F., Bioelectrochemical fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 4 (3), p. 137-142, 1982.
14. Willner, I.; Arad, G.; Katz, E., A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 44 (2), p. 209-214, 1998.
15. Cosnier, S., Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 14 (5), p. 443-456, 1999.
16. Armstrong, F.A.; Wilson, G.S., Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochimica Acta*, v. 45 (15-16), p. 2623-2645, 2000.
17. Katz, E.; Willner, I., A Biofuel Cell with Electrochemically Switchable and Tunable Power Output. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125 (22), p. 6803-6813, 2003.
18. Calabrese Barton, S.; Gallaway, J.; Atanassov, P., Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. *Chemical Reviews*, v. 104 (10), p. 4867-4886, 2004.
19. Palmore, G.T.R., Bioelectric power generation. *Trends in Biotechnology*, v. 22 (3), p. 99-100, 2004.

20. Logan, B.E.; Hamelers, B.; Rozendal, R.; Schröder, U.; Keller, J.; Freguia, S.; Aelterman, P.; Verstraete, W.; Rabaey, K., Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology†. *Environmental Science & Technology*, v. 40 (17), p. 5181-5192, 2006.
21. Lovley, D.R., The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19 (6), p. 564-571, 2008.
22. Sakai, H.; Nakagawa, T.; Tokita, Y.; Hatazawa, T.; Ikeda, T.; Tsujimura, S.; Kano, K., A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions. *Energy & Environmental Science*, v. 2 (1), p. 133-138, 2009.
23. 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*, v. 26 (7), p. 3087-3102, 2011.
24. Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S., Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nat Commun*, v. 2, p. 370, 2011.
25. Du, Z.; Li, H.; Gu, T., A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, v. 25 (5), p. 464-482, 2007.
26. Logan, B.E.; Murano, C.; Scott, K.; Gray, N.D.; Head, I.M., Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. *Water Research*, v. 39 (5), p. 942-952, 2005.
27. Logan, B.E.; Regan, J.M., Microbial Fuel Cells: Challenges and Applications. *Environmental Science & Technology*, v. 40 (17), p. 5172-5180, 2006.
28. Bond, D.R.; Lovley, D.R., Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69 (3), p. 1548-1555, 2003.

29. Kim, H.J.; Park, H.S.; Hyun, M.S.; Chang, I.S.; Kim, M.; Kim, B.H., A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30 (2), p. 145-152, 2002.
30. Min, B.; Cheng, S.; Logan, B.E., Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research*, v. 39 (9), p. 1675-1686, 2005.
31. Davis, F.; Higson, S.P.J., Biofuel cells: Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22 (7), p. 1224-1235, 2007.
32. Ieropoulos, I.A.; Greenman, J.; Melhuish, C.; Hart, J., Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37 (2), p. 238-245, 2005.
33. Chang, I.S.; Moon, H.; Jang, J.K.; Kim, B.H., Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20 (9), p. 1856-1859, 2005.
34. Liu, H.; Grot, S.; Logan, B.E., Electrochemically Assisted Microbial Production of Hydrogen from Acetate. *Environmental Science & Technology*, v. 39 (11), p. 4317-4320, 2005.
35. Minteer, S.D.; Atanassov, P.; Luckarift, H.R.; Johnson, G.R., New materials for biological fuel cells. *Materials Today*, v. 15 (4), p. 166-173, 2012.
36. Sumner, J.B., The Recrystallization of Urease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 70 (1), p. 97-98, 1926.
37. Parkin, K.L., General Characteristics of Enzymes, in *Enzymes in Food Processing*, Nagodawithana. T.; Reed, G., Editors., New York: Academic Press, 1993. p. 7-25.
38. Srere, P.A., Why are enzymes so big? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 9 (9), p. 387-390, 1984.

39. Eyring, H., The Activated Complex in Chemical Reactions. *The Journal of Chemical Physics*, v. 3 (2), p. 107-115, 1935.
40. Michaelis, L.; Menten, M.L., Kinetics of invertase action. *Biochem. Z.*, v. 49, p. 333-369, 1913.
41. Russ, E.; Kaiser, U.; Sandermann, H., Lipid-dependent membrane enzymes. *European Journal of Biochemistry*, v. 171 (1-2), p. 335-342, 1988.
42. 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*, v. 50 (12), p. 2521-2525, 2005.
43. Ivnitski, D.; Branch, B.; Atanassov, P.; Apblett, C., Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. *Electrochemistry Communications*, v. 8 (8), p. 1204-1210, 2006.
44. Chen, T.; Barton, S.C.; Binyamin, G.; Gao, Z.; Zhang, Y.; Kim, H.H.; Heller, A., A Miniature Biofuel Cell. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123 (35), p. 8630-8631, 2001.
45. Heller, A., Miniature biofuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 6 (2), p. 209-216, 2004.
46. Mano, N.; Heller, A., A Miniature Membraneless Biofuel Cell Operating at 0.36 V under Physiological Conditions. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 150 (8), p. A1136-A1138, 2003.
47. Sakai, H.; Nakagawa, T.; Mita, H.; Matsumoto, R.; Sugiyama, T.; Kumita, H.; Tokita, Y.; Hatazawa, T., A High-Power Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating under Quiescent Conditions. *ECS Transactions*, v. 16 (38), p. 9-15, 2009.
48. Moehlenbrock, M.J.; Minteer, S.D., Extended lifetime biofuel cells. *Chemical Society Reviews*, v. 37 (6), p. 1188-1196, 2008.

49. Sokic-Lazic, D.; Minter, S.D., Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24 (4), p. 939-944, 2008.
50. Sokic-Lazic, D.; De Andrade, A.R.; Minter, S.D., Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell. *Electrochimica Acta*, v. 56 (28), p. 10772-10775, 2011.
51. Heller, A., Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 96 (9), p. 3579-3587, 1992.
52. www.enzyme-database.org.
53. Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A., Hemoproteins in Design of Biofuel Cells. *Fuel Cells*, v. 9 (1), p. 25-36, 2009.
54. Ghindilis, A.L.; Atanasov, P.; Wilkins, E., Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis*, v. 9 (9), p. 661-674, 1997.
55. Marcus, R.A.; Sutin, N., Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, v. 811 (3), p. 265-322, 1985.
56. Marcus, R.A., Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment. *Reviews of Modern Physics*, v. 65 (3), p. 599-610, 1993.
57. Falk, M.; Blum, Z.; Shleev, S., Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. *Electrochimica Acta*, v. (0).
58. Treu, B.L.; Arechederra, R.; Minter, S.D., Bioelectrocatalysis of Ethanol via PQQ-Dependent Dehydrogenases Utilizing Carbon Nanomaterial Supports. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 9 (4), p. 2374-2380, 2009.
59. Willner, B.; Katz, E.; Willner, I., Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17 (6), p. 589-596, 2006.

60. Komaba, S.; Mitsuhashi, T.; Shiraishi, S., Polyion Complex Nanocomposite Electrode Incorporating Enzyme and Carbon Nanotube for Biofuel Cells. *Electrochemistry*, v. 76 (1), p. 55-58, 2008.
61. Willner, I.; Katz, E., Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 39 (7), p. 1180-1218, 2000.
62. Sarma, A.K.; Vatsyayan, P.; Goswami, P.; Minteer, S.D., Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 24 (8), p. 2313-2322, 2009.
63. 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*, v. 464 (1), p. 110-117, 1999.
64. Adlercreutz, P., Immobilized Enzymes, in *Enzymes in Food Processing*, Nagodawithana, T.; Reed, G., Editors., New York: Academic Press, 1993. p. 103-119.
65. Minteer, S.D., Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols, ed. Vol. New York: Humana Press. 2011.
66. Lim, J.; Malati, P.; Bonet, F.; Dunn, B., Nanostructured Sol-Gel Electrodes for Biofuel Cells. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 154 (2), p. A140-A145, 2007.
67. Klotzbach, T.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minteer, S.D., Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization. *Journal of Membrane Science*, v. 282 (1-2), p. 276-283, 2006.
68. Zucolotto, V.; Pinto, A.P.A.; Tumolo, T.; Moraes, M.L.; Baptista, M.S.; Riul, A.; Araujo, A.P.U.; Oliveira, O.N., Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-

- layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 21 (7), p. 1320-1326, 2006.
69. Oliveira Jr., O.N.; Zucolotto, V.; Balasubramanian, S.; Li, L.; Nalwa, H.S.; Kumar, J.; Tripathy, S.K.; He, J.A., Layer-by-Layer Polyelectrolyte-Based Thin Films for Electronic and Photonic Applications, in *Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications*, Tripathy, S.K.; Kumar, J.; Nalwa, H.S.; Editors.: American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA, 2002. p. 1.
70. 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*, v. 29 (2), p. 138-175, 1990.
71. 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*, v. 17 (1), p. 117-132, 1985.
72. Klajnert, B.; Bryszewska, M., Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, v. 48 (1), p. 199-208, 2001.
73. Perinotto, A.C.; Caseli, L.; Hayasaka, C.O.; Riul, A., Jr.; Oliveira, O.N., Jr.; Zucolotto, V., Dendrimer-assisted immobilization of alcohol dehydrogenase in nanostructured films for biosensing: Ethanol detection using electrical capacitance measurements. *Thin Solid Films*, v. 516 (24), p. 9002-9005, 2008.
74. Ereno, D., Revista Pesquisa Fapesp, edição 133, março de 2007.
75. Görisch, H., The ethanol oxidation system and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, v. 1647 (1-2), p. 98-102, 2003.

76. Ikeda, T.; Kato, K.; Tatsumi, H.; Kano, K., Mediated catalytic current for the oxidation of ethanol produced by *Acetobacter acetii* cells suspended in solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 440 (1–2), p. 265-269, 1997.
77. Molinari, F.; Villa, R.; Manzoni, M.; Aragozzini, F., Aldehyde production by alcohol oxidation with *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43 (6), p. 989-994, 1995.
78. Hammer, F.E., Oxidoreductases, in *Enzymes in Food Processing*, Nagodawithana, T.; Reed, G., Editor New York: Academic Press, 1993. p. 265-267.
79. Trivic, S.; Leskovac, V., Structure and function of yeast alcohol dehydrogenase. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 65 (4), p. 207-227, 2000.
80. Eklund, H.; Branden, C.I., Biological Macromolecules and Assemblies, ed. Vol. New York: Wiley Interscience. 1987 5.
81. Klinman, J.P., Probes of Mechanism and Transition-State Structure in the Alcohol Dehydrogenase Reaction. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 10 (1), p. 39-78, 1981.
82. Van Eys, J.; Kaplan, N.O., Yeast Alcohol Dehydrogenase. III. Relation of Alcohol Structure to Activity. *Journal of the American Chemical Society*, v. 79 (11), p. 2782-2786, 1957.
83. Trivic, S.; Zeremski, J.; Leskovac, V., NAD(+) binding by yeast alcohol dehydrogenase in the presence of pyrazole and a new method for the determination of the enzyme active site concentration. *Biotechnology Letters*, v. 19 (8), p. 809-811, 1997.
84. Dickinso, F.M.; Monger, G.P., Study of kinetics and mechanism of yeast alcohol-dehydrogenase with a variety of substrates. *Biochemical Journal*, v. 131 (2), p. 261-270, 1973.

85. Ganzhorn, A.J.; Green, D.W.; Hershey, A.D.; Gould, R.M.; Plapp, B.V., Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases – amino acid residue-294 and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262 (8), p. 3754-3761, 1987.
86. Abuin, E.; Lissi, E.; Leon, L., Kinetics of ethanol oxidation catalyzed by yeast alcohol dehydrogenase in aqueous solutions of sodium dodecylsulfate. *Protein Journal*, v. 27 (4), p. 247-252, 2008.
87. Van Eys, J.; Ciotti, M.M.; Kaplan, N.O., Yeast alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 231 (1), p. 571-582, 1958.
88. Bradbury, S.L.; Jakoby, W.B., Ordered binding of substrates to yeast aldehyde dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 246 (6), p. 1834-&, 1971.
89. Steinman, C.R.; Jakoby, W.B., Yeast Aldehyde Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 243 (4), p. 730-734, 1968.
90. Bostian, K.A.; Betts, G.F., Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *saccharomyces-cerevisiae*. *Biochemical Journal*, v. 173 (3), p. 787-798, 1978.
91. Liu, Z.J.; Sun, Y.J.; Rose, J.; Chung, Y.J.; Hsiao, C.D.; Chang, W.R.; Kuo, I.; Perozich, J.; Lindahl, R.; Hempel, J.; Wang, B.C., The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural Biology*, v. 4 (4), p. 317-326, 1997.
92. Lee, C.Y., Biochemical studies of soluble and immobilized aldehyde dehydrogenase from yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 3 (1), p. 71-83, 1978.
93. Adachi, O.; Tayama, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K.; Ameyama, M., Purification and Characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 42 (11), p. 2045-2056, 1978.

94. Ikeda, T.; Kobayashi, D.; Matsushita, F.; Sagara, T.; Niki, K., Bioelectrocatalysis at electrodes coated with alcohol dehydrogenase, a quinoxinoprotein with heme c serving as a built-in mediator. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 361 (1–2), p. 221-228, 1993.
95. Ikeda, T., I Fundamental Aspects. *Frontiers in Biosensorics*, ed. Scheller, J. Fedrowitz. Vol. Basel, Switzerland: Birkhauser. 1997, p. 243.
96. Ameyama, M.; Adachi, O., Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound, in *Methods in Enzymology*, A.W. Willis, Editor: Academic Press, 1982. p. 491-497.
97. Deppenmeier, U.D.; Hoffmeister, M.H.; Prust, C.P., Biochemistry and biotechnological applications of small *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60 (3), p. 233-242, 2002.
98. Amersham Biosciences, Protein Purification Handbook, 2001, ed. Vol.
99. Ninfa, A.J.; Ballou, D.P.; Benore, M., Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology, 2nd edition ed. Vol.: John Wiley & Sons. 2009.
100. Bard, A.J.; Faulkner, L.R., Electrochemical Methods Fundamentals and Applications, Second Edition ed. Vol. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2001.
101. Johnston, W.; Cooney, M.J.; Liaw, B.Y.; Sapra, R.; Adams, M.W.W., Design and characterization of redox enzyme electrodes: new perspectives on established techniques with application to an extremeophilic hydrogenase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36 (4), p. 540-549, 2005.
102. Sun, D.; Scott, D.; Cooney, M.J.; Liaw, B.Y., A Promising Reconstitution Platform for PQQ-Dependent Apo-Enzymes in Chitosan--Carbon Nanotube Matrices. *Electrochemical and Solid-State Letters*, v. 11 (6), p. B101-B104, 2008.

103. Plotkin, E.V.; Higgins, I.J.; Hill, H.A.O., Methanol dehydrogenase bioelectrochemical cell and alcohol detector. *Biotechnology Letters*, v. 3 (4), p. 187-192, 1981.
104. Palmore, G.T.R.; Bertschy, H.; Bergens, S.H.; Whitesides, G.M., A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 443 (1), p. 155-161, 1998.
105. Yeh, P.; Kuwana, T., Reversible electrode reaction of cytochrome. *Chemistry Letters*, v. 6 (10), p. 1145-1148, 1977.
106. 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*, v. 55 (1–2), p. 21-23, 2002.
107. Vincent, K.A.; Cracknell, J.A.; Clark, J.R.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Armstrong, F.A., Electricity from low-level H₂ in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. *Chemical Communications*, v. (48), p. 5033-5035, 2006.
108. Karyakin, A.A.; Karyakina, E.E.; Gorton, L.; Bobrova, O.A.; Lukachova, L.V.; Gladilin, A.K.; Levashov, A.V., Improvement of electrochemical biosensors using enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent. *Analytical Chemistry*, v. 68 (24), p. 4335-4341, 1996.
109. Topcagic, S.; Minteer, S.D., Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell. *Electrochimica Acta*, v. 51 (11), p. 2168-2172, 2006.

110. Ramanavicius, A.; Kausaite, A.; Ramanaviciene, A., Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24 (4), p. 761-766, 2008.
111. Sokic-Lazic, D.;Minteer, S.D., Pyruvate/Air Enzymatic Biofuel Cell Capable of Complete Oxidation. *Electrochemical and Solid-State Letters*, v. 12 (9), p. F26-F28, 2009.
112. Ivanov, I.; Vidaković-Koch, T.; Sundmacher, K., Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling. *Energies*, v. 3 (4), p. 803-846, 2010.
113. Opallo, M.; Bilewicz, R., Recent Developments of Nanostructured Electrodes for Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction. *Advances in Physical Chemistry*, v. 2011, p. 21, 2011.
114. Yang, X.-Y.; Tian, G.; Jiang, N.;Su, B.-L., Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy & Environmental Science*, v. 5 (2), p. 5540-5563, 2012.
115. Lineweaver, H.;Burk, D., The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, v. 56, p. 658-666, 1934.
116. Morenocastilla, C.; Ferrogarcia, M.A.; Joly, J.P.; Bautistatoledo, I.; Carrascomarin, F.;Riverautrilla, J., Activated carbon surface modifications by nitric-acid, hydrogen-peroxide, and ammonium peroxydisulfate treatments.. *Langmuir*, v. 11 (11), p. 4386-4392, 1995.
117. Bradford, M.M., Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72 (1-2), p. 248-254, 1976.
118. Lapenaite, I.; Kurtinaitiene, B.; Razumiene, J.; Laurinavicius, V.; Marcinkeviciene, L.; Bachmatova, I.; Meskys, R.; Ramanavicius, A., Properties and analytical application

- of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 33. *Analytica Chimica Acta*, v. 549 (1–2), p. 140-150, 2005.
119. Marcinkeviciene, L.; Bachmoatova, I.; Semenaite, R.; Rudomanskis, R.; Brazenas, G.; Meskiene, R.; Meskys, R., Purification and characterization of alcoholdehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 33. *Biologija*, v. 2, p. 25–30, 1999.
120. <http://www.piercenet.com/>.
121. Moore, C.M.; Akers, N.L.; Hill, A.D.; Johnson, Z.C.; Minteer, S.D., Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides. *Biomacromolecules*, v. 5 (4), p. 1241-1247, 2004.
122. Nygaard, A.P.; Theorell, H., The Reaction Mechanism of Yeast Alcohol Dehydrogenase (ADH), Studied by Overall Reaction Velocities. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 9, p. 1300-1305., 1955.
123. Hayes, J.E.; Velick, S.F., Yeast alcohol dehydrogenase – molecular weight, coenzyme binding, and reaction equilibria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 207 (1), p. 225-244, 1954.
124. Dickinson, F.M.; Monger, G.P., A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with a variety of substrates. *Biochem. J.*, v. 131 (2), p. 261-270, 1973.
125. Wang, M.F.; Han, C.L.; Yin, S.J., Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 178 (1-3), p. 36-39, 2009.
126. Dickenson, C.J.; Dickinson, F.M., Study of pH-dependence and temperature-dependence of reactions of yeast alcohol dehydrogenase with ethanol, acetaldehyde, and butyraldehyde as substrates. *Biochemical Journal*, v. 147 (2), p. 303-311, 1975.

127. Zanon, J.P.; Peres, M.F.S.; Gattas, E.A.L., Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40 (3), p. 466-470, 2007.
128. Zucolotto, V.; Daghasanli, K.R.P.; Hayasaka, C.O.; Riul, A., Jr.; Ciancaglini, P.; Oliveira, O.N., Jr., Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. *Analytical Chemistry*, v. 79 (5), p. 2163-2167, 2007.
129. Aquino Neto, S.; Forti, J.C.; Zucolotto, V.; Ciancaglini, P.; De Andrade, A.R., The kinetic behavior of dehydrogenase enzymes in solution and immobilized onto nanostructured carbon platforms. *Process Biochemistry*, v. 46 (12), p. 2347-2352, 2011.
130. Moiroux, J.; Elving, P.J., Effects of adsorption, electrode material, and operational variables on the oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide at carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, v. 50 (8), p. 1056-1062, 1978.
131. Silber, A.; Hampp, N.; Schuhmann, W., Poly(methylene blue)-modified thick-film gold electrodes for the electrocatalytic oxidation of NADH and their application in glucose biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 11 (3), p. 215-223, 1996.
132. Cracknell, J.A.; Vincent, K.A.; Armstrong, F.A., Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chemical Reviews*, v. 108 (7), p. 2439-2461, 2008.
133. Wu, X.; Zhao, F.; Varcoe, J.R.; Thumser, A.E.; Avignone-Rossa, C.; Slade, R.C.T., A one-compartment fructose/air biological fuel cell based on direct electron transfer. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25 (2), p. 326-331, 2009.

134. Lee, J.Y.; Shin, H.Y.; Lee, J.H.; Song, Y.S.; Kang, S.W.; Park, C.; Kim, J.B.; Kim, S.W., A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59 (4), p. 274-278, 2009.
135. Kuwahara, T.; Homma, T.; Kondo, M.; Shimomura, M., Fabrication of enzyme electrodes with a polythiophene derivative and application of them to a glucose fuel cell. *Synthetic Metals*, v. 159 (17–18), p. 1859-1864, 2009.
136. Klotzbach, T.L.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minteer, S.D., Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion[®] polymers. *Journal of Membrane Science*, v. 311 (1–2), p. 81-88, 2008.
137. Habrioux, A.; Merle, G.; Servat, K.; Kokoh, K.B.; Innocent, C.; Cretin, M.; Tingry, S., Concentric glucose/O₂ biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 622 (1), p. 97-102, 2008.
138. Miyake, T.; Oike, M.; Yoshino, S.; Yatagawa, Y.; Haneda, K.; Kaji, H.; Nishizawa, M., Biofuel cell anode: NAD⁺/glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode. *Chemical Physics Letters*, v. 480 (1–3), p. 123-126, 2009.
139. Choi, Y.; Wang, G.; Nayfeh, M.H.; Yau, S.-T., A hybrid biofuel cell based on electrooxidation of glucose using ultra-small silicon nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24 (10), p. 3103-3107, 2009.
140. Forti, J.C.; Aquino Neto, S.; Zucolotto, V.; Ciancaglini, P.; De Andrade, A.R., Development of novel bioanodes for ethanol biofuel cell using PAMAM dendrimers as matrix for enzyme immobilization. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 26 (5), p. 2675-2679, 2011.

141. Amir, L.; Tam, T.K.; Pita, M.; Meijler, M.M.; Alfonta, L.; Katz, E., Biofuel Cell Controlled by Enzyme Logic Systems. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131 (2), p. 826-832, 2008.
142. Aquino Neto, S.; Forti, J.C.; Zucolotto, V.; Ciancaglini, P.; De Andrade, A.R., Development of nanostructured bioanodes containing dendrimers and dehydrogenases enzymes for application in ethanol biofuel cells. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 26 (6), p. 2922-2926, 2011.
143. Ramanavicius, A.; Habermüller, K.; Csöregi, E.; Laurinavicius, V.; Schuhmann, W., Polypyrrole-Entrapped Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase. Evidence for Direct Electron Transfer via Conducting-Polymer Chains. *Analytical Chemistry*, v. 71 (16), p. 3581-3586, 1999.
144. Razumiene, J.; Niculescu, M.; Ramanavicius, A.; Laurinavicius, V.; Csöregi, E., Direct Bioelectrocatalysis at Carbon Electrodes Modified with Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 33. *Electroanalysis*, v. 14 (1), p. 43-49, 2002.
145. Tasca, F.; Gorton, L.; Harreither, W.; Haltrich, D.; Ludwig, R.; Nöll, G., Direct Electron Transfer at Cellobiose Dehydrogenase Modified Anodes for Biofuel Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112 (26), p. 9956-9961, 2008.
146. Wang, X.; Falk, M.; Ortiz, R.; Matsumura, H.; Bobacka, J.; Ludwig, R.; Bergelin, M.; Gorton, L.; Shleev, S., Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 31 (1), p. 219-225, 2012.
147. Olyveira, G.M.; Kim, J.H.; Martins, M.V.A.; Iost, R.M.; Chaudhari, K.N.; Yu, J.S.; Crespilho, F.N., Flexible Carbon Cloth Electrode Modified by Hollow Core-

- Mesoporous Shell Carbon as a Novel Efficient Bio-Anode for Biofuel Cell. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 12 (1), p. 356-360, 2012.
148. Wang, Y.; Liu, L.; Li, M.; Xu, S.; Gao, F., Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 30 (1), p. 107-111, 2011.