UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

LUCIANO DOS SANTOS

"Investigação da enzima Bilirrubina oxidase como catalisador da reação de redução eletroquímica de oxigênio"

> SÃO CARLOS 2010

LUCIANO DOS SANTOS

Investigação da enzima Bilirrubina oxidase como catalisador da reação de redução eletroquímica de oxigênio

> Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Rafael Gonzalez

São Carlos 2010

DEDICATÓRIA

Muitos nomes deveriam constar nesta folha de papel, como retribuição à dedicação que me prestaram durante muito tempo, e em várias ocasiões. Porém, vou reservar este espaço de valiosa atenção para dedicar este trabalho à minha família, sem a qual apenas cabe a Deus o conhecimento da vida que eu teria tido. O papel que realizei no teatro da ciência química, mais um dentre muitos outros no mundo todo e ao longo da História, foi resultado de um esforço extremo, dedicação incansável e abdicação impagável nos bastidores dessa peça, realizados desde antes de 1981 por dois anjos maravilhosos, Seu José António e Dona Darci, e que os chamo de pai e mãe. Esconderam-se da vaidade do mundo para que eu pudesse ter o sucesso que sempre sonharam para mim, me oferecendo a oportunidade que jamais puderam ter, por razões diversas. Dedico a vocês, mãe e pai, este trabalho, os trabalhos que já fiz, e todos os que ainda farei.

E à minha irmã querida, que já foi Sheila e hoje é Irmã Maria Madalena de Jesus Ressuscitado, e que contribuiu muito para a formação do meu caráter. Dedico também a você este trabalho. Suas orações geraram muitos frutos.

Por fim, dedico não somente este trabalho, mas toda a minha vida, àquele que a me deu e que a conduz por todo o caminho que me leva ao seu encontro: Jesus Cristo!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ernesto Rafael Gonzalez, pela orientação e disposição, desde a iniciação científica, até a defesa do presente trabalho. O apoio e incentivo a iniciar uma linha de pesquisa pioneira no laboratório e a buscar experiências em grupos de pesquisa no exterior foram de extrema importância para a minha formação acadêmica, intelectual e profissional;

Ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado concedida (Processo 2005/04439-0) e pelo apoio financeiro para a realização do trabalho e participação em congressos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa PDEE de estágio no exterior (Processo BEX 4537/07-6);

Aos colegas da Universidade de Oxford, na Inglaterra: Professor Fraser Andrew Armstrong, por ter me recebido com disposição e ter me orientado de forma esplêndida durante meu estágio em seu grupo de pesquisa – Inorganic Chemistry Laboratory; ao Dr. Christopher Francis Blanford, por sua atenção e dedicação no planejamento de experimentos e interpretação de resultados; e ao Dr. Erwin Reisner, pela amizade, companheirismo e apoio durante todo meu estágio em Oxford;

Ao Professor Victor Climent, da Universidade de Alicante, na Espanha, pelo auxílio e dedicação na realização dos experimentos com monocristais de ouro e platina. Aos Professores Júlio César Borges e Fernanda Canduri, do Instituto de Química de São Carlos, por disponibilizarem a infraestrutura do Grupo de Biologia Molecular e Bioquímica para os trabalhos de cromatografia e purificação de proteína, além das fundamentais discussões e sugestões concernentes à atividade;

Aos amigos e colegas do laboratório, sem os quais a diversão e descontração durante o trabalho jamais seriam as mesmas. Em especial, merecem destaques alguns nomes: ao Gustavo Ciniciato, Adriano Gomes e Dr Camilo de La Rota, pela colaboração como parceiros na formação da equipe de biocélula a combustível do grupo; ao MSc Daniel Cantane (Scooby), pelo apoio na realização dos experimentos de FTIR; ao MSc Elton Sitta (eterno Xororó), pelo apoio na realização dos experimentos de EQCN (mesmo que os resultados não tenham sido usados na descrição deste trabalho) ao MSc Melke Augusto do Nascimento, pelo apoio nas análises de simulação computacional; ao MSc Bruno Carreira Batista (Milhouse), ao Dr Eduardo Gonçalves Ciapina, ao Professor Fabio Henrique Barros de Lima e aos muitos outros colegas, pelas importantes e cruciais discussões técnicas (jamais eu teria tido tantas idéias sem tais discussões); A todos os amigos e colegas de repúblicas, com quem compartilhei momentos de descontração, crescimento e boa convivência: Márcio (Donatello), Fabiano (Mineiro), Leandro (Pamonha), Caio (Dennis) e Tiago (Joe), companheiros de quarto, em diferentes épocas, no alojamento do Bloco B1 da USP; Flávio (eternamente Koxô), Luis Gustavo (Croquete), Arthur (Shiunai), Dan (morador indireto), na república Crocodilo Pepui; Monika, Ângela, Kiri e Eoin (pelo companheirismo como colegas de república, em Oxford); Gustavo Tokoro; e pelo acolhimento dos amigos Daniel (Scooby), Daniel (Koxonha), Stênio (Tung), Fábio e Dionísio, na última república onde morei (e que não tem nome).

À minha valiosa ex-professora de inglês, Beverly Young, pela fundamental e indispensável ajuda durante toda a minha preparação para a terrível e sempre assustadora prova de Proficiência em Inglês (IELTS), antes do meu estágio em Oxford;

Aos meus familiares, principalmente aos primos Liduardo, Tatiana, Ana Elisa, Sonia, Jocelene, Regiane e Leopoldo, que me auxiliaram muito, e de várias formas, durante minha viagem para a Inglaterra, e pelo incentivo ao longo de todo esse trabalho. As conversas sempre foram gratificantes e me fizeram companhia, mesmo estando muito longe;

Agradeço, também, à minha Samanta, pelo apoio durante as etapas finais do trabalho, ouvindo e tolerando minhas lamentações, e dando suporte nos momentos difíceis;

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização das atividades durante todos esses anos de luta, dedicação e incansável trabalho dentro do laboratório de eletroquímica.

Muito obrigado!!!

Pela Fé, e por isso talvez de forma inexplicável, compreendo que sou infinitamente mais feliz rendendo-me à autoridade de Jesus Cristo que ao desejo de Poder intrínseco ao Homem. Através da Razão, compreendo que o acaso e a coincidência não podem explicar a sequência dos fatos e acontecimentos em minha vida, mas que tudo segue a lógica de Deus, a qual somente pode ser entendida pela Fé, sob a luz da Razão. Tal Razão jamais será capaz de explicar a verdadeira Fé e seus frutos, mas somente tem Fé quando se tem Razão.

Luciano dos Santos

RESUMO

Dos SANTOS, L. Investigação da enzima Bilirrubina oxidase como catalisador da reação de redução eletroquímica de oxigênio. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria é uma multicobre oxidase capaz de reduzir O₂ pela oxidação de fenóis, aminas aromáticas e polipirróis. Eletroquimicamente, essa reação de redução ocorre pela transferência de elétrons entre a enzima e um eletrodo. Nesta tese, foi investigada a eficiência da enzima como agente redutor de O₂ na superfície de eletrodos modificados pela função orgânica naftil-2-carboxilato por acoplamento de diazônio. Essa modificação na superfície do eletrodo aumenta em até quatro vezes a atividade do filme catalítico em relação à obtida por eletrodos em que a adsorção da enzima foi feita de forma convencional, sem a modificação. Foram estudados os efeitos da temperatura sobre a atividade da enzima para a redução de O₂, sendo observado um aumento linear da atividade do eletrodo com o aumento da temperatura até 30 °C, de tal forma que temperaturas mais altas proporcionaram o aumento da inativação natural das moléculas de enzima. Esse efeito de inativação foi confirmado pela diminuição da atividade com o tempo na presença de O₂, por cronoamperometria, sendo a atividade interrompida pela inserção de argônio e retomada do mesmo ponto pela reinserção de O₂, descartando a idéia da queda de corrente proveniente da dessorção de enzima. Foi estudado também o efeito do pH na máxima atividade da bilirrubina oxidase, conduzidos entre pH 5,0 e 8,0, e verificando-se que a máxima atividade da enzima foi obtida entre pH 5,5 e 6,0 e, além disso, verificou-se que a corrente catalítica em baixos valores de pH aumenta diretamente com o aumento do sobrepotencial aplicado. Porém, em altos valores de pH, a curva de redução toma a forma sigmoidal e passa a ser independente do sobrepotencial aplicado, sendo a reação governada por etapas químicas de transferência de prótons. O uso de eletrodos de disco rotatório possibilitou resolver parâmetros de Michaelis-Menten para a cinética do filme catalítico de forma mais precisa (a resposta de corrente é menos dependente do transporte de massa de reagentes) e esses dados foram obtidos dentro de um intervalo de pH importante para aplicações práticas. O sobrepotencial da reação de redução de O₂ catalisada por bilirrubina oxidase foi comparado com o sobrepotencial obtido para a mesma reação catalisada por Platina eletrodepositada sobre a superfície de grafite pirolítico, onde foi observado um sobrepotencial de 140 mV para a catálise enzimática, demasiado menor que o valor de 415 mV obtidos para a Platina, sob as mesmas condições experimentais, em pH neutro. A metodologia proposta para a construção de um cátodo para aplicação em células a combustível enzimáticas e os subsequentes estudos possibilitaram uma investigação minuciosa para caracterizar a enzima bilirrubina oxidase como talvez o catalisador mais eficiente na redução eletroquímica de oxigênio molecular em células a combustível até o momento.

Palavras chaves: Bilirrubina oxidase; redução eletroquímica de O_2 ; célula a combustível enzimática.

ABSTRACT

Dos SANTOS, L. Investigation of the enzyme Bilirubin oxidase as a catalyst for the oxygen electrochemical reduction reaction. 2010. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* is a multicopper oxidase reducing O_2 at the expenses of phenols, aromatic amines and polypyrrols oxidation. Electrochemically, this reduction reaction undergoes through the electron transfer between enzyme and electrode. In this thesis, the enzyme was investigated as an efficient O₂ reducing agent on electrode surfaces modified by naphthil-2-carboxylate functionalities through diazonium coupling. This modification of the electrode surface increases the activity of the catalytic film up to four times comparing to that obtained by electrodes in which the enzyme molecules were adsorbed conventionally, without modification. It was studied the effect of temperature on O_2 reduction, in which catalysis increased linearly with temperature up to 30 °C, and higher temperatures increased the natural enzyme inactivation. This inactivation was confirmed by the activity drop off with time in the presence of O_2 , by chronoamperometry, ceased out when argon was inserted into the cell and re-established from the same point when argon was purged out by insertion of O_2 . These results cast aside the idea of activity drop off caused by enzyme desorption. It was also investigated the pH effect on the maximum activity of bilirubin oxidase, carried out between pH 5.0 and 8.0, being the highest activity obtained at pH 5.5-6.0. Furthermore, it was observed that the catalytic current directly increases with applied overpotential, at low pH values, and the reduction wave shape becomes sigmoidal and independent on applied overpotential at high pH values. The reaction is then governed by chemical steps. as the proton transfer. The use of rotating-disc electrodes favored solving the Michaelis-Menten kinetics for the catalytic film in a much greater accuracy (the current response is much less dependent on reagent mass transport) and these data were obtained for pH interval important for practical applications. The overpotential for the O_2 reduction reaction catalyzed by bilirubin oxidase was compared to the overpotential obtained by the same reaction catalyzed by Platinum electrodeposited onto a pyrolytic graphite electrode. An overpotential of only 140 mV was observed for the enzymatic catalysis, much lower compared to the 415 mV obtained for the Platinum electrode, under the same experimental conditions, at neutral pH. The proposed method for constructing a cathode for enzymatic fuel cell application and subsequent investigation described allowed an in-depth study of bilirubin oxidase characterization as perhaps the most efficient catalysts for the electrochemical reduction of molecular oxygen in fuel cells to date.

Keywords: Bilirubin oxidase; electrochemical O₂ reduction; enzymatic fuel cell.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de células microbianas utilizando mediadores no acoplamento da transferência intracelular de elétrons às reações eletroquímicas no ânodo. 25
Tabela 2 – Exemplos de mediadores redox para aplicação em sistemas catódicos31
Tabela 3 – Exemplos de mediadores poliméricos redox para aplicação em sistemas anódicos32
Tabela 4 – Valores de frequência de estiramento das espécies73
Tabela 5 – Parâmetros de ajuste e dados da qualidade do ajuste teórico às curvas experimentais (χ^2) para os voltamogramas de redução de O2 catalisada por $MvBO$.101
Tabela 6 – Erros absoluto e relativo no fluxo de gás para a determinação de $K_{\rm M}$ e $i_{\rm max}$ 106
Tabela 7 – Constantes de inibição para MvBO na presença de azida, cianeto, fluoreto e cloreto. 124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração esquemática do funcionamento de uma célula a combustível20
Figura 2.	Esquema de funcionamento de uma célula a combustível microbiana23
Figura 3.	Mecanismos de transferência de elétrons para sistemas usando microorganismos e mediadores de elétrons25
Figura 4.	Ilustração esquemática de uma célula a combustível enzimática, mostrando a aplicação de uma hidrogenase como catalisador da oxidação de H ₂ a H ⁺ e uma multicobre oxidase como catalisador da redução de O ₂ a H ₂ O27
Figura 5.	Mecanismos de transferência de elétrons em células a combustível enzimática28
Figura 6.	Ilustração da reconstituição da Glicose oxidase (GOx) sobre uma monocamada de PQQ/FAD em Au e voltamogramas cíclicos da oxidação de glicose
Figura 7.	Estrutura cristalográfica da lacase CotA de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB 1gsk), destacando os quatro átomos de cobre, a superfície de cargas da estrutura quaternária da enzima e os aminoácidos ligados ao Cu T1, a sequência His-Cis-His ligando Cu T1 ao sítio T2/T3 e os aminoácidos ligados aos Cu's T2/T3
Figura 8.	Desenho esquematizado da célula eletroquímica utilizada46
Figura 9.	Desenho esquemático do eletrodo de trabalho e imgem da placa de grafite pirolítico e do cilindro de grafite após usinagem da tira recortada da placa
Figura 10	. (A) Diagrama do grafite pirolítico, mostrando os planos Basal e ' <i>Edge</i> '. (B) Diagrama de um plano GPE abradado, mostrando as regiões dos planos ' <i>edge</i> ' e basal
Figura 11	. Imagens do grafite pirolítico, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em que foram expostos os planos basal, <i>edge</i> abradado e <i>edge</i> após polimento com alumina 0,05 μm49
Figura 12	. Sequência de imagens da coluna cromatográfica contendo resina de troca aniônica fraca (DEAE-Sepharose) durante a purificação da bilirrubina oxidase
Figura 13	. Voltametria cíclica para redução do sal de diazônio (ácido 6-diazo-2-naftóico – A6D2N) sobre a superfície do eletrodo de GPE
Figura 14	. Modificação do eletrodo de trabalho de GPE com moléculas de ácido 6-diazo-2-naftóico, por acoplamento de sal de diazônio, obtido da reação de nitrito de sódio com o precursor ácido 6-amino-2-naftóico (A6A2N), para adsorção da <i>Mv</i> BO
Figura 15	. Eletrodos de trabalho constituídos de monocristais de Au(111) e Pt(111), e imagem do menisco formado pelo contato da superfície de trabalho do eletrodo com a solução eletrolítica
Figura 16	. Eletroforese por DSS-EGPA para Mv BO purificada e não purificada58
Figura 17	. Espectros de UV/Vis e comparação do desempenho da redução de oxigênio catalisada por <i>Mv</i> BO purificada e não-purificada60

Figura 18	. Espectros de absorção de luz UV/Vis para a reação entre bilirrubina oxidase (2,6 nmol L^{-1}) e ABTS (30 µmol L^{-1}) em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} e pH 5,0, a 25 °C, em função do tempo
Figura 19	. Variação da absorção de luz UV/Vis em 340 nm para o reagente ABTS (30 µmol L ⁻¹) durante reação com bilirrubina oxidase purificada (2,3 nmol L ⁻¹), em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ e pH 5,0, a 25 °C, em função do tempo62
Figura 20	. Correlação entre a curva de redução da enzima sobre a superfície do eletrodo com a referente etapa da reação, ilustrando como os elétrons fluem da superfície do eletrodo em direção ao átomo de cobre T1 da bilirrubina oxidase
Figura 21	. Representação tridimensional do sítio ativo da lacase CotA (PDB code:1gsk) e presumido como estrutura do sítio ativo da bilirrubina oxidase
Figura 22	. Mecanismo proposto por Solomon <i>et al.</i> ¹¹⁶ para as etapas reacionais de redução de oxigênio molecular catalisada por multicobre oxidases como lacase, ascorbato oxidase e bilirrubina oxidase
Figura 23	. Redução de O2 catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida em GPE não modificado e GPE modificado com A6A2N69
Figura 24	. Formação do sal de diazônio durante a reação com nitrito de sódio e acoplamento à superfície do eletrodo por redução eletroquímica70
Figura 25	. Mecanismo da reação de formação do sal de diazônio durante a reação com nitrito de sódio70
Figura 26	. (A) Detalhes da célula de infravermelho adaptada para medidas de FTIR <i>in situ</i> . (B) Ilustração da configuração de filme fino de eletrólito entre a janela prismática do infravermelho e o eletrodo estabelecido durante a medida72
Figura 27	. Espectros de FTIR <i>in situ</i> da eletro-redução do ácido 6-diazo-2-naftóico durante o acoplamento de diazônio sobre a superfície de ouro, em função do potencial74
Figura 28	. Representação das estruturas moleculares dos compostos estudados como modificadores da superfície de grafite para aumentar o recobrimento por $MvBO$ 75
Figura 29	. Comparação entre as curvas de redução de O2 catalisada por <i>Mv</i> BO adsorvida à superfície de GPE modificada pelas moléculas representadas na Figura 28
Figura 30	. Comparação entre as curvas de redução de O ₂ catalisada por <i>Mv</i> BO adsorvida sobre as superfícies de GPE modificadas com ácido 6-Amino-2-Naftóico por diferentes números de ciclos durante o acoplamento de diazônio
Figura 31	. Redução de O2 catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida fisicamente em carbono vítreo não modificado e carbono vítreo modificado com A6A2N
Figura 32	. Redução de O ₂ catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida fisicamente em carbono Vulcan XC-72 não modificado: voltamogramas cíclicos consecutivos, conduzidos ao longo de 12 horas contínuas de atividade da enzima, e gráfico de I <i>vs</i> tempo para a verificação da estabilidade do filme catalítico obtido por adsorção simples
Figura 33	. Gráfico da dependência da corrente catalíca de redução de oxigênio com a velocidade angular do eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO
Figura 34	. Voltamogramas cíclicos para a redução de O2 em um eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO de dois dias de uso, registrada como função da temperatura83

Figura 36. Voltamogramas ciclicos para a redução de O ₂ em um eletrodo de GPE modificado con	a
A6A2N–MvBO de dois dias de uso, registrada como função do pH, e medida a 0 °C.	
Gráfico interno mostra a dependência corrente–pH derivada da corrente medida em	
sobrepotencial constante de 535 mV	.86
\mathbf{I}	

Figura 39. Comparação e normalização das curvas de redução de O₂ catalisada por MvBOadsorvida sobre os materiais mostrados na Figura 38 para o intervalo [0,1], usando a relação $i' = (i - i_{min})/(i_{max} - i_{min})$, e representadas juntas para a mesma escala......90

Figura 40. Ilustração de duas orientações	es diferentes para a bilirrubina oxidase sobre o eletrodo d	e
GPE, resultando em diferentes	es distâncias d de tunelamento para a transferência	
interfacial de elétrons		17

Figura 42. Modelagem dos voltamogramas catalíticos para as curvas de redução de oxigênio no intervalo de pH estudado.....100

Figura 43. Variação dos valores de d_0 (em Å) e $eta d_0$ (adimensional) em função (A) da temperatura
(em pH 6,0) e (B) do pH (a 0 °C)	

Figura 44	4. Modelagem da varredura no sentido catódico para a curva de redução de O2 catalisad	a
	por MvBO adsorvida sobre a superfície de Au(111), sobrepostas com o modelo proposto	0
	por Léger <i>et al</i> 1	03

- Figura 46. (A) Série de experimentos de cronoamperometria, a 330 mV vs SHE, e voltametria cíclica, em pH 5,0 e em diferentes concentrações de O₂ (expressas em % de O₂ dentro da célula) mostrando a extensão da perda de atividade (filme) ao longo de 8 horas.
 Dependência do K_M e i_{max} com o potencial, em diferentes valores de pH......107
- Figura 47. Gráficos de Lineweaver-burk para a reação de redução de O_2 catalisada por MvBOadsorvida sobre GPE modificado com A6A2N, em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, 25 °C e 2500 rpm......108

Figura 48	. Voltametrias cíclicas em diferentes valores de pL (L ⁺ = H ⁺ , D ⁺) obtidas durante sucessivas transferências entre soluções tampão de H_2O e D_2O para investigação do efeito do isótopo
Figura 49	. Representações do fluxo catalítico de elétrons através da bilirrubina oxidase imobilizada ao eletrodo113
Figura 50	. Comparação entre a redução de O ₂ catalisada por GPE modificado com A6A2N– <i>Mv</i> BO e por Pt eletrodepositada sobre GPE, em pH 6,0 e 25 °C. Derivada segunda das curvas de redução de O ₂ , mostrando o potencial em que existe a 'máxima aceleração' da reação para ambos os catalisadores
Figura 51	. Efeito de inibição na reação de redução de O2 catalisada por <i>Mv</i> BO, causado por azida, fluoreto, cloreto e cianeto
Figura 52	. Comparação dos deslocamentos dos potenciais catalíticos com o aumento da concentração de inibidor, usando as derivadas das curvas de redução de O ₂ (varreduras no sentido catódico) apresentadas nos gráficos internos dos painéis da Figura 51122
Figura 53	. (A) Gráfico de $1/i_{\text{lim}} vs [X^-]$ para a determinação das constantes de inibição, K_i e (B) gráfico de $i_{\text{lim}} vs \text{ Log } [X^-]$ para determinação dos valores de I_{50} para cada um dos inibidores monovalentes investigados. Valores de i registrados a 340 mV vs SHE123
Figura 54	. Ligação da azida em (A) lacase de CotA e (B) ascorbato oxidase. Os átomos de Cu estão mostrados como esferas marrons (T2 = Tipo 2 e T3 = Tipo 3), água/hidroxila estão mostrados como esferas vermelhas e azida como barras verdes
Figura 55	. Posição de ligação do cloreto na estrutura cristalográfica da lacase de <i>Melanocarpus</i> <i>albomyces</i> . Cobres mostrados em marron, cloreto em verde e oxigênio (ligado entre os dois Cu's T3) em vermelho. A distância de ligação está mostrada em Ångstrøms125
Figura 56	. Efeito do metanol na catálise de redução de O ₂ catalisada pelo filme de A6A2N–MvBO: (A) Cronoamperometrias para registro da variação da corrente em função do tempo e da concentração de metanol. (B) Voltamogramas cíclicos registrados após as cronoamperometrias, para cada valor de [MeOH]
Figura 57	. Comparação das estabilidades de um eletrodo de GPE modificado com A6A2N- $MvBO$ e de um eletrodo modificado apenas por adsorção convencional de $MvBO$ submetidos a 6 séries de 5 varreduras de voltametria cíclica para a redução de oxigênio, em um intervalo de 21 dias de experimento
Figura 58	. Cronoamperometrias do filme catalítico em 100 mV <i>vs</i> ECS, mostrando a dependência da corrente catalíca com a velocidade angular do eletrodo de GPE modificado com A6A2N– <i>Mv</i> BO, sob diferentes concentrações de O ₂ 132
Figura 59	. Cronoamperometria de três estágios para verificação da inibição da <i>Mv</i> BO por excesso de oxigênio em solução133

SUMÁRIO

	RES	UMO	7
	ABS	TRACT	8
	LIST	TA DE TABELAS	9
	LIST	TA DE FIGURAS	10
1	In	trodução	16
-	- 110 - D		10
Z	K	evisao olollografica	19
	2.1	Células a Combustível	20
	2.2	Células a Combustível Biológicas	21
	2.2	2.1 Biocélulas Microbianas	22
	2.2	2.2 Biocelulas Enzimaticas	26
		2.2.2.1 Mecanismos de transferencia de eletrons	27
		2.2.2.2 Sistemas atódicos de biocélulas enzimáticas	35 36
		2.2.2.3.1 Multicobre oxidase como catalisador catódico	38
9	7.		
3	ม	istificativa e Objetivos	41
4	M	etodologia	44
	4.1	Reagentes	45
	4.2	Célula eletroquímica	45
	4.3	Eletrodo de trabalho de grafite pirolítico	47
4.4 Purificação da enzima Bilirrubina oxidase de <i>Myrothecium verruc</i>			
	4.5	Modificação da superfície do eletrodo de trabalho	50
	4.6	Cinética bioeletroquímica	54
	4.7	Eletrodepósito de Pt sobre a superfície do eletrodo de GPE	55
	4.8	Inibicão da catálise de reducão de O2	55
5	R	peultados o Discussão	57
Ő	5 1	Caracterização espectroscópica da MaBO	57
	U .1		50
	5.2	Caracterização eletroquímica da <i>Mv</i> BO	64
	0.2 5 9	2.1 Redução de O ₂ catalisada por <i>MUBO</i> adsorvida em GPE modificado	64
	0.2	5.2.2.1 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho in s	09
		Transformada de Fourier	.tu com
		5.2.2.2 Compostos investigados para imobilização da MvBO	75
	5.2	2.3 Efeitos da velocidade de rotação do eletrodo na corrente catalítica	81
	5.2	2.4 Efeitos da temperatura na corrente catalítica	82
	5.2	2.5 Efeito do pH e do suporte eletródico na corrente catalítica	85
	5.2	Modelagem do efeito de dispersão de taxas de transferência de elétrons	91
	5.3	Caracterização bioquímica do filme de A6A2N– <i>Mv</i> BO	105
	5.4	<i>Mv</i> BO como catalisador mais eficiente que Platina	115

5.5 Estudos de inibição da MvBO	119
5.5.1 Fluoreto, cloreto, azida e cianeto	120
5.5.1.1 Onde os inibidores se ligam?	124
5.5.2 Metanol	127
5.5.3 Inativação <i>da Mv</i> BO por excesso de substrato	130
Conclusões	136
pêndices	140
APÊNDICE A. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar da MvB	0_141
APÊNDICE B. Voltametria cíclica para o acoplamento de Diazônio dos modificadores investigados	144
APÊNDICE C. Derivação da equação de probabilidade para k_0	148
APÊNDICE D. Desenvolvimento da corrente catalítica de redução de C	0 ₂ 149
APÊNDICE E. Descrição do ajuste dos mínimos quadrados não-linear aplicado aos dados de corrente $vs p(O_2)$	151
APÊNDICE F. Derivação da Equação de Michaelis-Menten dependente potencial	do 153
eferências Bibliográficas	156

1 Introdução

No século XX, o desenvolvimento industrial e tecnológico demandou um aumento acentuado do consumo de energia e, em consequência da disputa de mercado, uma má administração desse consumo tem se tornado evidente. Enquanto sinais de diminuição da demanda de energia não surgem, a necessidade de desenvolvimento de fontes renováveis e limpas de energia se faz imprescindível para o progresso social e, principalmente, para a preservação do meio ambiente.¹

Uma possível alternativa para essa problemática são as células a combustível, que são sistemas de conversão de energia química em energia elétrica, tendo como princípio de funcionamento a combustão eletroquímica de um combustível e a redução de oxigênio molecular (O₂), gerando produtos que não prejudicam o meio ambiente. A conversão eletroquímica apresenta eficiências maiores em relação às outras formas de conversão de energia porque não está sujeita às limitações de rendimento impostas pelo ciclo de Carnot inerente às máquinas térmicas. ²

Dentro deste contexto, existe uma tendência à miniaturização e portabilidade de computadores e dispositivos de comunicação. Essas aplicações requerem fontes pequenas e leves de energia, capazes de manter a operação destes dispositivos por longos períodos de tempo. Além disso, os avanços na ciência médica produzem cada vez mais dispositivos elétricos implantáveis para melhoria da qualidade de vida da sociedade (*e.g.* marcapasso). Porém, as células a combustível convencionais não são apropriadas para tais aplicações, por usarem materiais inorgânicos metálicos como catalisadores, ^{3, 4} incompatíveis com os sistemas biológicos. Uma alternativa a esta problemática são as biocélulas a combustível, as quais utilizam recursos da natureza para a geração de energia elétrica. As biocélulas empregam catalisadores e substratos naturais de fontes renováveis, gerando subprodutos que não degradam o meio ambiente durante o processo de conversão de energia. ⁵

Como parte do dispositivo das biocélulas a combustível, a obtenção de um cátodo eficiente para a redução de oxigênio se torna um fator importante. A redução eletroquímica de oxigênio molecular ocorre pela aplicação de altos valores de sobrepotencial (cerca de -0.3 V sobre eletrodo de ouro, em pH 7,0).

Assim, é necessário que se encontre catalisadores capazes de reduzir oxigênio a menores valores de sobrepotencial, para aplicação em biocélulas a combustível, e que proceda com a redução direta do oxigênio a água, sem a formação de peróxido de hidrogênio como etapa intermediária da reação. ⁵

Dentre os catalisadores biológicos empregados na redução de oxigênio molecular no cátodo de células a combustível, as enzimas pertencentes à família das multicobre oxidases são as mais comumente estudadas. Multicobre oxidases são uma família de enzimas definida por suas características espectroscópicas, homologia de sequência de aminoácidos e reatividade. Bilirrubina oxidase, proteína classificada como multicobre oxidase, oferece vantagem sobre as demais enzimas dessa família por ser ativa em maiores valores de pH. ^{6, 7} Dessa forma, encontram-se nesta tese os resultados da investigação da enzima bilirrubina oxidase como catalisador da reação de redução eletroquímica de oxigênio.

Foi desenvolvida uma metodologia de imobilização da enzima sobre a superfície de um grafite pirolítico através do acoplamento dos sais de diazônio de vários compostos orgânicos, permitindo a transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo, sem o emprego de moléculas redox mediadoras de elétrons. Esta metodologia permitiu realizar medições mais detalhadas das características fundamentais da enzima e do sobrepotencial de redução do oxigênio. Foi realizada a caracterização do filme catalítico frente às condições ótimas de temperatura e pH, para possível aplicação em células a combustível, além da caracterização bioeletroquímica da bilirrubina oxidase através da determinação de parâmetros bioquímicos dependentes do potencial eletroquímico aplicado ao eletrodo. Por fim, foi investigada a estabilidade da bilirrubina oxidase e inibição da atividade do eletrodo por haletos, pseudo-haletos e metanol, compostos comumente presentes em biocélulas a combustível.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Células a Combustível

Uma célula a combustível (Figura 1) é um sistema de conversão de energia, que consiste basicamente de dois eletrodos: um ânodo, onde um combustível é oxidado; e um cátodo, onde o oxigênio, geralmente do ar atmosférico, é reduzido. O eletrólito é um meio condutor de íons ³ e, nas células de maior interesse na atualidade, utiliza-se uma membrana trocadora de prótons, como o Nafion[®].



Figura 1. Ilustração esquemática do funcionamento de uma célula a combustível, mostrando o H₂ sendo inserido na célula e oxidado pelo ânodo. Os prótons gerados pela oxidação atravessam o eletrólito polimérico, em direção ao cátodo, enquanto os elétrons fluem através da carga, chegando também ao cátodo. O esquema ilustra ainda o O₂ sendo inserido na célula, reagindo com os elétrons e prótons oriundo da oxidação no ânodo, e gerando água e calor como produtos da reação. Imagem retirada do site http://www.ipen.br/sitio/?idm=59, em 22/06/2010.

Estas células se denominam PEMFC ("Proton Exchange Membrane Fuel Cell") quando operam com hidrogênio. Nestas células, as reações de oxidação de hidrogênio e de redução de oxigênio ocorrem a potenciais bem diferentes, o que permite a realização de trabalho útil pelos elétrons envolvidos, desde que a configuração seja conveniente. Os eletrodos das células incorporam platina, pois este é o melhor eletrocatalisador para a oxidação de hidrogênio, a qual é uma das reações que apresenta constantes de velocidade muito altas sobre platina (expressas como valor da corrente de troca: 3,16 mA cm⁻² em pH = 0,5) e, portanto, sobrepotenciais baixos. ⁴ A platina não é igualmente efetiva para a redução de oxigênio. Ainda assim, entre os catalisadores conhecidos para essa reação, é um dos que apresentam melhor desempenho.

Além do alto custo embutido na construção e manutenção das células a combustível convencionais, a aplicabilidade destes equipamentos se restringe à geração de energia para sistemas estacionários e/ou móveis de grande porte. Com o avanço da ciência médica, o número de dispositivos elétricos para implantes, como marcapasso cardíaco, o qual trabalha com baterias de lítio-iodo de potência operacional de ~1 μ W e tempo de vida excedendo 10 anos ⁸ tem aumentado consideravelmente, o que requer formas alternativas de conversão de energia elétrica.

2.2 Células a Combustível Biológicas

Dentre os vários tipos de células a combustível, as células a base de componentes biológicos se caracterizam como técnica emergente de conversão de energia. Neste sistema, estão envolvidas a oxidação de compostos orgânicos/biológicos no compartimento anódico e a redução do oxigênio ou outros compostos no compartimento catódico, por meio de biocatalisadores. Nesta configuração, esse dispositivo de conversão de energia elétrica é conhecido como biocélula a combustível.

Células a combustível biológicas têm uma longa história, ^{9, 10} porém, somente nestes últimos anos a atenção tem sido mais voltada para estes dispositivos, os quais utilizam substratos disponíveis de fontes renováveis, convertendo-os em produtos inócuos à natureza e gerando eletricidade. Uma vez que seja possível a utilização de fontes de energia química concentrada, as biocélulas podem ser pequenas e leves, e o combustível pode ser obtido de organismos vivos (*e.g.*, glicose do sangue). As biocélulas usam biocatalisadores para a conversão de energia química em energia elétrica. ^{9, 11-15} Assim como a maioria dos substratos orgânicos proporciona desprendimento de energia ao entrarem em combustão, a oxidação biocatalisada de substratos orgânicos provê uma forma de conversão de energia química em energia elétrica. Vários compostos orgânicos como metanol, ácidos orgânicos ou glicose podem ser usados como substratos no processo oxidativo que ocorre no ânodo, enquanto oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio podem servir como reagentes a serem reduzidos no cátodo.

As possibilidades de aplicação das biocélulas podem ser resumidas em três principais grupos: ¹⁶ (a) implantes, tal como células em microescala implantadas em tecidos humanos ou animais ou células de maiores dimensões, implantadas em vasos sanguíneos; (b) geração de energia proveniente de combustíveis e oxidantes obtidos na natureza, principalmente de seivas e/ou sucos de plantas, e de dejetos humanos e industriais e (c) geração de energia derivada de combustíveis convencionais, incluindo hidrogênio e alcoóis. Esses três grupos de aplicações fundamentais requerem alta densidade de potência e alta estabilidade.

Para o desenvolvimento conveniente desse tipo de sistema de conversão de energia, a estabilidade é um aspecto chave, e as biocélulas a combustível devem apresentar tempos de vida que se estendem de meses a anos para se justificar as aplicações mencionadas. Tal estabilidade é extremamente difícil de ser obtida em sistemas redox envolvendo enzimas e/ou microorganismos, embora a introdução de espécies termofílicas e o uso de técnicas mutagênicas possam promover melhorias futuras nos sistemas.⁵

2.2.1 Biocélulas Microbianas

Uma das primeiras tecnologias desenvolvidas referente à conversão de energia bioquímica em energia elétrica foi a biocélula microbiana, como alternativa à conversão de energia em células convencionais. Palmore *et al.* ¹⁷ relataram os conceitos e desempenhos de várias biocélulas microbianas. Os principais sistemas utilizados nesse tipo de célula são: microorganismos atuando como biorreatores, produzindo substâncias ativas eletroquimicamente (H₂, H₂S, formiato), ¹⁸ ou microorganismos reagindo com algum substrato em que os elétrons envolvidos na reação são transportados para a superfície do eletrodo por intermédio de uma molécula mediadora. ¹⁹⁻²¹

A Figura 2 apresenta dois esquemas de funcionamento de células a combustível microbianas.



Figura 2. Esquema de uma célula microbiana: (a) com biorreator fornecendo combustível separadamente ao compartimento anódico da célula e (b) com o biorreator fornecendo combustível dentro do compartimento anódico da célula.

A célula microbiana mais simples consiste de uma célula a combustível convencional, em que o oxigênio do ar é reduzido no cátodo e, no ânodo, é oxidada alguma substância eletroquimicamente ativa produzida durante o metabolismo respiratório anaeróbico de algum microorganismo, atuando como biorreator. Tal reação metabólica pode ocorrer em um compartimento separado, de tal forma que esta substância eletroativa é transportada para o compartimento em que se encontra o ânodo da célula convencional. Com isso, o ânodo da célula trabalha em um ambiente diferente daquele em que os microorganismos são cultivados, obtendo-se uma combinação entre sistema biológico e células a combustível convencionais, como mostrado na Figura 2A. Uma alternativa se dá com o sistema em que a reação metabólica ocorre diretamente no compartimento anódico, onde os microorganismos são cultivados. Neste caso, as substâncias eletroquimicamente ativas, produzidas durante o metabolismo, alcançam a superfície do eletrodo por difusão ou convecção (Figura 2B). Neste sistema, não há uma combinação entre sistemas biológicos e convencionais, sendo que as condições operacionais do compartimento anódico são regidas pelo processo biológico.

O terceiro sistema utilizando microorganismos funciona por meio da mediação de elétrons de dentro da célula biológica para a superfície eletródica, através de uma molécula mediadora. Esta molécula pode penetrar a membrana celular, interagindo com as substâncias envolvidas no processo metabólico respiratório e capturando os elétrons resultantes da reação celular, por meio de uma reação redox. Em seguida, esta molécula mediadora é excretada da célula e, por difusão, alcança a superfície eletródica, onde é regenerada novamente por outra reação redox, intercambiando elétrons com o eletrodo. Outra forma seria a imobilização do mediador sobre a superfície eletródica, em que as células biológicas, por difusão, aproximam-se e interagem com o mediador que, em seguida, transfere os elétrons da célula para o eletrodo. Por fim, as moléculas mediadoras podem ser adsorvidas sobre a membrana celular, sendo que os elétrons são transferidos para os mediadores através da membrana e, por difusão, o conjunto células biológicas/mediadores adsorvidos interagem com a superfície do eletrodo, promovendo o intercâmbio eletrônico. A Figura 3 representa um esquema dos mecanismos de transferência de elétrons por mediadores, em células microbianas..

A Tabela 1 mostra alguns exemplos de microorganismos utilizados em células microbianas e operando com diferentes moléculas mediadoras e diferentes substratos.



Figura 3. Mecanismos de transferência de elétrons para sistemas usando microorganismos e mediadores de elétrons: (A) mediador imobilizado na superfície do eletrodo; (B) interpenetração do mediador através da membrana da célula e difusão para a superfície do eletrodo; (C) mecanismo de transferência de elétrons com o mediador adsorvido na membrana da célula.

Tabela 1 - Exemplos de células microbianas utilizando mediadores no acoplamento) da
transferência intracelular de elétrons às reacões eletroquímicas no ânodo. ª	

Microorganismo	Substrato nutricional	Mediador	Tensão da biocélula	Corrente ou densidade de corrente	Ânodo ^c	Ref.
Pseudomonas methanica	CH_4	1-Naftol-2- sulfonato indo- 2,6-diclorofenol	5–6 V (ca) ^d	2,8 μA cm ⁻² (a 0,35 V)	Pt-black, 12,6 cm ²	22
Escherichia coli	Glicose	Azul de Metileno	0,625 V (ca)	-	Pt, 390 cm ²	23
Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Escherichia coli	Glicose	Tionina	0,64 V (ca)	0,8 mA (a 560 Ω)	Carbono vítreo reticulado, 800 cm ²	24
Proteus vulgaris	Glicose	Tionina	350 mV (a 100 Ω) ^b	3,5 mA (a 100 Ω)	Carbono vítreo reticulado, 800 cm ²	25
Proteus vulgaris	Sucrose	Tionina	350 mV (a 100 Ω) ^b	3,5 mA (a 100 Ω)	Carbono	26
Escherichia coli	Glicose	Tionina	390 mV (a 560 Ω) ^b	0,7 mA (a 560 Ω)	-	27
Lactobacillus plantarum, Streptococcus lactis	Glicose	Fe(III)EDTA	0,2 V (ca)	90 μA (a 560 Ω) ^b	-	28
Erwinia dissolvens	Glicose	Fe(III)EDTA	0,5 V(ca)	0,7 mA (a 560 Ω) ^b	-	28
Proteus vulgaris	Glicose	2-Hidroxi-1,4- naftoquinona	0,75 V (ca)	0,45 mA (a 1 kΩ)	Feltro de grafite, 1g (0,47m ² g ⁻¹)	29
Escherichia coli	Acetato	Vermelho Neutro	0,25 V (ca)	1,4 μ A cm ⁻² (cc) ^e	Grafite, 100 cm ²	
Escherichia coli	Glicose	Vermelho Neutro	0,85 V (ca)	17,7 mA (cc)	Feltro de grafite, $12 g (0,47m^2 g^{-1})$	30
Escherichia coli	Glicose	2-Hidroxi-1,4- naftoquinona	0,53 V (a 10 kΩ)	$0,18 \text{ mA cm}^{-2}$ (cc)	Carbono vítreo, 12,5 cm ²	21

a Na maioria dos estudos, o ânodo da biocélula foi conjugado a um cátodo convencional de O2.

b Valor calculado a partir de outros dados, usando Lei de Ohm.

c Área geométrica do ânodo foi assumida como área da superfície.

d Medidas de circuito aberto (ca).

e Medidas de curto-circuito (cc).

Embora as pesquisas com células a combustível microbianas se mostrem bastante promissoras, ainda existem fatores importantes a serem resolvidos e que impedem um rendimento e utilização favoráveis deste dispositivo como a produção de grande quantidade de biomassa pela constante fermentação biológica, envolvendo inúmeros processos fisiológicos.

2.2.2 Biocélulas Enzimáticas

Todos os processos fisiológicos responsáveis pelo mecanismo de conversão de energia bioquímica em outra forma de energia envolvendo microorganismos são conduzidos por reações catalisadas especificamente por enzimas redox. Estas enzimas podem ser extraídas destes microorganismos, além de vários tipos de plantas e fungos, e purificadas, com o intuito de serem utilizadas diretamente no processo de conversão de energia. ^{31, 32} Em lugar de se utilizar todos os recursos e condições necessárias para o funcionamento de uma célula a combustível microbiana, é possível o emprego direto das enzimas que atuam dentro destes microorganismos (Figura 4). Para tanto, é necessário que se estabeleça uma "comunicação eletrônica", isto é, um caminho para a transferência de elétrons entre as enzimas e o suporte eletródico do compartimento da célula, caracterizando assim uma célula a combustível enzimática.

A construção deste dispositivo se dá pelo emprego de enzimas capazes de catalisar a oxidação de substratos (*e.g.* glicose, frutose, alcoóis) atuando como combustíveis no processo de geração de corrente elétrica no compartimento anódico, ao passo que enzimas que catalisam a redução de agentes oxidantes (*e.g.* peróxido de hidrogênio, oxigênio molecular) podem ser empregadas no compartimento catódico da célula, capturando elétrons do suporte eletródico, fechando o circuito e gerando trabalho elétrico. Entretanto, apesar deste dispositivo não apresentar todas as restrições impostas pelas condições de funcionamento existentes nas células microbianas, ainda há o problema de se estabelecer um contato elétrico efetivo entre os componentes de cada compartimento da célula. Devido ao impedimento estérico causado pelos resíduos de aminoácidos presentes na estrutura quaternária das enzimas, torna-se difícil o

intercâmbio de elétrons entre o sítio ativo das enzimas e a superfície do eletrodo.³³ Sendo assim, várias formas de transferência de elétrons têm sido estudadas a fim de se melhorar o desempenho das células a combustível enzimáticas.



Figura 4. Ilustração esquemática de uma célula a combustível enzimática, mostrando a aplicação de uma hidrogenase como catalisador da oxidação de H_2 a H^+ e uma multicobre oxidase como catalisador da redução de O_2 a H_2O . A linha tracejada simula a separação física entre cátodo e ânodo.

2.2.2.1 Mecanismos de transferência de elétrons

Durante as quatro décadas passadas, muitos métodos têm sido propostos e investigados no campo da tecnologia bioeletroquímica no intuito de se estabelecer uma comunicação elétrica eficiente entre biocatalisadores e matrizes eletródicas. ³⁴⁻³⁸ Em geral, a transferência de elétrons é classificada em dois diferentes mecanismos: transferência direta de elétrons (TDE) e transferência mediada de elétrons (TME), como esquematizado na Figura 5.



Figura 5. Mecanismos de transferência de elétrons em células a combustível enzimáticas: (a) Transferência direta de elétrons (*tunneling mechanism*) da superfície do eletrodo diretamente ao sítio ativo da enzima; (b) Transferência de elétrons via mediador redox.

No mecanismo de transferência direta de elétrons (TDE), o elétron é transferido do eletrodo para a molécula de substrato (ou vice-versa) através do centro ativo da enzima. Em tal sistema, o processo total é a transformação do substrato em produto ao reagir com a enzima que, por sua vez, interage com a superfície do eletrodo, transferindo elétrons. Esse processo pode ser considerado como um processo eletródico catalisado por enzima. De acordo com este mecanismo, a superfície do eletrodo age como um co-substrato na reação, sendo que as enzimas são oxidadas pela reação bioquímica com o substrato e reduzidas eletroquimicamente na superfície do eletrodo (no caso de uma reação de redução de substrato – reação catódica), sendo regeneradas constantemente por esse processo. As reações enzimáticas e eletródicas não podem ser consideradas como separadas, mas sim como estágios formais do mecanismo da reação biocatalisada. Uma grande quantidade de enzimas tem capacidade de realizar tal processo, sendo algumas delas o citocromo c, peroxidase, ferredoxina, plastocianina, azurina, azotoflavina e glicose oxidase. ^{39, 40} Estudos de TDE requerem uma base eletroquímica para a investigação dos mecanismos das transformações redox das proteínas e dos processos metabólicos envolvendo essas transformações. Várias enzimas oxidoredutase têm sido estudadas na catálise de transferência direta de elétrons: lacase, lactato desidrogenase, peroxidase, hidrogenase, p-cresolmetilidroxilase, metilamina desidrogenase, succinato desidrogenase, fumarato redutase, D-frutose desidrogenase, álcool desidrogenase e D-gliconato desidrogenase. ⁴¹

Entre as oxidoredutases, as de maior interesse são aquelas capazes de reduzir o oxigênio molecular, oxidar hidrogênio, alcoóis e açúcares e transformar peróxidos. A peroxidase é conhecida na catálise oxidativa de uma gama de polifenóis e poliaminas aromáticas e a lacase, uma oxidase contendo cobre na estrutura aromática, exibe especificidade similar à apresentada pela peroxidase⁴² e é conhecida por catalisar a oxidação dos substratos orgânicos através da redução do oxigênio molecular, formando água. Essas moléculas são importantes na geração de sinais em biossensores e geração de corrente elétrica em biocélulas a combustível.

A eficiência nas reações de oxidação e redução dos substratos por meio da catálise enzimática depende não somente de fatores estruturais, mas também da configuração dos eletrodos e da forma física na qual se encontram os componentes do sistema. A redução eletrocatalítica do oxigênio na superfície do eletrodo pela lacase imobilizada é muito dependente da orientação da enzima e do método de imobilização.^a A imobilização física não causa mudança nos potenciais de redução do oxigênio, porém, a imobilização das enzimas por ligações covalentes

^a Define-se aqui, e usado ao longo de todo o texto, o termo "orientação da enzima" como a organização das moléculas de enzima com relação à distância entre seu sítio ativo e a superfície do eletrodo. Pelo fato da enzima apresentar geometria assimétrica e a posição do sítio ativo não ser concêntrica à enzima (*i.e.* não se trata de uma esfera perfeita, com sítio ativo no centro dessa esfera), a distância entre a 'porta de entrada de elétrons' na enzima e a superfície do eletrodo depende da orientação da molécula de enzima sobre a superfície do eletrodo com relação à posição do sítio ativo (*vide* Figura 40 para melhor compreensão). Dessa forma, a orientação mais favorável é aquela cuja distância entre sítio de tunelamento de elétrons da proteína e superfície do eletrodo seja a menor possível.

na superfície eletródica pode causar deslocamentos de até 300 mV nos potenciais de redução, ⁴³ devido à forte interação entre enzima e eletrodo proporcionada pela orientação e organização das enzimas sobre a superfície, causada pela formação das ligações covalentes. Portanto, um estudo minucioso das formas de imobilização das enzimas sobre a superfície do eletrodo é primordial.

No mecanismo de transferência mediada de elétrons (TME), uma espécie redox ativa de baixa massa molar, referida como mediador, é introduzida no sistema com a finalidade de intercambiar elétrons entre o centro ativo da enzima e o eletrodo. ⁵ Neste caso, a enzima catalisa a oxidação ou redução do mediador redox. A transformação reversa (regeneração) do mediador ocorre na superfície do eletrodo, por transferência elétrons eletroquimicamente. As principais características dessa transferência por mediadores são: (a) o mediador age como um co-substrato para a reação enzimática e (b) a transformação eletroquímica do mediador na superfície do eletrodo é reversível. Nestes sistemas, o processo catalítico envolve a transformação enzimática do primeiro substrato (combustível ou oxidante) e do segundo substrato, ou co-substrato/mediador. A regeneração do mediador na superfície do eletrodo deve acontecer em baixos valores de sobrepotencial.

Os mediadores podem estar presentes no sistema livres em solução (Figura 5), aprisionados em uma membrana, ⁴⁴ imobilizados em uma matriz junto ao biocatalisador ^{45, 46} ou covalentemente ligados à superfície do eletrodo ou rede polimérica, ^{34, 47} em que o polímero pode ser condutor ou isolante. ^{48, 49}

Alguns dos mediadores mais utilizados em células enzimáticas são apresentados na Tabela 2 para reações de redução de oxigênio e na Tabela 3 para oxidação de glicose.

Mediador	Estrutura Molecular	Potencial	Taxa de	Ref.
		Redox (V) ^a	Redução de O ₂ (A cm ⁻²) ^{a,b}	
2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina- 6-sulfonato) (ABTS)		0,66, pH 4; 0,72, pH 7	5 × 10 ⁻⁴ (0,43 V, pH 7 fosfato) ^{c,e}	50- 52
Poli{ <i>N</i> -vinilimidazol [Os(terpiridina) (4,4'-dimetil- 2,2'-bipiridina)] ^{2+/3+} }	CH ₃ CH ₃ C	0,79, pH 5	1 × 10 ⁻² (0,62 V, pH 5 citrato) ^{c,e}	53, 54
Poli{N-vinilimidazol [Os(4,4'-dicloro- 2,2'-bipiridina) ₂ Cl] ^{+/2+} -co-acrilamida}	$(C_{1})^{*} (C_{1})^{*} (C_{$	0,58, pH 7.4	9 × 10 ⁻³ (0,55 V, pH 7 fosfato) ^{c,f}	55- 57

Tabela 2 – Exemplos de mediadores redox para aplicação em sistemas catódicos.

^a Potencial *vs* SHE. ^b Suportes de carbono de alta área superficial em tampão saturado com O₂. ^c Catalisada por bilirrubina oxidase em presença de cloreto. ^d Catalisada por lacase na ausência de cloreto. ^e Agitação moderada por borbulhamento de gás. ^f Agitação forte por rotação do eletrodo de disco rotatório a 4000 rpm.

Mediador	Estrutura Molecular	Potencial Redox (V) ^a	Taxa de oxidação de glicose (A cm ⁻²) ^{a,b}	Ref.
Poli{N-vinilimidazol [Os(4,4'- dimetil- 2,2'-bipiridina) ₂ Cl] ^{+/2+} -co-acrilamida}	$H_{3}C$	0,32 pH 5; 0,17 pH 7,2	2×10^{-4} (0,5 V, pH 5 citrato)	58, 59
Poli{N-vinilpiridina [Os(4,4'-dimetoxi- 2,2'- bipiridina) ₂ Cl] ^{+/2+} }	H_3C CI H_3C H_3C CH_3 H_3C CI H_3C CH_3 H_3CO H	0,15 pH 7,4	6,5 × 10 ^{−4} (0,37 V, pH 7,4 STF) ^c	57, 60
Poli{N-vinilimidazol [Os(4,4'- diamino- 2,2'- bipiridina)2Cl]+/2+}	$H_{2}N$	0,06 pH 7,4	1.7×10^{-4} (0.22 V, pH 7,4 STF)	56
Poli{ <i>N</i> -vinilpiridina [Os(<i>N,N</i> '-dialquilado- 2,2'-biimidazol) ₃] ^{2+/3-} }	H_2N H_2N H_2N H_3C	0,02 pH 7,2	3,2 × 10 ⁻⁴ (0,22 V, pH 5 citrato)	47, 61, 62
	$H_{3}C$ N			

Tabela 3 – Exemplos de mediadores poliméricos redox para aplicação em sistemas anódicos

^a Potencial vs SHE.
^b Concentração de glicose de 15 mmol L⁻¹, 37 °C.
^c STF = solução tampão fosfato, tipicamente 20 mmol L⁻¹ de tampão fosfato com 0,1 mol L⁻¹ de NaCl.

2.2.2.2 Sistemas anódicos de biocélulas enzimáticas

As enzimas capazes de oxidar substratos para as reações anódicas são as pertencentes às classes das oxidases e desidrogenases, e.g. glicose oxidase, glicose desidrogenase, lactato desidrogenase, álcool desidrogenase e devem estabelecer um contato elétrico efetivo com a superfície do eletrodo, por intermédio de uma molécula mediadora e/ou através de imobilização sobre a superfície do eletrodo. Para isso, são necessárias ferramentas e metodologias específicas as quais permitam estabelecer a comunicação desejada. ³⁴ Além da utilização mediadores de elétrons (electron relays), também são realizadas modificações químicas na estrutura periférica das enzimas através de ligações de funções ferroceno pendentes em cadeias moleculares flexíveis de oligosacarídeos da estrutura quaternária das enzimas. ⁶³ A formação de uma estrutura hidrofílica permite uma eficiente comunicação entre o centro redox e a superfície do carbono vítreo. Essas funções ferroceno penetram a estrutura da enzima, funcionando como uma espécie de "ponte" para a transferência de elétrons entre o centro redox e a superfície do eletrodo.

A grande maioria das enzimas empregadas no processo de oxidação dos combustíveis utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺ e NADP⁺) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como cofatores ou mediadores durante o processo metabólico. A enzima glicose oxidase (GOx) é uma flavoenzima, ou seja, tem como cofator uma molécula de FAD. ⁶³⁻⁶⁹

Willner *et al.* ⁷⁰ desenvolveram uma metodologia para modificar a superfície de um eletrodo de ouro através da formação de uma monocamada constituída por moléculas orgânicas responsáveis pela imobilização, mediação de elétrons e ativação da enzima GOx. Essa metodologia consiste na reconstituição da Apo-enzima pelo cofator FAD, previamente imobilizado na superfície do eletrodo através de uma ligação covalente com a molécula mediadora de elétrons (pirroloquinolina quinona – PQQ). O processo inicia-se com a adsorção de uma molécula de cistamina (2,2'-diaminodietildisulfeto) sobre a superfície de um eletrodo de ouro. Em seguida, a pirroloquinolina quinona (ácido metoxatina, 4,5-diidro-4,5-dioxo-1H-pirrolo-[2,3-f]-quinolina-2,7,9-tricarboxílico) é covalentemente ligado à cistamina pela formação de uma ligação peptídica na presença de uma

carbodiimida (EDC – 1-etil3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida). ⁷¹ A ligação entre N^6 -(2-aminoetil)-FAD⁺ e PQQ é conduzida pela incubação do eletrodo modificado em uma solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹, pH = 7,3, na presença de EDC e de N^6 -(2-aminoetil)-FAD⁺. Por fim, o eletrodo resultante é incubado em uma solução contendo a Apo-enzima GOx, promovendo a interação entre a enzima e o cofator FAD de tal sorte que todas as enzimas apresentam a mesma orientação (mesma distância entre sítio ativo e superfície do eletrodo), favorável tanto para a interação das enzimas com o substrato quanto para a transferência de elétrons da monocamada em direção à superfície do eletrodo (Figura 6).

A Integração das curvas voltamétricas referentes às transformações redox PQQ/PQQH₂ e FAD/FADH₂ revelaram concentrações de 5.5×10^{-10} mol cm⁻² para as duas moléculas. Experimentos com Microbalança de Cristal de Quartzo permitiram verificar a imobilização de 1.5×10^{-12} mol cm⁻², consistente com o valor máximo calculado para imobilização da enzima (1.7×10^{-12} mol cm⁻²). A metodologia desenvolvida proporcionou alta taxa de eletrooxidação de glicose, alcançando o limite teórico para a máxima imobilização de enzimas. ⁷⁰ Além disso, a funcionalização do eletrodo proporcionou uma redução drástica das interferências na corrente anódica causada pelo O₂ solubilizado no eletrólito e aumentou tanto a seletividade quanto a cinética da reação se comparado com o processo realizado com as enzimas em solução.

Essa mesma metodologia foi empregada durante a funcionalização de um eletrodo de ouro pela enzima NAD⁺-dependente lactato desidrogenase (LDH). ⁷² O método é baseado na ligação do mediador PQQ a uma molécula de cistamina, imobilizada na superfície de um eletrodo de ouro, seguida da ligação peptídica entre uma função carboxila vacante do PQQ com N^6 -(2-aminoetil)-NAD⁺. A enzima LDH interage associativamente com o NAD⁺ por afinidade eletrônica.



Figura 6. (a) Reconstituição da Glicose oxidase (GOx) sobre uma monocamada de PQQ/FAD em Au (área geométrica de 0,4 cm², fator de rugosidade de 10). (b) Voltamogramas cíclicos da GOx imobilizada ao eletrodo modificado: (1) na ausência de glicose; (2) com 80 mmol L⁻¹ de glicose. Tampão fosfato de sódio, pH 7,0, atmosfera de argônio, 35 °C. Velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. Gráfico interno mostra a curva de calibração para a corrente (medida por cronoamperometria a 0,2 V *vs* ECS) em diferentes concentrações de glicose. Informação retirada da Figura 6 da referência [5].

2.2.2.3 Sistemas catódicos de biocélulas enzimáticas

A redução biocatalítica de oxidantes (*e.g.*, oxigênio molecular, peróxido de hidrogênio) tem atraído menos atenção em comparação à oxidação biocatalítica de combustíveis. Apesar disso, com o intuito de se construir uma biocélula a combustível, é essencial configurar um cátodo funcional para a redução do oxidante e que esteja acoplado ao ânodo de tal forma a permitir um fluxo otimizado de corrente elétrica. Cátodos convencionais para a redução de oxigênio usados em células a combustível geralmente não são compatíveis com os ânodos biocatalíticos, já que uma boa eficiência operacional do cátodo requer alta temperatura e pressão. Assim, os processos biocatalíticos redutivos no cátodo deveriam ser considerados como uma estratégia para se configurar uma célula a combustível funcional baseada em biomateriais, como enzimas e células bacterianas.

As enzimas capazes de reduzir O2 com considerável eficiência são conhecidas como Multicobre oxidases, as quais catalisam a redução de oxigênio molecular, gerando água, a partir da oxidação de compostos orgânicos aromáticos (veja discussão detalhada sobre as Multicobre oxidases na seção 2.2.2.3.1). Numerosos artigos descrevem reações de transferência direta de elétrons (transferência não mediada) de 'blue' Cu oxidases adsorvidas sobre vários 73 - 87eletrodos. mas os resultados e respectivas interpretações variam Primeiramente, consideravelmente dos outros. existem variacões uns importantes na forma como os experimentos são conduzidos. A maioria dos estudos tem sido feita com macroeletrodos estacionários 75, 77, 80, 81, 83, 85, 86, 88, 89 ao invés de microeletrodos ou eletrodos de disco rotatório. Um problema que surge nessa configuração experimental é que 'blue' Cu oxidases são enzimas muito ativas e o formato da curva eletrocatalítica em um macroeletrodo estacionário é fortemente influenciado pelo transporte de massa do substrato, o que mascara e características intrínsecas propriedades das enzimas. Reacões em macroeletrodos estacionários podem resultar em curvas com perfis sigmoidais dependentes da cinética de transporte de massa intrínseca à enzima. 90 Limitações na corrente catalítica devido ao transporte de massa são ainda mais importantes e evidentes em baixas concentrações de substrato. Dessa forma,

36
torna-se difícil resolver parâmetros cinéticos como os de Michaelis-Menten – frequência de turnover e constante de Michaelis-Menten $K_{\rm M}$ (e suas dependências com o pH) ^{77, 78, 86} – pelo fato da corrente limite não refletir a real atividade enzimática. Embora frequentemente considerados como empíricos, os parâmetros de Michaelis-Menten são muito informativos: em apenas um caso a atividade eletroquímica de uma *'blue'* Cu oxidase adsorvida (uma lacase de fungo) foi analisada em termos de $K_{\rm M}$ e corrente como função do pH, embora nesse estudo não tenha sido usado um eletrodo de disco rotatório. ⁸² Outras condições importantes e que devem ser consideradas nos estudos são que, em alguns casos, as enzimas estão dissolvidas no eletrólito da célula eletroquímica, difundindo livremente, ^{75, 77, 78, 80} e em outros casos as enzimas estão confinadas na superfície do eletrodo. Essa presença ou ausência de difusão do catalisador deve também ser considerada nos estudos.

A quantificação das enzimas ativas presentes na superfície do eletrodo também é uma tarefa difícil e de pouca confiabilidade. Em alguns casos, picos voltamétricos são observados, sob condições anaeróbicas, que têm sido atribuídos ao intercâmbio não-catalítico, reversível, de elétrons (non-turnover) com centros redox individuais da enzima. 77, 82, 85, 86, 88 A partir de tais sinais não-catalíticos, é possível determinar o recobrimento da superfície eletroativa por integração das curvas, usando esse valor para estimar as frequências de turnover. Entretanto, para se determinar o recobrimento eletroativo por integração dos sinais de picos reversíveis não-catalíticos é necessário realizar experimentos com rampa linear analógica, em lugar de rampa digital staircase, como é usado normalmente em instrumentos digitais. ⁹¹ Além disso, ainda é muitas vezes difícil de distinguir tais sinais voltamétricos não-catalíticos de sinais oriundos de componentes redox ativos que não estão associados à atividade catalítica da enzima. Outros métodos para determinação do recobrimento da superfície, como microbalança de cristal de quartzo, não diferenciam enzimas eletroquimicamente ativas de outras espécies que podem se adsorver juntamente. ⁷⁴ Em geral, nenhum estudo tem evidenciado o efeito da pureza da enzima na modificação da superfície. 74, 77, 84 A homogeneidade da enzima pode ser de extrema importância se componentes nãoativos se adsorvem preferencialmente na superfície do eletrodo.

2.2.2.3.1 Multicobre oxidase como catalisador catódico

Dentre os catalisadores biológicos empregados na redução de oxigênio molecular no cátodo de células a combustível, as enzimas pertencentes à família das multicobre oxidases são as mais comumente estudadas. Multicobre oxidases são uma família de enzimas definida por suas características espectroscópicas, homologia de sequência de aminoácidos e reatividade. As enzimas mais bem caracterizadas são lacase, ceruloplasmina, e ascorbato oxidase, mas mais recentemente outras multicobre oxidases foram caracterizadas, como bilirrubina fenoxazinona sintase, diidrogeodina oxidase, 95 oxidase, 6, 7, 92-94 Fet3p, 96 e CueO, ^{98, 99} sulocrina oxidase 97 uma proteína cobre homeostase de Escherichia coli. Multicobre oxidases possuem quatro átomos de cobre formando o sítio ativo das enzimas, as quais são originalmente caracterizadas pelos tipos de átomos de cobre que contêm. Em geral, os tipos de átomos de cobre que compreendem o sítio ativo das multicobre oxidases são o Tipo 1 (T1) ou "cobre azul" (blue copper), Tipo 2 (T2) "normal" ou "cobre não azul" (non-blue copper), e Tipo 3 (T3) ou "centro binuclear acoplado" (coupled binuclear centre). ^{100, 101} A absorção de UV/Vis do Cu T1 surge da transferência de carga ligante-metal (ligand-to-metal charge transfer – LMCT) do enxofre da cisteína ligada ao átomo de cobre T1 (Figura 7). Os átomos de cobre T1 e T2 apresentam sinais ativos de EPR devido à configuração d⁹ e consequentes spins desemparelhados. Ambos ⁶³Cu e ⁶⁵Cu têm spin I = 3/2 e acoplam ao spin do elétron para gerar um splitting hiperfino de 2I + 1 no espectro de EPR. Quando cobre(II) é reduzido à configuração d10, todos os elétrons estão emparelhados e, portanto, cobre(I) não mostra sinal ativo no espectro de EPR. O par de átomos T3 está acoplado antiferromagneticamente com seus spins de elétrons emparelhados e, por isso, não apresentam sinais ativos em EPR. Todas as multicobre oxidases possuem ao menos um Cu T1, embora a enzima ceruloplasmina possua três. 102, 103

A estrutura da lacase CotA de *Bacillus subtilis* (Protein Data Bank code: 1gsk), mostrando os quatro átomos de cobre com a estrutura quaternária, está ilustrada na Figura 7A e a superfície de cargas da enzima pode ser vista na Figura 7B, revelando as regiões da enzima com diferentes afinidades para a interação com moléculas orgânicas de diferentes polaridades.



Figura 7. (A) Estrutura cristalográfica da lacase CotA de *bacillus subtilis* (PDB 1gsk), destacando os quarto átomos de cobre, com o Cu T1 em azul e o grupamento trinuclear Tipo 2/Tipo 3 em marrom. (B) Estrutura cristalográfica da lacase CotA de *Bacillus subtilis* contendo a superfície de cargas da estrutura quaternária da enzima (cargas negativas em vermelho, positivas em azul e neutras, ou apolar, em branco). (C) Sítio ativo da proteína, destacando os aminoácidos ligados ao Cu T1 (cinza), a sequência His-Cis-His ligando Cu T1 ao sítio T2/T3 (magenta) e os aminoácidos ligados aos Cu's T2/T3 (amarelo).

Todas as multicobre oxidases acoplam a oxidação de substratos orgânicos à redução de oxigênio molecular a água, cujo mecanismo será discutido mais adiante. Em termos eletroquímicos, encontram-se conclusões muito divergentes a respeito da forma como os elétrons chegam até o sítio ativo da proteína. Existem propostas em que elétrons entram no sítio ativo da enzima através do átomo de cobre Tipo 1⁷⁵ e outras em que os elétrons são transferidos diretamente para o sítio Tipo 2/Tipo 3, com a enzima orientada de forma que o Cu Tipo 1 esteja

posicionado longe da superfície do eletrodo.⁸¹ Também é proposto que a 'porta de entrada' dos elétrons depende do material do eletrodo, sendo que eletrodos de carbono favorecem a entrada dos elétrons pelo sítio do cobre Tipo 1, ⁷⁸ ao passo que eletrodos de ouro (e ouro modificado) favorecem a transferência direta de elétrons pelo sítio Tipo 2/Tipo 3.^{80, 88} A demonstração mais convincente da entrada de elétrons pelo Cu Tipo 1 foi dada por Kamitaka et al., 75 que compararam as curvas obtidas com Bilirrubina oxidase autêntica (na forma originalmente obtida) com Bilirrubina oxidase mutante M467Q (metionina 467 substituída por glutamina), em que o Cu Tipo 1 é modificado para ter um menor potencial de redução. Nesses experimentos, a enzima autêntica mostrou um início de reação catalítica em altos potenciais, ao passo que a mutante M467Q iniciou a redução catalítica de O₂ em um potencial 0,2 V mais negativo. Mesmo aceitando a concepção de que os elétrons entram no sítio ativo da enzima através do Cu Tipo 1, alguns autores advogam a idéia de transferência intramolecular de elétrons uphill (elétrons precisariam vencer uma barreira energética desfavorável para serem tunelados a partir do Cu T1 em direção aos Cu's T2/T3 do sítio trinuclear), 81, 88 uma sugestão que é totalmente contrária às evidências de que as espécies oxigenadas do sítio Tipo 2/Tipo 3 são altamente oxidantes, e a transferência intramolecular de elétrons é extremamente rápida e espontânea.

Dentre as multicobre oxidases mais estudadas se encontra a enzima Bilirrubina oxidase. Entretanto, as investigações dessa enzima no emprego como catalisador para células a combustível biológicas ainda é escassa. Nesse sentido, este trabalho apresenta a investigação da Bilirrubina oxidase de *Myrothecium verrucaria* (*Mv*BO) como catalisador na redução de oxigênio molecular sobre a superfície de um eletrodo de grafite pirolítico, com eficiência superior à da platina utilizada em células a combustível convencionais. Ao mesmo tempo, é apresentada uma metodologia para acoplamento das moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo de forma simples, possibilitando a transferência direta dos elétrons entre os componentes e permitindo o estudo direto das propriedades da enzima, sem a interferência eletroquímica de mediadores redox e matrizes imobilizadoras.

3 Justificativa e Objetivos

O Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), tem se dedicado ao trabalho de desenvolvimento e estudo de células a combustível desde 1982, destacando-se como um dos mais ativos grupos de eletroquímica do país. Por esta razão, tornase bem estabelecido o interesse do Grupo em expandir suas pesquisas em células a combustível como alternativa aos sistemas tradicionais, voltando sua atenção para novos materiais, alternativos aos atualmente usados à base de platina, como forma de geração de energia. No presente caso, esse interesse se estabeleceu no desenvolvimento e estudo de biocélulas a combustível enzimáticas, empregando proteínas adsorvidas diretamente sobre superfícies eletródicas.

Dada a complexidade das reações envolvidas nas biocélulas enzimáticas e as metodologias conhecidas de construção dos eletrodos, decidiu-se focar o trabalho no desenvolvimento de apenas um dos compartimentos eletródicos do dispositivo. Além disso, devido à menor quantidade de estudos publicados até o presente momento e possibilidade de obtenção de dados ainda nunca investigados, a exploração de uma nova metodologia para imobilização de enzimas capazes de reduzir oxigênio molecular a água, e investigação de suas características para aplicação em células a combustível, se tornou bastante atrativa e, com isso, o foco e objetivos principais desse trabalho.

Estudos recentes envolvendo eletrocatálise de proteínas relacionadas à *'blue'* Cu oxidases, conhecidas como lacases, demonstraram um grande melhoramento da corrente e estabilidade ao se adicionar funções policíclicas aromáticas ao eletrodo de grafite, ^{104, 105} usando a reação de acoplamento de diazônio descrita por Savéant e colaboradores. ^{106, 107} A razão para tais melhoramentos foi atribuída aos grupos aromáticos adicionados à superfície do grafite que auxiliam na imobilização das enzimas na superfície do eletrodo por interação com o sítio de ligação do substrato orgânico natural da enzima, perto do Cu Tipo 1. Porém, o valor ótimo de pH em que as lacases apresentam maior eficiência está abaixo daqueles em que enzimas aplicadas a reações anódicas operam comumente. Dessa forma, tornou-se, também, interessante direcionar o estudo para algum catalisador que possibilitasse excelente eficiência em maiores valores de pH.

Bilirrubina oxidase, proteína classificada como multicobre oxidase (*vide Revisão bibliográfica*) oferece vantagem sobre lacases por ser ativa em maiores valores de pH. Tornou-se, então, interessante investigar como a bilirrubina oxidase poderia ser imobilizada, de forma similar à imobilização da lacase, à superfície do eletrodo, permitindo a transferência direta de elétrons entre os componentes. Também permitiu realizar medições mais claras e detalhadas das características fundamentais da enzima e do sobrepotencial de redução de O₂. Tal estudo requereu a investigação de vários compostos aromáticos, sem o benefício de se ter a estrutura tridimensional detalhada da proteína.

Dessa forma, destacam-se os itens abaixo como objetivos específicos do trabalho, descritos em detalhes nas páginas que se seguem:

- Obtenção de um filme catalítico da enzima bilirrubina oxidase, transferindo elétrons diretamente com a superfície do eletrodo, sem o uso de mediadores;
- Caracterização desse filme frente às condições ótimas de temperatura e pH, para possível aplicação em células a combustível;
- Caracterização bioeletroquímica da bilirrubina oxidase através da determinação de parâmetros bioquímicos dependentes (ou não) do potencial eletroquímico aplicado ao eletrodo;
- Investigação da estabilidade da bilirrubina oxidase e inibição da atividade do eletrodo por haletos, pseudo-haletos e metanol.

4 Metodologia

4.1 Reagentes

Nitrito de sódio (99,5%, Sigma-Aldrich), ácido 6-amino-2-naftóico (A6A2N, 90%, Acros Organics), di-hidrogeno fosfato de sódio monoidratado (99%, AnalaR, BDH), hidrogeno fosfato de di-sódio (99%, AnalaR, BDH), sulfato de amônio (99% Sigma-Aldrich), sulfato de sódio (99% Sigma-Aldrich), ABTS (2,2'-azinobis(3etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) (99%, Fluka) foram usados sem prévia purificação. Água purificada por osmose reversa e troca iônica com resistividade de 18,2 M Ω cm em um sistema de purificação Milli-Q foi empregada para a preparação das soluções. O valor de pH de todas as soluções usadas nas medidas eletroquímicas foi determinado na temperatura em que as medidas foram realizadas. Bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria (MvBO) foi comprada de Amano Enzyme Inc. ("Amano-3"; 2,55 U mg⁻¹).

4.2 Célula eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas usando um Autolab electrochemical analyzer (Eco-chemie, Utrecht, The Netherlands) equipado com potenciostatos PGSTAT10 ou PGSTAT20. A célula eletroquímica, termostatizada com controle de temperatura por fluxo de água dentro de uma camisa acoplada externamente ao compartimento principal da célula, foi ajustada à base de um motor rotatório para controle da velocidade angular do eletrodo de trabalho, como mostrado na Figura 8. O compartimento principal da célula alojava o eletrodo de trabalho (GPE) e um fio de platina usado como contra-eletrodo, além de conectar um compartimento lateral preenchido com 0,1 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, via capilar de Luggin, que alojava o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS). Quando não especificados de outra forma, todos os valores de potencial foram referidos versus eletrodo padrão de hidrogênio (SHE, em inglês), usando a relação $E_{\text{SHE}} = E_{\text{ECS}} + 241 \text{ mV} a 25 °C. ⁹⁰ O₂ puro (industrial grade, Air Products) foi$ inserido no compartimento principal da célula através de uma abertura no compartimento superior e o equilíbrio com a solução foi obtido rotacionando o eletrodo de trabalho por aproximadamente 30 minutos antes de cada experimento, dado que o gás nunca era borbulhado diretamente no eletrólito para não causar perturbação no fluxo laminar do reagente durante as medidas. A densidade de corrente mostrada em cada gráfico foi normalizada usando-se a área geométrica do eletrodo.



Figura 8. Desenho esquematizado da célula eletroquímica utilizada.

4.3 Eletrodo de trabalho de grafite pirolítico

Eletrodos de grafite pirolítico com superfície de borda (*edge*) exposta foram construídos a partir de placas de grafite pirolítico (Momentive Performance Materials Quartz Inc., Strongsville, Ohio, USA). Placas de grafite pirolítico foram cortadas em tiras e usinadas no formato de cilindros (2 mm de diâmetro – 0,031 cm² de face circular) de tal forma que os planos das bordas compreendessem as extremidades do cilindro de grafite. O contato elétrico foi feito por cola de prata entre o grafite e um bastão de aço inox, o qual foi embutido dentro de um cilindro de nylon ou PTFE. O cilindro de grafite foi revestido por resina epóxi (CY1300 e HY1300, Robnor Resins), curado durante 24 h, e o conjunto final do eletrodo foi conectado ao eixo do rotatório (EG&E Princeton Applied Research, Model 636, Ring-Disc Electrode System) para controlar a taxa de rotação do eletrodo (geralmente 2500 rpm). A Figura 9 ilustra o eletrodo de trabalho construído e usado nos experimentos eletroquímicos, além da placa e do cilindro de grafite.



Figura 9. Painel da esquerda: desenho esquemático do eletrodo de trabalho, com o grafite pirolítico conectado à haste de aço, e a superfície *'edge'* exposta para reação. Todo o conjunto do eletrodo de trabalho é referido ao longo de todo o texto por 'eletrodo de GPE' (eletrodo de grafite pirolítico *edge*). Painel da direita: imagem da placa de grafite pirolítico e do cilindro de grafite após usinagem da tira recortada da placa. O cilindro é cortado em 1 cm, sendo uma das faces circulares conectadas à haste de aço e a outra face exposta para realização dos experimentos.

O grafite pirolítico (GP) é formado pelo aquecimento de hidrocarbonetos até sua temperatura de decomposição, em que o grafite cristaliza. ^{108, 109} Esse tipo de grafite não é cristalograficamente perfeito e apresenta defeitos que mantêm os planos de grafeno fixados um com o outro, formando uma 'placa'. 110 GP apresenta geralmente um único plano de clivagem pelo fato das folhas de grafeno cristalizarem numa ordenação planar, diferente das outras formas de grafite que possuem zonas orientadas de forma microscopicamente randômica. A estrutura na forma de camadas significa que existem duas orientações distintas do grafite pirolítico: a orientação basal (GPB) e a orientação de borda ou 'edge' (GPE). A superfície GPB compreende o plano paralelo aos anéis aromáticos das folhas de grafeno e a superfície GPE compreende as faces cortadas perpendicularmente à superfície basal, (Figura 10A). As superfícies GPE são mais reativas que as GPB devido à formação de óxidos e ligação de espécies oxigenadas aos planos de aromaticidade, gerados pela clivagem perpendicular desses mesmos planos.^{111, 112} Muitas enzimas se adsorvem diretamente sobre a superfície GPE, mas não na GPB, por causa da maior quantidade de grupos reativos presentes na superfície GPE.⁸² Superfícies 'edge' abradadas geralmente contém degraus do plano basal, que surgem entre as camadas de grafenos ao atritar a superfície contra uma lixa de alta granulometria (Figura 10B).



Figura 10. (A) Diagrama do grafite pirolítico, mostrando os planos Basal (seta vermelha) e '*Edge*' (seta verde). (B) Diagrama de um plano GPE abradado, mostrando as regiões dos planos '*edge*' (setas verdes) e basal (setas vermelhas).

A Figura 11 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura para as superfícies GPB (painel A) e GPE (painéis B e C) do grafite, mostrando a evidente diferença entre as duas superfícies, e também as alterações físicas causadas à superfície GPE quando submetida a polimento em alumina 0,05 μ m de granulometria. Assim como na superfície GPB, na superfície polida de GPE as moléculas de enzima se adsorvem com menor intensidade, devido não somente à diminuição da área do eletrodo mas também à similaridade física entre a superfície GPB e a GPE após o polimento.



Figura 11. Imagens do grafite pirolítico, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em que foram expostas os planos (A) basal, (B) *edge* e (C) *edge* após polimento com alumina 0,05 μm.

4.4 Purificação da enzima Bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria

Bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria (MvBO) foi purificada a partir do pó comercial por aplicação de uma suspensão (2 mg mL⁻¹ em tampão Tris-H₂SO₄ 50 mmol L^{-1} em pH 7,6) a uma coluna de troca aniônica fraca DEAE-Sepharose CL-6B (ca 2 mL de resina) equilibrada com o mesmo tampão da suspensão, a 4 °C. Após toda a coluna ser carregada com a enzima, a eluição foi feita com um gradiente linear entre 0 e 0.25 mol L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ no mesmo tampão. As frações azuis contendo bilirrubina oxidase foram coletadas, combinadas e submetidas à diálise para transferência das enzimas para um tampão acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 4,5), contendo 1,8 mol L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, usando um filtro Amicon PM-30 (retém moléculas de massa igual ou superior a 30 kDa). Uma banda amarela, não contendo bilirrubina oxidase ativa, permaneceu retida na coluna (Figura 12). Após a diálise, a amostra foi aplicada a uma coluna hidrofóbica HiTrap Phenyl HP, equilibrada com o mesmo tampão acetato, e a eluição foi feita com um gradiente reverso de sal entre 1,8 e 0 mol L^{-1} de (NH₄)₂SO₄. As frações foram, então, coletadas e submetidas à outra diálise para transferência das enzimas para uma solução tampão fosfato de sódio (TFS) 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0, mas as frações não foram combinadas antes ou depois da diálise. Todas as amostras purificadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C. O uso de HCl, NaCl ou qualquer outro sal clorado ou haleto foi evitado em todas as etapas de purificação e durante os experimentos eletroquímicos para evitar inibição das enzimas, como usualmente ocorre em multicobre oxidases.¹¹³



Figura 12. (A) Coluna cromatográfica contendo resina de troca aniônica fraca (DEAE-Sepharose) sem bilirrubina oxidase; (B) Resina logo após a adição da bilirrubina oxidase; (C) Resina após o início da eluição; (D) Frações eluídas da coluna cromatográfica (frações azuis contendo bilirrubina oxidase purificada e amarela contendo impurezas).

4.5 Modificação da superfície do eletrodo de trabalho

Para preparar o sal de diazônio, 956 µL de uma solução 4,2 mmol L⁻¹ de ácido 6-amino-2-naftóico (A6A2N) em 1 mol L⁻¹ de HCl em água/etanol 50:50 foram misturados a 44 µL de uma solução 7,6 mg mL⁻¹ de nitrito de sódio (NaNO₂) em água/etanol 50:50, em banho de gelo, por aproximadamente 5 minutos, convertendo o grupo amina em diazônio (ácido 6-diazo-2-naftóico – A6D2N). Em seguida, 200 µL dessa mistura foram adicionados a 4 mL de eletrólito HCl 0,1 mol L⁻¹ em água/etanol 50:50, ainda entre 0 e 1 °C, resultando em uma solução de 0,19 mmol L⁻¹ do sal de diazônio no eletrólito. A superfície do eletrodo GPE foi então abradada em lixa P400 (Norton Tufbak Durite), lavada com água após sonicação no ultrassom por cerca de 30 segundos, e imersa no eletrólito dentro da célula contendo a solução de diazônio. ¹⁰⁵

O acoplamento do grupo aromático à superfície do eletrodo (descrito em detalhes na seção 5.2.2) é obtido por varredura de dois ciclos seguidos de voltametria cíclica entre 0,5 e -0,3 V (*vs* ECS), a 50 mV s⁻¹, com o eletrodo rotacionando a 2500 rpm (Figura 13). ¹⁰⁵ O eletrodo modificado foi então lavado

com álcool, água e tampão fosfato e, em seguida, 2 µL de MvBO (50 µmol L⁻¹, determinado usando $\varepsilon = 5800$ L mol⁻¹ cm⁻¹ em 600 nm, correspondendo ao total de 10⁻¹⁰ mols de MvBO ¹¹⁴) foram adicionados à superfície na forma de gota (Figura 14, esquema geral da modificação do eletrodo). Aproximadamente 3 minutos de incubação foram requeridos para produzir um resultado final ótimo.



Figura 13. Voltametria cíclica para redução do sal de diazônio (ácido 6-diazo-2-naftóico – A6D2N) sobre a superfície do eletrodo de GPE (linha preta) a 50 mV s⁻¹, 0–1 °C e 2500 rpm, em uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ em água/etanol 50:50, contendo 0,19 mmol L⁻¹ do sal de diazônio. A modificação da superfície se dá por dois ciclos consecutivos de voltametria cíclica. A linha azul representa o voltamograma do eletrodo na ausência do sal de diazônio.



Figura 14. Modificação do eletrodo de trabalho de GPE com moléculas de ácido 6-diazo-2naftóico, por acoplamento de sal de diazônio, obtido da reação de nitrito de sódio com o precursor ácido 6-amino-2-naftóico (A6A2N), para adsorção da *Mv*BO.

O eletrodo resultante (aqui e adiante mencionado como GPE modificado com A6A2N–MvBO) foi então inserido na célula eletroquímica contendo tampão fosfato de sódio (TFS) 0,1 mol L⁻¹ (0–1 °C), saturado com O₂, e voltamogramas foram registrados para a redução eletroquímica do O₂ catalisada por MvBOadsorvida sobre a superfície modificada do GPE. A temperatura foi aumentada para 25 °C e a redução de O₂ foi registrada novamente. Os mesmos experimentos eletroquímicos foram conduzidos para a MvBO adsorvida de forma convencional ao GPE não modificado, e foi observado, de forma consistente, que a corrente catalítica obtida com o eletrodo modificado foi cerca de quatro vezes maior que a corrente resultante da adsorção convencional, sem modificação. Os valores de pH foram verificados sempre na temperatura em que cada experimento era realizado.

Monocristais de Pt(111) e Au(111) (0,0329 cm²), alojados em um dispositivo de eletrodo rotatório (Figura 15), tiveram a superfície de trabalho limpa por meio de aquecimento em chama e imersa em água Milli-Q ultra-pura para prevenir de contaminação. O eletrodo era então transferido para a célula contendo solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em pH 5,8, previamente de-aerada com argônio, para registrar o voltamograma cíclico da superfície limpa, a 50 mV s⁻¹. O eletrólito era então saturado com O₂ e os voltamogramas eram registrados a 5 mV s⁻¹, 20 °C e 900 rpm. O processo de aquecimento em chama do eletrodo foi repetido e um volume pequeno da solução de *Mv*BO (1–2 μ L) foi adicionado à superfície limpa do eletrodo antes de transferi-lo para a célula eletroquímica e registrar a redução catalítica de O₂ por *Mv*BO.



Figura 15. Eletrodos de trabalho constituídos de monocristais de (A) Au(111) e (B) Pt(111). Área geométrica de 0,0329 cm². (C) Menisco formado pelo contato da superfície de trabalho do eletrodo com a solução eletrolítica.

4.6 Cinética bioeletroquímica

Medidas da dependência da redução catalítica com a concentração de O₂, potencial eletroquímico e pH foram realizadas utilizando as mesmas configurações de célula eletroquímica, mas com as proporções dos gases dentro da célula controladas por dois controladores de fluxo de massa (Sierra Smart-Trak Series 100L, Sierra Instruments, Monterey, Calif., USA). Uma taxa de fluxo constante de 1000 sccm (16,67 mL s⁻¹) foi mantida enquanto as proporções relativas de O2 e Ar foram variadas. Um único eletrodo de GPE modificado com A6A2N e MvBO foi empregado para todos os valores de pH estudados. Para cada concentração de O₂, o potencial do eletrodo foi primeiro mantido a um valor constante por 30 minutos, e a corrente de redução foi registrada com relação ao tempo. Ao final de cada cronoamperometria, três ciclos de voltametria cíclica eram registrados. Em seguida, a concentração de O₂ era variada e os dois últimos passos eram repetidos. Na metade e no final de toda a següência de experimentos para as diversas concentrações de O₂, uma cronoamperometria e uma seqüência de três ciclos de voltametria cíclica eram repetidos em 100% de O₂ para permitir que a corrente em cada concentração de O₂ pudesse ser corrigida pela perda de atividade enzimática (ajustada a uma exponencial simples). Um valor de constante de Henry de 1,3 mmol L^{-1} atm⁻¹ foi usado para determinar a concentração de O₂ em solução. A velocidade angular mínima do eletrodo foi de 2500 rpm, empregada como padrão ao longo de todos os experimentos, para assegurar que a corrente fosse essencialmente independente do transporte de massa. Valores de $K_{\rm M}$ e $i_{\rm max}$ foram determinados pelo método dos mínimos quadrados ajustado ao gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk, e empregados para todos os valores de pH e potencial aplicados ao eletrodo. Os parâmetros para o ajuste utilizados foram baseados na precisão das taxas de fluxo dos controladores de fluxo de massa (1% da escala total).

4.7 Eletrodepósito de Pt sobre a superfície do eletrodo de GPE

Para os experimentos de redução de O_2 sobre Pt de alta área superficial, o eletrodo de GPE foi platinizado por eletrodeposição em uma solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , em pH 7,0, contendo 5 mmol L^{-1} de H₂PtCl₆, em temperatura ambiente. O eletrodo de GPE foi rotacionado a 2500 rpm durante a eletrodeposição, a qual foi conduzida por cronopotenciometria a -400 µA por 5 minutos, ou até cessar a variação do potencial com o tempo. Em seguida, o eletrodo platinizado foi imerso em uma solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} para a caracterização da superfície com relação ao comportamento eletroquímico de HSO₄⁻ sobre a Pt, a 25 °C, e também para limpá-la, por meio de voltametrias cíclicas (aproximadamente 25 ciclos) entre -0,3 V e 1,1 V vs ECS, a 20 mV s⁻¹. A solução de eletrólito foi de-areada por 10 minutos com N2 antes de cada experimento. O recobrimento de Pt foi calculado a partir da carga envolvida na oxidação de uma monocamada de monóxido de carbono, a 20 mV s⁻¹, préadsorvida sobre a superfície da Pt a -0.2 V vs ECS, em H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹. O eletrólito foi então substituído por solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em pH 5,0, e saturada com O₂ enquanto o eletrodo era rotacionado a 2500 rpm. A redução de O_2 foi registrada por voltametria cíclica a 5 mV s⁻¹ e 0 °C. Esse procedimento foi repetido em diferentes valores de pH, para o intervalo entre 5,0 e 8,0.

4.8 Inibição da catálise de redução de O₂

Soluções de NaF, NaCl, NaN₃ e KCN para adição na célula eletroquímica foram preparadas pela dissolução dos sais em tampão fosfato de sódio 0,1 mmol L^{-1} em pH 6,0 e 25 °C. Para cada inibidor, foi empregado um intervalo de concentrações distinto, devido às diferenças nas capacidades de inibição dos ânions: 0–10 mmol L^{-1} para N₃⁻, 0–12 mmol L^{-1} para CN⁻, 0–135 mmol L^{-1} para F^- e 0–1,6 mol L^{-1} para CI^- . Alíquotas de cada inibidor, contendo volume e concentração pré-estabelecidos, eram injetadas à solução em intervalos de tempo previamente determinados, e a variação da atividade catalítica era registrada por voltametria cíclica ou cronoamperometria. Oxigênio era inserido na célula de forma constante ao longo de todo o experimento e o eletrodo de trabalho era rotacionado a 2500 rpm.

Para os experimentos com metanol, cada concentração foi preparada separadamente, pela mistura de água/metanol seguindo a percentagem, em massa, de metanol em água referente ao valor da concentração desejada. Em seguida, a mistura era dividida em duas soluções de volumes iguais, sendo a uma delas adicionada o componente ácido do tampão e, à outra, o componente básico. O pH era, então, ajustado ao valor desejado pela mistura dessas duas soluções, na temperatura dos experimentos (25 °C). As concentrações de metanol empregadas foram: 0,311 mol L⁻¹ (1% m/m), 0,93 mol L⁻¹ (3% m/m), 2,155 mol L⁻¹ (7% m/m), 4,56 mol L⁻¹ (15% m/m), 8,908 mol L⁻¹ (30% m/m) e 12,205 mol L⁻¹ (42% m/m).

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização espectroscópica da MvBO

A Figura 16 mostra o resultado da verificação da pureza das amostras, em eletroforese em gel de poli-acrilamida (EGPA), após o processo de purificação da bilirrubina oxidase (descrita na seção 4.4). Foram empregadas diferentes condições às amostras de enzima, variando-se parâmetros como aquecimento, adição de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) e β -mercatoetanol. Em geral, não foi verificada nenhuma diferença entre as amostras de enzima purificada e não-purificada, sendo as enzimas fornecidas comercialmente com alto teor de pureza em relação à presença de diferentes tipos de moléculas como contaminadores. Entretanto, se faz necessária a purificação do material para se separar as moléculas ativas das inativas, presentes na forma de "yellow multicopper oxidases". ¹¹⁵ De fato, é possível observar a separação entre bandas azuis (blue copper enzymes – MvBO) e bandas amarelas (yellow copper enzymes) na coluna cromatográfica, durante o processo de purificação (vide Figura 12 na seção 4.4).



Figura 16. Eletroforese por DSS-EGPA para MvBO purificada e não purificada. Não foram observadas diferenças significativas entre bilirrubina oxidase purificada e não purificada. Eletroforese sob diferentes condições: Poço 1: Marcador (*Kaleidoscope Prestained BioRad*); Poço 2: MvBO pura + DSS + β -mercaptoetanol + aquecimento; Poço 3: MvBO impura + DSS + β -mercaptoetanol + aquecimento; Poço 3: MvBO impura + DSS + β -mercaptoetanol sem β -mercaptoetanol sem β -mercaptoetanol sem β -mercaptoetanol + aquecimento; Poço 6: MvBO pura + DSS sem β -mercaptoetanol + aquecimento; Poço 6: MvBO pura + DSS sem β -mercaptoetanol + aquecimento; Poço 7: MvBO impura + DSS sem β -mercaptoetanol + aquecimento; Poço 9: MvBO pura + DSS + β -mercaptoetanol sem aquecimento; Poço 9: MvBO pura + DSS + β -mercap

Para as amostras que não foram submetidas à desnaturação por aquecimento a 100 °C, não foram observadas bandas referentes a moléculas de diferentes massas moleculares, sugerindo que a MvBO seja uma proteína de extrema estabilidade em ambientes biológicos, devido à resistência à ação de DSS e β -mercaptoetanol, não sofrendo desenovelamento. Por outro lado, as amostras submetidas ao tratamento térmico revelaram bandas em diferentes posições, as quais surgiram pelo desenovelamento da estrutura tridimensional da maior parte das moléculas de enzima, causando o aumento do coeficiente de fricção e alteração dos tempos de retenção (todas as diferentes bandas estão em posições acima das bandas em 64,2 kDa). Além disso, uma pequena fração das moléculas permaneceu enovelada, cujas bandas estão na mesma posição daquelas em que nenhum tratamento térmico foi empregado. Esse comportamento foi observado tanto na presença quanto na ausência de β -mercaptoetanol.

A razão de absorbância A_{280}/A_{600} para a MvBO após a purificação foi 27, quase metade da razão de valor 41 obtida antes das etapas de purificação da proteína. Todas as proteínas absorvem em 280 nm, mas somente enzimas contendo o átomo de cobre Tipo 1 absorvem em 600 nm (transferência de carga Ligante-Metal do enxofre da Cisteína C457 para o Cu Tipo 1, no caso da MvBO). Com a diminuição da razão A_{280}/A_{600} , verifica-se que a quantidade de proteínas presentes como impurezas (yellow copper enzymes) e/ou MvBO desnaturadas, que absorvem em 280 nm mas não em 600 nm, foi diminuída durante as etapas de purificação, como pode ser visto na Figura 17A. Além disso, resultados obtidos com eletrodos GPE para a redução de O₂ catalisada por MvBO adsorvida sobre o grafite, tendo sido modificados ou não por acoplamento de sal de diazônio das funções naftóicas, mostraram maior corrente para eletrodos modificados com MvBO purificada (cerca de 20% - Figura 17B). Não obstante, os mesmos experimentos empregando metais como suporte eletródico resultaram em menores durabilidade do filme e reprodutibilidade dos resultados ao usar enzimas impuras em relação às enzimas purificadas (resultados não mostrados). Como base dos resultados usando metais como suporte, nos experimentos realizados entre 20 e 25 °C para a redução eletrocatalíca de O2 por MvBO não purificada a atividade foi pouco detectada após 30 minutos de reação, ao passo que a atividade da proteína permaneceu detectável por algumas horas quando a enzima purificada era empregada no eletrodo.



Figura 17. (A) Espectro de UV/Vis para a MvBO antes e depois da purificação. A banda de absorção em 600 nm se refere à Transferência de Carga Ligante-Metal (TCLM) entre o enxofre da cisteína 457 (S_{Cis}) e o átomo de cobre Tipo 1 (Cu T1). Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, 25 °C. (B) Comparação do desempenho da redução de oxigênio catalisada por MvBO não-purificada e por MvBO purificada, imobilizadas em eletrodos de GPE modificados de forma idêntica por A6A2N. Condições: 0 °C, tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ em pH 6,0, 2500 rpm, 1 bar O₂.

Para avaliar a atividade das enzimas, foram realizados experimentos de espectroscopia eletrônica de absorção de luz na região do ultravioleta/visível durante a ocorrência da reação entre bilirrubina oxidase e o substrato ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). Foram feitas varreduras de comprimento de onda ao longo do tempo, observando as modificações dos perfis de absorção conforme os produtos de reação eram formados, além de estudos cinéticos, em que o comprimento de onda foi fixado em um determinado valor de interesse, e a variação da absorção foi registrada em função do tempo.

Os espectros de absorção de luz UV para a reação entre bilirrubina oxidase e ABTS estão mostrados na Figura 18. Observa-se a diminuição do pico referente ao ABTS²⁻ em 340 nm e surgimento do pico referente ao produto formado (ABTS^{*-}) em 410 nm.



Figura 18. Espectro de absorção de luz UV para a reação entre bilirrubina oxidase (2,6 nmol L⁻¹) e ABTS (30 µmol L⁻¹) em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 5,0, a 25°C, em função do tempo. Variação da absorção em 340 nm representa o consumo de ABTS⁻² e em 410 nm representa a formação de ABTS^{*-}.

Fixando o monocromador no comprimento de onda de consumo do substrato (340 nm) e registrando a variação da absorbância em função do tempo, foi possível determinar a atividade de cada uma das amostras de enzima. O valor da atividade enzimática foi calculado utilizando a equação (1), ⁵¹

Atividade =
$$\frac{\left\{\frac{-d[Abs]_{340 \text{ nm}}}{dt} \cdot [\epsilon_{ABTS} \cdot b]^{-1}\right\} \cdot 10^{6}}{[Proteína Total (\mu mol L^{-1})]} = X (U \ \mu mol_{Proteina}^{-1})$$
(1)

onde d[Abs]/dt é o coeficiente angular das curvas de absorbância *vs* tempo na faixa de velocidade inicial da reação (entre 5 e 25 segundos iniciais – Figura 19), ε é o valor da absortividade molar do ABTS (3,45 × 10⁴ L mol⁻¹ cm⁻¹) e b é o caminho óptico na cubeta (1 cm).

1 U é definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 μ mol L^{-1} de ABTS por minuto em pH 6,0 e 25 °C.



Figura 19. Variação da absorção de luz UV em 340 nm para o reagente ABTS (30 μ mol L⁻¹) durante reação com bilirrubina oxidase purificada (2,3 nmol L⁻¹), em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 5,0, a 25 °C, em função do tempo.

A concentração total de proteína para as soluções estoque de bilirrubina oxidase purificada e não-purificada foi determinada pela curva de absorção (realizada a 200 nm min⁻¹) para diferentes alíquotas de enzima adicionadas à cubeta, e pela divisão da absorção em 280 nm por 95230 L mol⁻¹ cm⁻¹ (esse valor de coeficiente de extinção molar foi calculado a partir da sequência de aminoácidos da enzima, através do software online ProtParam – Expasy Proteomics Server (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html). Veja APÊNDICE A para maiores detalhes.

Para os ensaios de atividade específica da bilirrubina oxidase referente à oxidação de ABTS, 2 µL de uma solução estoque de bilirrubina oxidase diluída 50 vezes (resultando na concentração de 2,3 nmol L⁻¹ de proteína total dentro da cubeta) foram adicionados a 3 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 e 24 °C, contendo 30 µmol L⁻¹ de ABTS, e a variação da absorção em 340 nm foi imediatamente registrada. A atividade da enzima foi determinada pela taxa de conversão de ABTS^{2–} em ABTS^{*–}, medida pela diminuição da absorção em 340 nm com o tempo. A taxa de diminuição da absorção (inclinação da curva na velocidade incial, entre 5 e 25 segundos) foi então dividida pelo coeficiente de extinção molar do ABTS ($3,45 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹), o comprimento da cubeta (1 cm) e a concentração total de proteína (veja equação (1)). Esse experimento foi repetido por três vezes para ambas as amostras de enzima purificada e não-purificada.

A atividade específica para a MvBO purificada resultou em um valor médio de 2484 U µmol⁻¹ e para a MvBO não-purificada o resultado foi de 1632 U µmol⁻¹. Considerando a massa molecular da enzima (64200 Da), o valor da atividade específica em unidade de massa é 38,7 U mg⁻¹ de proteína total para a enzima purificada e 25,4 U mg⁻¹ de proteína total para a enzima não-purificada. Dessa forma, o procedimento de purificação da proteína aumentou a pureza em 51% a partir da razão das absorções A_{280}/A_{600} , corroborando o aumento de 52% na atividade específica da proteína após purificação.

5.2 Caracterização eletroquímica da MvBO

5.2.1 Redução de O₂ catalisada por MvBO adsorvida em GPE modificado

Bilirrubina oxidase (EC 1.3.3.5 – bilirrubina:oxigênio oxidoredutase), produzida por uma gama de organismos incluindo fungos, bactérias e animais, catalisa a oxidação de alguns tetrapirróis, como a bilirrubina, difenóis e aminas aromáticas, com o O₂ como aceptor de elétrons. Assumindo uma condição em que os elétrons envolvidos na oxidação desses compostos orgânicos sejam fornecidos diretamente por um eletrodo que esteja eletricamente em contato com a enzima adsorvida em sua superfície, o resultado seria a observação da redução bioeletroquímica de O₂ através de uma curva com a forma mostrada na Fig. 20



Figura 20. Correlação entre a curva de redução da enzima sobre a superfície do eletrodo com a referente etapa de reação descrita no mecanismo proposto por Solomom *et al.* ¹¹⁶ e ilustrando como os elétrons fluem da superfície do eletrodo em direção ao átomo de cobre T1 da bilirrubina oxidase.

A bilirrubina oxidase contém um arranjo especial dos quatro átomos de cobre que segue exatamente a mesma estrutura de aminoácidos contida em CotA, ascorbato oxidase, CueO, lacase, ceruloplasmina, Fet3p, e PcoA. ^{7, 42, 117} Baseando-se na estrutura da lacase CotA, o alinhamento da sequência de aminoácidos entre a lacase CotA de *Bacillus subtilis* e a bilirrubina oxidase de *Myrothecium verrucaria* revela uma identidade geral maior 35% e identidade local do sítio ativo ao redor dos átomos de cobre de 100%. ^{96, 118} O átomo de Cu Tipo 1 está localizado a 1,2–1,3 nm do cluster trinuclear formado pelo Cu T2 e os dois cobres T3. A estrutura local compreendendo esse sítio ativo, representado pela Figura 21, é crucial para a extraordinária atividade catalítica das "*blue*" Cu oxidases para a redução de O₂.



Figura 21. Representação tridimensional do sítio ativo da lacase CotA (PDB code:1gsk) e presumido como estrutura do sítio da bilirrubina oxidase. Todos os aminoácidos ligantes são conservados de forma idêntica em MvBO, CotA, Fet3p, CueO, ceruloplasmina, ascorbato oxidase, tree lacase e PcoA. Os números se referem aos resíduos de aminoácidos da MvBO. ^{114, 118} Um aspartato (D105) é proposto como sendo o doador de prótons durante a reação de redução de O₂. Os cobres no cluster trinuclear Tipo 2/Tipo 3 estão representados por esferas na cor marrom. O cobre Tipo 1 está representado pela esfera azul. As esferas vermelhas representam espécies oxigenadas ligadas ao cluster trinuclear.

Os átomos de cobre Tipo 1 e Tipo 3 estão ligados por uma curta sequência Histidina(H456)-Cisteína(C457)-Histidina(H458) que é conservada em *blue* Cu oxidases e pode promover o caminho para a rápida transferência de elétrons entre estes átomos. ¹¹⁹ O Cu Tipo 1 está coordenado por duas histidinas (H398 e H462) e pela cisteína (C457) que está adjacente às histidinas (H456 e H458) que ligam os dois átomos de Cu Tipo 3. O Cu Tipo 1 também está fracamente coordenado a uma metionina (M467) a qual é um fator determinante do potencial de redução do sítio ativo, mas não está presente em todas as *blue* Cu oxidases. ¹²⁰ As coordenações ao redor do cluster Tipo 2/Tipo 3 são compostas somente por histidinas (três ligadas em cada Cu Tipo 3 e duas ligadas ao Cu Tipo 2). Geralmente, esse cluster também está ligado a espécies oxigenadas provenientes da redução de O₂ ou troca com solventes. ^{6, 114} Na estrutura da CotA, um ligante peróxido foi modelado dentro do espaço entre os átomos de Cu Tipo 3. ¹²⁰

Para proteínas 'blue' Cu simples como azurina ou plastocianina, é bem sabido que o centro Tipo 1 realiza rápida transferência de elétrons. ¹²¹ Em 'blue' Cu oxidases, o Cu Tipo 1 está localizado próximo à superfície da proteína e, portanto, é proposto que este átomo serve como aceptor imediato de elétrons dos substratos orgânicos. Os elétrons são transferidos, um de cada vez, para os átomos do cluster Tipo 2/Tipo 3, onde O2 é reduzido a H2O. 116, 122, 123 As mais recentes medidas do potencial de redução do Cu Tipo 1, E°_{T1} , em bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria resultaram em valores de +660 e +670 mV vs SHE, em pH 7,0.¹²⁴ Experimentos em que o potencial de redução do Cu Tipo 1 foi deslocado para valores mais negativos por alteração do sítio de coordenação dos substratos através de mutagenese dirigida mostraram que o E°_{T1} influencia diretamente na determinação do potencial em que a eletrocatálise se inicia. 75, 125 O valor de E°T1 é significante também pelo fato de ainda não ser conhecido o potencial do cluster Tipo 2/Tipo 3, que define, de fato, o potencial de redução de O_2 a H_2O . Estudos espectroscópicos detalhados do mecanismo catalítico conduzidos por Solomon e colaboradores têm identificado dois intermediários altamente ativos que, são produzidos como se segue: (a) O_2 reage com a enzima totalmente reduzida (todos os Cu estão na forma (I)) com constante de reação na ordem de 2 × 10⁶ M⁻¹ s⁻¹, gerando o 'intermediário peróxi' (peroxy-intermediate – PI), onde a molécula de O_2 foi reduzida por dois elétrons e uma das ligações O–O é preservada; (b) PI reage rapidamente para produzir a espécie conhecida como 'intermediário nativo' (*native intermediate* – NI) em que os quatro átomos de cobre estão na forma 2+ e os elementos da molécula original de O₂ se mantêm ligados ao cluster Tipo 2/Tipo 3 como pontes "oxo" e "hidroxo"; (c) o estado totalmente reduzido da enzima pode ser recuperado por transferência rápida de quatro elétrons e quatro prótons, produzindo e liberando duas moléculas de H₂O. O mecanismo acima descrito está representado de forma mais detalhada na Figura 22.



Figura 22. Mecanismo proposto por Solomon *et al.*¹¹⁶ para as etapas reacionais de redução de oxigênio molecular catalisada por multicobre oxidases como lacase, ascorbato oxidase e bilirrubina oxidase.

Uma vez que os dois estados oxigenados PI e NI são altamente reativos e, provavelmente, poderosos oxidantes, seria muito incomum que pudessem ser "titulados" numa condição de equilíbrio. Entretanto, um estado totalmente oxidado (estado de repouso) é conhecido, contendo um único OH- ligado ao cluster Tipo 2/Tipo 3. Esse estado de repouso é formado muito lentamente a partir do NI e recebe elétrons muito lentamente no processo de ativação que gera a enzima totalmente reduzida. Para entender o ciclo catalítico em mais detalhe é importante se questionar como os elétrons são transferidos tão rapidamente para os estados oxigenados através do átomo de Cu Tipo 1.

Em um trabalho recente envolvendo eletrocatálise de redução de oxigênio molecular por uma 'blue' Cu oxidase, lacase, foi demonstrado um nítido aumento da corrente e estabilidade da reação pela adição de funções aromáticas policíclicas à superfície de um eletrodo de grafite usando reação de acoplamento eletroquímico de sal de diazônio, descrita por Savéant e colaboradores. ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ A explicação empregada foi que as funções aromáticas promoveram a fixação da enzima ao eletrodo por interação com o sítio hidrofóbico de ligação do substrato. Bilirrubina oxidase oferece vantagem frente a lacase por ser ativa em valores mais altos de pH e, além disso, despertou-se o interesse em como a enzima poderia se ligar de forma semelhante à superfície do eletrodo, permitindo a transferência direta de elétrons e possibilitando uma melhor caracterização do sobrepotencial de redução de O₂ catalisada pela enzima. Para tanto, foi investigada uma gama de compostos aromáticos para a modificação da superfície do eletrodo GPE, sem o benefício de se ter uma estrutura detalhada da enzima para análise das características do sítio ativo da proteína. Como discutido mais adiante, foi identificada uma molécula em particular (ácido 2-naftóico), baseada na estrutura molecular do substrato bilirrubina, e que foi ligada à superfície "edge" de um eletrodo de grafite pirolítico pela posição '6', promovendo um aumento da adsorção da enzima sobre o grafite. Essa modificação possibilitou um estudo mais profundo sobre a relação corrente-potencial, resultando em alta atividade catalítica. Com o suporte de resultados obtidos em outros eletrodos, como grafite não modificado e Platina, foi possível quantificar propriedades catalíticas da enzima, como o baixo sobrepotencial de redução de O₂.

A Figura 23 mostra os voltamogramas cíclicos da redução de O₂ catalisada por MvBO, medidos em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), a 5 mV s⁻¹, saturado com O₂. Esses experimentos comparam as densidades de corrente obtidas pela enzima simplesmente adsorvida sobre o GPE não modificado, a 0 °C, com as obtidas pela enzima adsorvida sobre a superfície modificada do GPE em 0 °C e 25 °C. A curva em vermelho mostra ciclos sucessivos (3 e 4) para o eletrodo modificado com A6A2N-MvBO a 25 °C, revelando que a resposta eletroquímica é estável. A comparação direta entre as curvas a 0 °C destaca a maior densidade de corrente alcançada por *Mv*BO adsorvida à superfície do GPE modificado com A6A2N. Independentemente de a bilirrubina oxidase ser adsorvida sobre a superfície modificada ou não modificada do eletrodo de GPE, o valor do potencial de circuito aberto medido ao inserir o eletrodo na solução tampão em pH 6,0, saturado com O₂, era 820 mV, apenas 56 mV menor que o potencial termodinâmico de redução do par O₂/2H₂O no mesmo pH (876 mV *vs* SHE). Além disso, o formato da curva de redução é o mesmo para ambos os eletrodos modificado e não modificado.



Figura 23. Redução de O₂ catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida em GPE não modificado e GPE modificado com A6A2N. Dois ciclos são sobrepostos (preto e vermelho) a 25 °C. Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} em pH 6,0 (5 mV s⁻¹ e 2500 rpm). Densidades de corrente normalizadas por área geométrica do eletrodo, 0,031 cm².

5.2.2 Reação de acoplamento do sal de diazônio

A superfície de grafite pode ser modificada por reação com sal de diazoarila pela aplicação de calor ou de um potencial de redução, para formar uma ligação covalente entre a superfície e o grupamento arila, com desprendimento de gás nitrogênio (Figura 24). Reações adicionais podem ser usadas para modificar quaisquer substituintes *meta-* ou *para-* de forma similar.



Figura 24. Formação do sal de diazônio durante a reação com nitrito de sódio e acoplamento à superfície do eletrodo por redução eletroquímica

O sal de diazônio é formado pelo tratamento de aminas primárias com ácido nitroso, como esquematizado na Figura 25. O composto formado é instável quando o substituinte R é um grupamento alquila, que perde imediatamente a função N_{2^+} na forma de gás nitrogênio para formar um carbocátion planar, relativamente estável. Por outro lado, se a função R for um grupamento arila, o carbocátion formado pela perda de nitrogênio é menos estável que o carbocátion planar de alquila, devido à carga positiva ser localizada em um orbital sp² e não delocalizada ao redor do anel aromático. Assim, a perda da função N_{2^+} na forma de gás nitrogênio ocorre muito lentamente, sendo os sais de diazo-arila mais estáveis, ¹²⁶ especialmente a temperaturas baixas entre 0 e 5 °C, como é a condição em que a reação é conduzida nesse trabalho.



Figura 25. Mecanismo da reação de formação do sal de diazônio durante reação com nitrito de sódio.

Esse método tem sido usado para derivar uma ampla variedade de superfícies, incluindo metais como ferro,^{127, 128} ouro, ¹²⁹ paládio, ¹³⁰ ligas de cobre-alumínio, ¹³¹ e semicondutores de silício ^{130, 132, 133} e arseneto de gálio. ¹³⁰ Para carbono, os exemplos são numerosos. Carbono vítreo tem sido modificado muito freqüentemente por essa técnica, ¹³⁴⁻¹⁴² assim como nanotubos de carbono,¹⁴³⁻¹⁴⁶ diamante ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ e várias outras formas de carbono. ^{150, 151}

O acoplamento de diazônio tem sido usado especificamente para imobilizar enzimas a superfícies eletródicas. Carbono vítreo modificado com sais de diazoarila contendo ligantes nitriloacético ou iminodiacético, substituídos na posição para- e quelados com íons Cu(II) ou Ni(II), resultaram em superfícies que se ligam especialmente às histidinas da estrutura quaternária de enzimas, especialmente de horseradish peroxidase. ¹³⁶ Hidrogenase de Desulvibrio gigas foi covalentemente imobilizada em eletrodos de carbono pela formação de uma monocamada de grupos 4-aminofenila que foram estabilizados na superfície do eletrodo por redução eletroquímica do sal de diazônio de 4-nitroanilina e sucessiva redução do grupo nitro. Na superfície da enzima existem vários resíduos de ácido glutâmico que, ao reagir com carbodiimida, formam uma ligação covalente com os grupos amina presentes na superfície do grafite, com uma orientação favorável à transferência direta de elétrons. ¹⁵² De forma similar, um eletrodo modificado com grupamentos 4-fenilacéticos foi ativado por carbodiimida e acoplado à glicose oxidase simplesmente por imersão do eletrodo na solução de enzima. ¹⁵³

5.2.2.1 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho in situ com Transformada de Fourier

A espectroscopia de FTIR *in situ* permite determinar e estudar espécies químicas em solução e/ou adsorvidas sobre o eletrodo. Com esta técnica, pode-se verificar a reação de adsorção do ácido 6-diazo-2-naftóico sobre a superfície do ouro (Au), permitindo identificar o adsorbato e o produto formado.

Os experimentos de FTIR *in situ* foram realizados utilizando-se uma célula espectro-eletroquímica modificada, conforme ilustrada na Figura 26. ¹⁵⁴



Figura 26. (A) Detalhes da célula de infravermelho adaptada para medidas de FTIR *in situ*. (B) Ilustração da configuração de filme fino de eletrólito entre a janela prismática do infravermelho e o eletrodo estabelecido durante a medida. ¹⁵⁴

Este estudo foi realizado utilizando-se uma configuração de camada fina, onde o eletrodo de trabalho (eletrodo de ouro policristalino) é pressionado contra uma janela planar de modo a se formar uma camada fina de eletrólito entre ambos (cerca de 10 µm de espessura), Figura 26B.

Para a obtenção dos espectros realizou-se, inicialmente, a aquisição de um espectro de referência, R_0 , que relaciona a intensidade da radiação que chega ao detector e as freqüências associadas. Este espectro é coletado a um potencial em que não há processos eletroquímicos acontecendo na camada fina (corrente faradáica nula). Os espectros por reflectância foram calculados por R/R_0 onde R representa o espectro da amostra no potencial em estudo e R_0 o espectro da amostra no potencial de referência. O espectro de referência, R_0 , foi coletado em 0,48 V *vs* ECS. Bandas positivas nos espectros são referentes à formação de espécies e bandas negativas referentes ao consumo de espécies.

Neste estudo de varredura de potencial, o eletrodo de trabalho foi polarizado em 0,48 V e saltos potenciostáticos a cada 0,02 V foram realizados no intervalo de potencial entre 0,48 e -0,3 V, acompanhando-se o surgimento e a variação da intensidade da banda de estiramento simétrico Diazo-aromático, $-C=N^{+}=N^{-}$ (1390 cm⁻¹ e 1330 cm⁻¹). A Tabela 4 abaixo apresenta os modos de vibração e as respectivas freqüências.
Frequência (cm ⁻¹)	Espécies
1390	–C=N ⁺ =N ⁻ (estiramento simétrico)
1330	–C=N ⁺ =N ⁻ (estiramento simétrico)
1280	-COOH (Aromático)
1085 - 1030	–OH (Áromático)
890-870	–C–H (Naftaleno substituído)

Tabela 4 – Valores de frequência de estiramento das espécies. ¹⁵⁵

Todos os espectros são normalizados com relação ao R_0 , de forma a revelarem somente as diferenças existentes entre as condições de polarização. Os espectros coletados são uma média de 16 interferogramas com resolução espectral de 8 cm⁻¹. As medidas foram realizadas no espectrômetro Nicolet Nexus 670, com janela planar de ZnSe e equipado com um detector MCT. Este sistema foi acoplado a um potenciostato Solartron.

A Figura 27 mostra a variação dos espectros de infravermelho com a diminuição do potencial aplicado durante a redução eletroquímica para o acoplamento do sal de diazônio sobre a superfície do eletrodo.

O surgimento das bandas em 1329 cm⁻¹ e 1385 cm⁻¹ conforme o potencial aplicado varia de 0,38 V até -0,3V vs ECS evidencia o consumo da espécie -C=N⁺=N⁻, resultante da formação da ligação do carbono na posição '6' do anel de naftaleno com o eletrodo (e consequente alinhamento das moléculas sobre a superfície do eletrodo de ouro) e liberação de N₂ na solução. Ao mesmo tempo em que essas bandas surgem nos espectros, evidenciando a adsorção das moléculas sobre o eletrodo, o perfil da curva de redução do sal de diazônio revela a ocorrência da reação através da corrente catódica observada a partir de 0,38 V (linha vermelha na Figura 27B), em comparação ao branco do eletrodo (linha preta na Figura 27B). Além disso, é possível também observar o surgimento das bandas referentes aos estiramentos descritos na Tabela 4, resultantes da orientação das moléculas na superfície do eletrodo. Vale ressaltar que os estiramentos de -OH aromático em 1085 cm⁻¹ e 1030 cm⁻¹ se referem à molécula do álcool 6-diazo-2-naftol presente como subproduto (10%) do ácido naftóico estudado, como informado pelo fornecedor fabricante.



Figura 27. (A) Espectros de FTIR *in situ* da eletro-redução de 0,19 mol L^{-1} do ácido 6-diazo-2naftóico durante o acoplamento de diazônio sobre a superfície de ouro, em função do potencial. Espectro de referência $R_0 = 0,48$ V *vs* ECS. (B) Redução eletroquímica de 0,19 mol L^{-1} do ácido ácido 6-diazo-2-naftóico por salto potenciostático a cada 0,02 V, 20 segundos em cada potencial. HCl 0,1 mol L^{-1} em água/etanol 50:50.

5.2.2.2 Compostos investigados para imobilização da MvBO

Compostos apresentando baixa polaridade e/ou comprimentos de até um anel aromático, tais como 2-aminoacridina (2AAc), 2-aminocriseno (2Ac), 4aminobenzonitrila (4ABN), 4-aminotiofenol (4ATF), 4-benziloxianilina (4BOA), 1aminoantraceno (1AA)e 2-aminoantraceno (2AA), empregados como modificadores da superfície de GPE para adsorção de MvBO, resultaram em correntes catalíticas menores que aquelas obtidas para a MvBO adsorvida sobre o eletrodo de GPE não modificado. Entretanto, modificadores contendo carboxilas na estrutura, como ácido 4-aminobenzóico (A4AB), ácido 4-aminofenil acético (A4AFA) e ácido 6-amino-2-naftóico (A6A2N), resultaram em maiores correntes eletrocatalíticas em comparação ao eletrodo não modificado, mas em nenhum caso foi observada variação no formato dos voltamogramas para a redução de O₂. Foi, então, selecionado o ácido 6-amino-2-naftóico para todos os experimentos com MvBO devido às mais intensas e estáveis densidades de corrente a proporcionadas por esse composto. A Figura 28 ilustra a estrutura molecular de todos os modificadores empregados no estudo da funcionalização do eletrodo de GPE modificado com MvBO.



Figura 28. Representação das estruturas moleculares dos compostos estudados como modificadores para a superfície de grafite na tentativa de aumentar o recobrimento por *Mv*BO. (1) 1-Aminoantraceno (1AA); (2) 4-Aminobenzonitrila (4ABN); (3) 2-Aminoantraceno (2AA); (4) 2-Aminocriseno (2Ac); (5) 2-Aminoacridina (2AAc); (6) 4-Aminotiofenol (4ATF); (7) 4-Benziloxianilina (4BOA); (8) Ácido 4-Aminofenilacético (A4AFA); (9) Ácido 4-Aminobenzóico (A4AB); (10) Ácido 6-Amino-2-Naftóico (A6A2N).



Figura 29. Comparação entre as curvas de redução de O₂ catalisada por MvBO adsorvida à superfície de GPE modificada pelas moléculas modificadoras representadas na Figura 28: (1) 1AA; (2) 4ABN; (3) 2AA; (4) 2AC; (5) 2AAC; (6) 4ATF; (7) 4BOA; (*) MvBO adsorvida fisicamente, sem modificação; (8) A4AFA; (9) A4AB; (10) A6A2N. A molécula (10) resultou na maior densidade de corrente e mais longa estabilidade, e foi escolhida para a investigação da MvBO. Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, em pH 5,5. Voltametrias cíclicas obtidas a 5 mV s⁻¹, 0 °C e 2500 rpm.

Os voltamogramas para a modificação da superfície de GPE com todas as moléculas investigadas estão ilustrados em detalhes no APÊNDICE B.

A Figura 29 mostra os voltamogramas para a redução de O_2 catalisada por MvBO adsorvida sobre a superfície de GPE (esse eletrodo em especial possuía área de 0,049 cm²) modificada com os compostos empregados na tentativa de se aumentar o recobrimento com a enzima. Claramente, observa-se a grande densidade de corrente obtida pelo eletrodo modificado com a molécula de Ácido 6-Amino-2-Naftóico (A6A2N), e escolhida como modificador essencial para o melhoramento do recobrimento da superfície do grafite pela enzima. Devido à maior densidade de corrente, a vida útil desse eletrodo foi maior, e a queda de corrente relativa se apresentou mais lenta para esse modificador em relação às outras moléculas estudadas (dado não mostrado).

Tanto a densidade máxima de corrente quanto a maior durabilidade do eletrodo foram alcançadas pela modificação da superfície do eletrodo de GPE por

dois ciclos de voltametria cíclica em solução do sal de diazônio. A Figura 30 mostra as correntes de redução de O_2 para os eletrodos modificados por diferentes números de ciclos durante o acoplamento das funções naftóicas à superfície do grafite.



Figura 30. Comparação entre as curvas de redução de O_2 catalisada por MvBO adsorvida sobre as superfícies de GPE modificadas com ácido 6-Amino-2-Naftóico por diferentes números de ciclos durante o acoplamento de diazônio. Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,0. Voltametrias cíclicas medidas a 5 mV s⁻¹, 0 °C e 2500 rpm.

A ausência de uma estrutura cristalográfica resolvida para a bilirrubina oxidase de *Myrothecium verrucaria* torna difícil prever como a enzima interage com a superfície modificada de GPE. Entretanto, duas observações são de particular importância. Primeiro, o fato do perfil da curva não se alterar de forma significativa entre os experimentos conduzidos com GPE modificado com A6A2N ou com GPE não modificado sugere que a modificação da superfície simplesmente aumenta a densidade de um grupo funcional similar já presente na superfície do eletrodo, o qual é necessário para uma interação não covalente entre enzima e grafite. Segundo, um grupo carboxílico ligado a um segmento aromático parece ser importante para imobilizar a bilirrubina oxidase numa orientação que permita maior proximidade do sítio ativo da enzima à superfície do eletrodo, favorecendo a transferência rápida de elétrons. Uma proposta semelhante foi recentemente feita com relação a estudos com lacase, ¹⁰⁵ em que a modificação de um eletrodo de GPE com certas moléculas poliaromáticas aumentou a corrente catalítica e a estabilidade do eletrodo: no caso, foi proposto que funções orgânicas hidrofóbicas como antraceno e criseno interagem fortemente com a região próxima ao Cu Tipo 1, onde os substratos orgânicos se ligam naturalmente. A função aromática que melhora a eletro-atividade do eletrodo de filme de bilirrubina oxidase contém uma carboxila na extremidade mais distante da cadeia aromática de anéis fundidos com relação ao átomo de carbono (contendo o grupamento amina) que se liga à superfície do eletrodo, gerando segmentos de "hidrofobicidade mista", *i.e.* uma sessão hidrofóbica formada pela parte naftalínica e uma sessão hidrofílica, formada pela função carboxílica. Vale ressaltar que a estrutura molecular do substrato principal da bilirrubina oxidase, a bilirrubina, é um tetra-pirrol contendo dois grupos carboxila em uma das extremidades da molécula, compondo um segmento polar (carboxilas) e um segmento hidrofóbico (anéis pirrólicos). A importância de se ter uma função carboxílica ligada aos anéis hidrofóbicos das folhas de grafeno que compõem a superfície do eletrodo de GPE para interação com a bilirrubina oxidase é consistente com estudos recentes ^{156, 157} que mostram a importância da carboxíla em eletrodos de ouro modificados com monocamadas de tióis ou nanotubos de carbono.

Com o intuito de tornar mais clara a importância das funções orgânicas carboxílicas sobre a superfície do eletrodo para o eficiente acoplamento das moléculas de enzima, os mesmos estudos descritos acima foram conduzidos sobre diferentes superfícies eletródicas, como o carbono vítreo, cuja superfície não apresenta as mesmas características químicas e eletroquímicas que a superfície *'edge'* do grafite pirolítico, e pó de carbono (Vulcan XC-72) apresentando área superficial em torno de 200 m² g⁻¹ e grupos funcionais orgânicos carboxílicos e carbonílicos resultantes da quebra das partículas e estrutura do material.

A Figura 31 mostra as curvas de redução de oxigênio molecular catalisada por *Mv*BO adsorvida fisicamente sobre a superfície do carbono vítreo, representada pela linha vermelha, e também pela enzima adsorvida sobre a mesma superfície após a modificação com o ácido 6-amino-2-naftóico, representada pela linha azul, como descrito anteriormente para o eletrodo de GPE. Nitidamente, é possível observar o aumento da corrente em aproximadamente quatro vezes após a modificação da superfície do carbono vítreo com o A6A2N antes da adsorção da enzima, exatamente como observado para a superfície do eletrodo de GPE. Porém, a enzima adsorve fracamente e em pouca quantidade sobre a superfície 'limpa' do carbono vítreo (como pode ser visto pela baixa atividade da enzima) ao passo que no eletrodo de GPE a MvBO adsorve fortemente e em maior quantidade.



Figura 31. Redução de O₂ catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida fisicamente em Carbono Vítreo não modificado (linha vermelha) e Carbono Vítreo modificado com A6A2N e MvBO (linha azul). Voltamogramas cíclicos obtidos a 5 mV s⁻¹, 25°C e 2500 rpm. Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ em pH 6,0. Densidades de corrente normalizadas por área geométrica do eletrodo, 0,196 cm².

Dessa forma, fica evidente a importância de se ter funções orgânicas aromáticas contendo grupos carboxílicos nas extremidades para interação com a estrutura quaternária da bilirrubina oxidase, e de forma eficiente para o favorecimento da transferência direta dos elétrons entre enzima e eletrodo. Além disso, torna-se também importante uma futura investigação a respeito das possibilidades de aumento da estabilidade da proteína sobre a superfície do eletrodo após a modificação. Esse interesse surgiu dos resultados obtidos com a MvBO fisicamente adsorvida sobre partículas de carbono Vulcan XC-72, depositadas sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, como mostrado na Figura 32.



Figura 32. Redução de O₂ catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida fisicamente em Carbono Vulcan XC-72 não modificado. (A) voltamogramas cíclicos consecutivos, a 5 mV s⁻¹, 25 °C e 2500 rpm, conduzidos ao longo de 12 horas contínuas de atividade da enzima. (B): Gráfico de |I| *vs* tempo para a verificação da estabilidade do filme catalítico obtido por adsorção simples. Os valores de corrente utilizados foram os máximos de corrente para cada curva, a 345 mV. Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ em pH 6,0. Densidades de corrente normalizadas por área geométrica do eletrodo, 0,196 cm².

As densidades de corrente obtidas para a redução de O₂ por *Mv*BO fisicamente adsorvidas sobre as partículas de carbono Vulcan resultaram em valores altos, instigando a possibilidade de aplicação direta nas células a combustível e comparação com os valores de densidade de corrente obtidos para catalisadores metálicos à base de Platina, quando normalizados por área geométrica. ², ¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Como as partículas de carbono possuem características químicas semelhantes às características apresentadas pelo grafite pirolítico, as enzimas adsorvem muito fortemente e em grande quantidade. Dessa forma, altas densidades de corrente podem ser obtidas, principalmente se o eletrodo para aplicação na célula a combustível for confeccionado de forma apropriada. Entretanto, em operação contínua em solução, a vida útil do eletrodo se mostrou ainda limitada, de tal forma que após 12 horas de atividade a corrente caiu mais de 75% em relação à corrente inicial, como pode ser visto no Painel A da Figura 32. Logo após a modificação do eletrodo, foram registradas as curvas de redução de O_2 através de sucessivos ciclos de voltametria, a 5 mV s⁻¹ e 2500 rpm de rotação do eletrodo, podendo ser observada uma rápida diminuição da corrente durante os 40 primeiros ciclos, mas alcançando uma assíntota à medida que a queda da corrente diminui com o tempo, como mostrado na Figura 32B (descrição detalhada sobre a estabilidade da enzima se encontra na seção 5.5.3).

Devido à metodologia desenvolvida para a modificação da superfície do eletrodo com o ácido 6-amino-2-naftóico fazer uso de grande quantidade de álcool em solução, não foi possível conduzir tal modificação sobre as partículas de grafite, pois o álcool causa o desprendimento por completo das partículas de carbono da superfície do eletrodo, restando somente exposta a superfície do eletrodo suporte de carbono vítreo.

5.2.3 Efeitos da velocidade de rotação do eletrodo na corrente catalítica

Com o intuito de verificar a dependência da corrente de redução de oxigênio com a velocidade de rotação do eletrodo, foram realizados experimentos de cronoaperometria em que foi variada a velocidade angular do eletrodo, mostrados na Figura 33. Como conseqüência, verificou-se que, em todos os casos, comportamento seguindo o modelo de Koutecký-Levich foi obtido. Em baixas rotações, a corrente é proporcional ao inverso da raiz quadrada da velocidade angular do eletrodo, ao passo que em altas rotações, a corrente se torna independente da velocidade angular. Dessa forma, foi escolhida a velocidade angular de 2500 rpm como condição padrão para a realização dos demais experimentos, principalmente por apresentar discrepâncias ínfimas de corrente em relação a valores obtidos a 3600 rpm e velocidades superiores. Além disso, segundo a teoria do transporte de massa por convecção ¹⁶²⁻¹⁶⁴ para o valor de 2500 rpm não ocorre fluxo turbulento dos reagentes dentro da solução, de tal forma que a movimentação dos íons e reagentes segue um padrão controlado (fluxo laminar).



Figura 33. Gráfico da dependência da corrente catalítica de redução de oxigênio com a velocidade angular do eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO. (A) Cronoamperometria do filme catalítico em 100 mV vs ECS. Os números acima da curva indicam a velocidade angular do eletrodo, em RPM. (B) Gráfico de Koutecký-Levich para dependência linear da corrente com a velocidade angular do eletrodo. A extrapolação da magnitude da corrente para a rotação infinita resultou em corrente apenas 2,2% maior que a corrente obtida a 2500 rpm. Condições: 3 mm², tampão fosfato de sódio (TFS) 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,0, 25 °C, 1 bar O₂.

5.2.4 Efeitos da temperatura na corrente catalítica

A Figura 34 mostra os voltamogramas cíclicos para a redução de O_2 em diferentes temperaturas, todos a 5 mV s⁻¹ e com o eletrodo rotacionando a 2500 rpm, velocidade angular em que a corrente independe da velocidade de rotação (seção 5.2.3). O eletrodo empregado para esse experimento havia sido preparado dois dias antes e usado durante esse período para outros experimentos. O gráfico interno à Figura 34 mostra a dependência da corrente catalítica com a temperatura, medida a +340 mV *vs* SHE. A corrente aumenta linearmente de 0 °C a 30 °C e depois diminui conforme a temperatura aumenta acima desse intervalo, devido à inativação das enzimas (seção 5.5.3), sugerido pela diferença de corrente entre o primeiro e o terceiro ciclos, sob as mesmas condições (gráfico interno). Baseado nessa observação, todos os demais experimentos foram realizados a 25 °C ou menos.



Figura 34. Voltamogramas cíclicos para a redução de O_2 em um eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO de dois dias de uso, registrada como função da temperatura. Dependência da temperatura medida em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,0, e 2500 rpm. Gráfico interno mostra a dependência da corrente catalítica com a temperatura, derivada das correntes medidas em +340 mV vs SHE.

Foi proposto recentemente que os voltamogramas de eletrocatálise por enzimas adsorvidas podem apresentar dispersões das taxas de transferência interfacial de elétrons entre as populações de moléculas de enzimas adsorvidas sobre o eletrodo de forma não homogênea. ¹⁶⁵ O modelo prevê que a inclinação da curva I vs E aumenta com a temperatura (uma maior temperatura aumenta a taxa de turnover no sítio ativo e a transferência interfacial de elétrons deve também aumentar para manter a atividade – seção 5.2.6). Para MvBO, porém, o aumento da temperatura não alterou significativamente o formato das curvas, como pode ser visto na Figura 35A, em que a normalização independente das correntes de redução de oxigênio em diferentes temperaturas revelaram uma sobreposição das curvas. Em outras palavras, as pequenas diferenças observadas para a sobreposição das curvas na Figura 35A se devem à inativação natural do filme catalítico, em que ocorre a diminuição da corrente com o tempo, como visto anteriormente na Figura 32A.



Figura 35. (A) Voltamogramas cíclicos para a redução de O_2 em um eletrodo de GPE modificado com A6A2N–*Mv*BO, mostrados na Figura 34, normalizados separadamente para o intervalo [0,1], usando a relação $i' = (i - i_{min})/(i_{max} - i_{min})$, e representados juntos para a mesma escala. (B) Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da reação em pH 6,0 e em pH 8,0, usando os valores de corrente em sobrepotencial aplicado de 532 mV em relação ao potencial reversível do par redox $O_2/2H_2O$ para cada valor de pH.

A Figura 35B mostra o gráfico de Arrhenius, logaritmo do módulo da corrente (em sobrepotencial aplicado de 532 mV em relação ao potencial reversível do par redox $O_2/2H_2O$) versus o inverso da temperatura, de onde foi determinada a energia de ativação da reação de redução de oxigênio catalisada por MvBO sob condições de pH 6,0 e pH 8,0. Os valores obtidos para a energia de ativação da reação foram de 25,2 kJ mol⁻¹ em pH 6,0 e de 28,6 kJ mol⁻¹ em pH 8,0. Esses valores são próximos aos valores entre 20 e 25 kJ mol⁻¹ obtidos para a mesma reação sendo catalisada por ligas metálicas comumente utilizadas em células a combustível convencionais. ^{158, 159, 166} Encontra-se na literatura que a reação ocorrendo sobre os catalisadores convencionais de Pt, ligas de Pt₃Ni e Pt₃Co, e também para monocristais de Pt₃Co, em que os valores de energia de ativação se encontram dentro do intervalo mencionado, segue o mesmo mecanismo. Entretanto, o mecanismo compreendendo a redução de oxigênio catalisada por enzimas envolve diferentes parâmetros e etapas não presentes no mecanismo catalisado por metais. Dentre as mais importantes, destacam-se a difusão do oxigênio através da estrutura da proteína, transferência de prótons entre a molécula de oxigênio e os aminoácidos envolvidos na reação, localizados próximo ao sítio ativo da proteína, e as próprias características bioquímicas da proteína que afetam diretamente o resultado final da reação. Devido à complexidade na redução enzimática de oxigênio, a comparação direta dos parâmetros termodinâmicos entre catálise enzimática e inorgânica se torna difícil, muitas vezes até inviável, e requer análises mais precisas, como descritas mais adiante.

5.2.5 Efeito do pH e do suporte eletródico na corrente catalítica

A Figura 36 mostra a dependência da corrente catalítica, e também do perfil da curva de redução, com o pH da solução, obtidos a 0 °C e 2500 rpm para um mesmo filme catalítico usado nas soluções de diferentes valores de pH, e que se manteve estável durante todo o período de experimentação. O gráfico interno à Figura 36 mostra a dependência direta da corrente com o pH, medida a um sobrepotencial constante de 535 mV relativo ao potencial termodinâmico de redução do par $O_2/2H_2O$, e revela que o intervalo aparente ótimo de pH para a enzima está entre 5,5 e 6,0 e que em pH 7,0 a enzima ainda catalisa a redução de O_2 em mais da metade da corrente máxima naquele intervalo. Há uma nítida alteração no formato do voltamograma quando o pH é aumentado. Em pH 5,5 a corrente mostra uma constante e quase linear dependência com o potencial para uma região além de 0,4 V, ao passo que em pH 8,0 o voltamograma diminui sua amplitude e apresenta um perfil quase sigmoidal.



Figura 36. Voltamogramas cíclicos para a redução de O_2 em um eletrodo de GPE modificado com A6A2N–*Mv*BO de dois dias de uso, registrada como função do pH, e medida a 0 °C. Gráfico interno mostra a dependência corrente–pH derivada da corrente medida em sobrepotencial constante de 535 mV (relativo ao potencial reversível do par $O_2/2H_2O$ em cada valor de pH medido). Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ com pH ajustado ao valor desejado na temperatura de trabalho, velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹ e 2500 rpm.

A dependência da corrente com o pH observado na Figura 36 reflete o p K_a do(s) grupo(s) envolvido(s) na transferência de prótons durante a redução de O₂ a água. Tem sido proposto ¹¹⁸ que os prótons envolvidos na reação são transferidos via um resíduo de aspartato (D105 na Figura 21), próximo ao cluster trinuclear Tipo 2/Tipo 3. Esse aminoácido é conservado na maioria das multicobre oxidases e possui p K_a de aproximadamente 5,4. ¹¹⁴ Kataoka *et al.* ¹¹⁴ verificaram uma diminuição na atividade específica da MvBO de 24 para 11 U mg⁻¹ quando D105 foi substituído por um resíduo de Glu, por meio de mutação genética dirigida, e uma diminuição para 1,2 U mg⁻¹ quando D105 foi substituído por um resíduo de Ala. Assim, a menor corrente obtida em maiores valores de pH é, portanto, atribuída à carboxila do D105 não estar suprida com H⁺ para a reação de redução de O₂.



Figura 37. Voltametrias cíclicas para a reação de redução de oxigênio catalisada por GPE modificado com A6A2N–MvBO, em que os potenciais aplicados foram corrigidos para pH 0,0 e as correntes foram normalizadas para o intervalo [0,1], mostrando a dependência do formato da curva de redução de oxigênio com o pH do eletrólito. Tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, 5 mV s⁻¹, 0–1 °C, 2500 rpm.

A Figura 37 mostra a variação do formato da curva de redução de oxigênio conforme o pH do eletrólito foi aumentado, de tal forma que o aumento do valor do pH do meio altera a curva para um formato mais sigmoidal, ao passo que em baixos valores de pH as curvas apresentam um perfil mais 'linearizado', indicando possível alteração de algum parâmetro cinético envolvido no mecanismo da reação. Para facilitar a comparação entre as curvas de redução de oxigênio em diferentes valores de pH, foi feita a correção dos intervalos experimentais de potencial para o valor ideal padrão de pH 0,0 e a normalização das magnitudes máxima e mínima das correntes para cada curva, de forma independente, para dentro do intervalo [0,1], assim como foi feita para as curvas em diferentes valores de temperatura. Essa normalização também possibilitou a observação da diminuição do valor do sobrepotencial de reação, ou início da reação de redução, com o aumento do pH, apesar da corrente catalítica diminuir consideravelmente (Figura 36). Essa diminuição do valor do sobrepotencial da reação com o aumento do pH do eletrólito pode ser consequência de alterações na estrutura da proteína, alteração na estrutura eletrônica do átomo de Cu Tipo 1, ou até mesmo alteração na orientação das moléculas de enzima, possivelmente causadas por variações das densidades de carga na estrutura quaternária da proteína. Essas três hipóteses afetam diretamente a energia necessária para a ocorrência do tunelamento dos elétrons entre o átomo de cobre e a superfície do grafite e, como consequência, causam alterações no formato das curvas de redução.

Para examinar se o formato das curvas é uma propriedade inerente da enzima, foram comparadas as curvas obtidas por MvBO adsorvida sobre ambos GPE não modificado (Figura 38A) e A6A2N–GPE (Figura 38B), e sobre diferentes materiais eletródicos, como monocristais de Au(111) e Pt(111) (Figuras 38C e 38D, respectivamente), em que se obtiveram respostas catalíticas evidentes, porém de baixa estabilidade. Cada experimento foi conduzido em pH 5,8. Os voltamogramas cíclicos em condições anaeróbicas (linhas vermelhas) para Au e Pt orientados para expor a face (111) revelaram características indicativas das superfícies limpas de cada monocristal. ^{167, 168} A Figura 38C mostra os voltamogramas cíclicos para o monocristal de Au(111) em solução tampão saturada com O₂ (linha preta), bem como para a catálise promovida pela MvBO adsorvida sobre Au(111) no mesmo eletrólito (linha azul). Uma diferença de aproximadamente 430 mV foi observada entre os potenciais de início da reação catalisada por Au(111) e pela enzima adsorvida. A Figura 38D mostra os resultados dos experimentos análogos conduzidos em Pt(111), onde a diferença no sobrepotencial (julgado pelo início da catálise, veja mais adiante) entre platina e enzima foi de aproximadamente 160 mV, e a contribuição da bilirrubina oxidase aparece claramente como uma pré-curva.



Figura 38. Comparação entre as reações de redução de O_2 catalisada por MvBO imobilizada sobre diferentes materiais: (A) adsorção simples em GPE; (B) GPE modificado com A6A2N; (C) Adsorção simples em Au(111); (D) Adsorção simples em Pt(111). A superfície do monocristal foi caracterizada em eletrólito saturado com argônio, a 50 mV s⁻¹ (linhas vermelhas), depois no mesmo eletrólito saturado com oxigênio, a 5 mV s⁻¹ (linhas pretas). As curvas obtidas por Metal- $MvBO_{ads}$ no eletrólito saturado com oxigênio, a 5 mV s⁻¹, estão representadas por linhas azuis. Todas as correntes foram normalizadas por área geométrica. Solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 5,8, 20 °C.

A Figura 39 mostra uma comparação mais próxima entre as curvas catalíticas sobre os diferentes materiais eletródicos. Para ajudar na comparação, as correntes foram normalizadas independentemente para suas respectivas magnitudes em +0.6 V vs SHE, trazendo as curvas para a mesma escala de corrente. A sobreposição das curvas revela o grau de similaridade nos perfis dentro de um intervalo de 0,2 V a partir do início da catálise. Esses resultados sugerem que os dados eletroquímicos obtidos são inerentes à catálise bioquímica de redução de O₂ pela enzima e não dependem significativamente se o GPE foi modificado ou se um material de natureza inteiramente diferente é empregado.



Figura 39. Comparação entre os voltamogramas cíclicos para a redução de O₂ catalisada por MvBO adsorvida sobre GPE não modificado (linha preta), A6A2N–GPE (linha vermelha), Pt(111) (linha azul) e Au(111) (linha verde). Gráfico interno: as correntes de redução catalítica foram normalizadas separadamente para o intervalo [0,1], usando a relação $i' = (i - i_{min})/(i_{max} - i_{min})$, e representadas juntas para a mesma escala.

A observação de que o formato das curvas catalíticas é essencialmente o mesmo (embora muito diminuído em magnitude e vida útil) quando MvBO é adsorvida sobre Au e Pt ao invés de GPE mostra que o perfil das curvas reflete propriedades *inerentes* da enzima e não fatores dependentes do material usado como suporte e do método de imobilização empregado nessa pesquisa. Essas observações remetem a dois cenários: ou as propriedades eletrocatalíticas da enzima são independentes das interações/orientações com a superfície do eletrodo, ou a eletroatividade obtida para os diferentes materiais empregados resultou inteiramente de uma orientação única das moléculas com respeito ao eletrodo. Considerações estruturais baseadas na CotA lacase (cuja seqüência é a mais próxima à da MvBO) sugerem fortemente que uma orientação alocando o Cu Tipo 1 próximo ao eletrodo deveria ser preferida. Um estudo recente sobre a

redução eletrocatalítica de O_2 por bilirrubina oxidase e um mutante em que o Cu Tipo 1 foi modificado mostrou a importância desse centro no potencial em que O_2 é reduzido.⁷⁵

Tendo estabelecido que o formato da curva de redução de oxigênio catalisada pela enzima é independente da natureza do material do eletrodo suporte, foi então aplicado um modelo de dispersão ao sistema, descrito em detalhes por Léger e colaboradores, ¹⁶⁵ e refinado posteriormente por Redá e Hirst, ¹⁶⁹ com a finalidade de analisar a dependência do formato da curva com o potencial.

5.2.6 Modelagem do efeito de dispersão de taxas de transferência de elétrons

Em qualquer reação redox envolvendo enzimas eletroquimicamente ativas, imobilizadas sobre um suporte eletródico, a corrente catalítica obtida durante os experimentos eletroquímicos após a inserção do substrato à solução eletrolítica é diretamente proporcional à taxa de turnover da enzima, e sua dependência com o potencial aplicado ao eletrodo está intrinsecamente relacionada aos parâmetros termodinâmicos e cinéticos de todo o ciclo catalítico. A força motriz para a reação catalítica é expressa na forma de potencial do eletrodo, o qual pode ser finamente modulado enquanto a atividade catalítica é medida simultaneamente, e de forma precisa, como corrente faradáica (corrente de turnover). Essa corrente resulta da regeneração contínua do sítio ativo da proteína por transferência interfacial de elétrons (e é nessa etapa que a magnitude da corrente é diretamente proporcional à taxa de turnover da enzima). A investigação eletroquímica oferece oportunidade singular de estudar a cinética da proteína, de uma forma não possível através da bioquímica convencional, dado que voltamogramas e demais técnicas eletroquímicas revelam a exata variação da atividade como função do potencial do eletrodo, e contém informações a respeito do potencial de redução, energia de ativação, sobrepotencial, constantes de reação, entre outras. ¹⁷⁰⁻¹⁷²

Para tanto, a transferência interfacial de elétrons entre a superfície do eletrodo e o sítio ativo da enzima se caracteriza como etapa de significativa importância, também pelo fato de que uma eficiente transferência de elétrons entre os componentes do sistema é crucial para a confiabilidade dos resultados e correta interpretação dos mesmos. Entretanto, a natureza da interação entre a superfície do eletrodo e as moléculas de proteína ainda não é muito clara, envolve muita especulação e exige investigações mais precisas a respeito da comunicação entre cada elemento, apesar das limitações experimentais. Dentro deste contexto, a "homogeneidade" na transferência de elétrons deve ser considerada, uma vez que diferentes taxas de transferência, oriundas de possíveis diferenças nas orientações das moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo (vide nota na página 29, seção 2.2.2.1), afetariam diretamente a corrente catalítica, traduzida em alterações no formato dos perfis voltamétricos quando algum parâmetro termodinâmico é alterado no sistema, como é observado no sistema desenvolvido para a redução de oxigênio catalisada pela MvBO com a variação de temperatura (Figuras 34 e 35) e do pH (Figuras 36 e 37).

Entretanto, diferentemente da relação entre corrente e pH, o aumento da temperatura não alterou significativamente o formato das curvas, como pode ser visto na Figura 35A, em que a normalização independente das correntes de redução de oxigênio em diferentes temperaturas revelaram uma sobreposição das curvas. Em outras palavras, as pequenas diferenças observadas para a sobreposição das curvas na Figura 35A se devem à inativação natural do filme catalítico (como pode ser observado pela diferença de corrente entre os ciclos 1 e 3, no gráfico interno à Figura 34).

Comportamento diferente com relação à dependência entre corrente e temperatura é observado para a enzima Hidrogenase de *Allochromatium vinosum* ¹⁶⁵ em que o formato do perfil voltamétrico quasi-sigmoidal para a oxidação de H₂ em baixos valores de temperatura é alterado para um perfil linear quando a temperatura é aumentada gradualmente a 60 °C, dentro de um intervalo de potencial de 0,5 V. Essa inesperada linearidade se assemelha a um sistema obedecendo à Lei de Ohm. Comportamento similar, porém menos acentuado, foi observado para outras enzimas confinadas à superfícies

eletródicas. ¹⁷³⁻¹⁸¹ Tal comportamento levou Léger *et al.* ^{165, 172} a proporem um modelo de dispersão de transferência interfacial de elétrons, explicado pela possível desordenação das moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo, para investigar como tal dispersão pode afetar os estudos eletroquímicos. De forma geral, esse modelo assume que as enzimas adotam um espalhamento sobre a superfície do eletrodo com orientações relativamente diferentes entre si, o que coloca os sítios de entrada/saída de elétrons em distâncias variando entre d_{\min} e $d_{\min} + d_0$ da superfície do eletrodo.

Para o caso da reação de redução de oxigênio pela enzima bilirrubina oxidase, objeto de estudo do presente trabalho, e com base nos resultados de dependência da corrente catalítica com a variação da temperatura e do pH mostrados acima e, tendo estabelecido que o formato da curva de redução de oxigênio catalisada pela enzima é independente da natureza do material do eletrodo suporte, foi então aplicado o modelo de dispersão ao sistema, com a finalidade de analisar a dependência do formato da curva de redução com o potencial, e influência da possível alteração das orientações das moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo na corrente catalítica pela variação da temperatura e do pH.

Em estudos convencionais de cinética enzimática, o turnover da enzima é medido como função da concentração de vários reagentes, ao passo que pela investigação eletroquímica é adicionado o fator potencial à análise, uma vez que as taxas dos processos redox (e, portanto, o turnover) dependem do potencial do eletrodo. De acordo com o modelo de Butler-Volmer, ⁹⁰ a taxa de transferência interfacial de elétrons aumenta exponencialmente com o sobrepotencial aplicado ao eletrodo, η , e consequentemente, a taxa de transferência de elétrons sempre excederá, eventualmente, a taxa de conversão do substrato pelo complexo enzimasubstrato. De acordo com a teoria de Marcus, ^{91, 182} a taxa de transferência interfacial de elétrons atinge um máximo valor constante quando o sobrepotencial aplicado se torna maior que a energia de reorganização ($\eta > \lambda$), e que no caso limite em que $\eta << \lambda$, a taxa de transferência interfacial de elétrons se torna independente de λ e passa a seguir o modelo de Butler-Volmer. Sob essas considerações, assumindo que a taxa de conversão bioquímica do substrato é independente do potencial do eletrodo, espera-se que os voltamogramas resultantes apresentem aumento da corrente com o sobrepotencial durante as etapas de ativação da reação e, em seguida, alcancem um limite máximo (plateau) de corrente.

De forma genérica e ideal, é possível derivar as equações para a corrente correspondendo à redução direta de O₂, via quatro elétrons, catalisada pela enzima bilirrubina oxidase adsorvida ao eletrodo, assumindo que o transporte de massa em direção à superfície do eletrodo não é um fator limitante para a corrente total. Outras considerações também feitas são que a interação entre O₂ e o sítio ativo da enzima é muito rápida e o equilíbrio é mantido constante, a taxa de transferência de elétrons entre o eletrodo e o sítio ativo da enzima segue o formalismo de Butler-Volmer, ⁹⁰ a transferência de elétrons é mais rápida que o turnover da proteína a altos valores de sobrepotencial (de tal forma que a corrente limite, *i*lim, é alcançada), a condição de estado estacionário se aplica (não há variação na magnitude da densidade de corrente para velocidades de varredura inferiores a 5 mV s⁻¹, usada nos experimentos – dados não mostrados) e considera-se o ciclo reacional descrito de forma genérica no esquema 1 abaixo, onde k_1 é a taxa com que O₂ se liga ao sítio ativo da enzima, k_{-1} é a taxa com que O_2 se dissocia da enzima, antes de ser reduzido, e k_2 é a taxa de conversão de O_2 em H₂O.

$$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} produtos$$



Esquema 1. Ciclo catalítico da reação de redução de O₂ pela enzima bilirrubina oxidase, mostrando as etapas bioquímicas (ligação da molécula de O₂ com o sítio ativo da enzima (k_1) e a conversão de estado PI para o estado NI (k_{cat})) e eletroquímica (conversão do estado NI para o estado E_R ($k_{et}^{(E_{O/R})}$), consumindo 4H⁺ e 4e⁻ e liberando 2H₂O.

Neste mecanismo, o O2 reage com a enzima totalmente reduzida (ER, todos os átomos de Cu estão na forma (I)) com constante de reação na ordem de 2×10^6 L mol⁻¹ s⁻¹, gerando o 'peroxy-intermediate' (PI), onde a molécula de O₂ foi reduzida por dois elétrons e uma das ligações O-O é preservada; em seguida, PI reage rapidamente ($k_{cat} = 300 \text{ s}^{-1}$) para produzir a espécie conhecida como 'native *intermediate*' (NI, que é o estado oxidado da enzima, E₀) em que os quatro átomos de cobre estão na forma 2+ e os elementos da molécula original de O2 se mantêm ligados ao cluster Tipo 2/Tipo 3 como pontes "oxo" e "hidroxo"; por fim, o estado totalmente reduzido da enzima pode ser recuperado por transferência rápida de quatro elétrons e quatro prótons, produzindo e liberando duas moléculas de H₂O.¹¹⁶ A 'recuperação' ao estado no qual O₂ se liga à enzima se dá com a taxa k_2 , a qual incorpora outras duas taxas elementares k_{cat} (freqüência de turnover inerente ao sítio ativo da enzima, com valor da ordem de 300 s⁻¹) e $k_{et}^{(E_{O/R})}$, que é a taxa de transferência interfacial de elétrons para a redução eletroquímica da proteína do estado Eo para o estado ER, dependente do potencial, relacionando-se entre si pela equação (2):

$$\frac{1}{k_2} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{1}{k_{et}^{(E_{O/R})}}$$
(2)

As taxas ideais de redução de E_0 para E_R e de oxidação de E_R para E_0 dependem do potencial *E* do eletrodo de acordo com as equações:

Redução:
$$k_{O \to R} = k_0^{O/R} \exp\left[-\frac{F}{2RT}(E - E_{O/R})\right]$$
 (3)

Oxidação:
$$k_{R\to O} = k_0^{O/R} \exp\left[\frac{F}{2RT} (E - E_{O/R})\right]$$
 (4)

sendo $k_0^{O/R}$ a taxa de transferência interfacial de elétrons com sobrepotencial zero (equilíbrio), também chamada de constante de troca.

A máxima corrente que pode ser obtida em condição de saturação do substrato, i_{lim} , depende da área do eletrodo (A), da taxa de recobrimento (Γ) e do turnover da enzima (k_{cat}), sob a relação $i_{\text{lim}} = -4FA\Gamma k_{cat}$ (F é a constante de Faraday). A corrente reacional pode, então, ser escrita pela equação (5):

$$\frac{i_{\rm lim} - i}{i} = \exp\left[\frac{F}{RT}\left(E - E_{O/R}\right)\right] + \frac{k_{cat}}{k_0^{O/R}} \exp\left[\frac{F}{2RT}\left(E - E_{O/R}\right)\right]$$
(5)

Dessa forma, tem-se que três parâmetros devem ser trabalhados para se ajustar os dados experimentais à equação (5): o potencial de redução $E_{O/R}$, $k_{cat}/k_0^{O/R}$ e i_{lim} .

Devido ao fato da transferência interfacial de elétrons ao longo do sítio ativo da bilirrubina oxidase ser extremamente rápida, ¹¹⁶ assume-se que a taxa total de transferência de elétrons depende apenas da distância do acoplamento eletrônico entre o eletrodo e o cobre Tipo 1 próximo à superfície da enzima, que é a porta de entrada/saída de elétrons da proteína. A extensão do modelo de transferência de elétrons descrito acima se dá pela consideração do efeito da desordenação nas orientações das moléculas de enzimas sobre a superfície do eletrodo com relação à distância entre o átomo de cobre Tipo 1 e a superfície do grafite, introduzindo uma dispersão nas distâncias de tunelamento e, portanto, uma dispersão nas constantes de transferência interfacial de elétrons, esquematizado na Figura 40.



Figura 40. Ilustração de duas orientações diferentes para a Bilirrubina oxidase sobre o eletrodo de GPE, resultando em diferentes distâncias d de tunelamento para a transferência interfacial de elétrons. Para o caso da MvBO, acredita-se que a transferência de elétrons ocorre a partir do eletrodo em direção ao átomo de cobre T1, o qual se encontra próximo à superfície da enzima e que repassa os elétrons para o cluster trinuclear de átomos de cobre T2/T3 através da cadeia His-Cis-His de aminoácidos ligando o Cu T1 aos dois átomos de Cu T3. ¹¹⁶

A taxa de transferência interfacial de elétrons em direção ao sítio ativo da proteína diminui exponencialmente com o aumento da distância de tunelamento, *d*, entre o eletrodo e o átomo de cobre Tipo 1 da enzima de acordo com a relação:

$$k_0(d) = k_0^{\max} \exp(-\beta d) \tag{6}$$

onde $k_0^{\max} = k_0^{(d=d_{\min})}$ e β é a constante de decaimento dependente do meio através do qual o elétron é tunelado, representada graficamente pela Figura 41B, cujo valor é tipicamente da ordem de 1 Å⁻¹. O produto βd é um determinante importante do formato da curva de redução a altos valores de sobrepotencial aplicado. Dentro de um determinado intervalo de distâncias $[d_{\min}, d_{\max} = d_{\min} + d_0]$, assume-se que todos os valores de *d* ocorrem com a mesma probabilidade (Figura 41A), ou seja,

$$p(d) = 1/d_0 \text{ para } d \left[d_{\min}, d_{\max} = d_{\min} + d_0 \right]$$
(7)

A função quadrada foi escolhida por simplicidade, uma vez que tanto as moléculas de enzima quanto o eletrodo apresentam formas irregulares e outras definições de características dos elementos componentes não são significativos, principalmente pelo fato da estrutura cristalográfica da bilirrubina oxidase ainda não ter sido resolvida.

Combinando a função probabilidade para d (equação (7)) e a dependência de k_0 com d (equação (6)), a probabilidade da transferência de elétrons ocorrer com um dado valor de k_0 é:

$$p(k_0) = \begin{cases} (\beta d_0)^{-1} k_0^{-1} & \text{para } k_0 \in \left[k_0^{\min}, k_0^{\max} \right] \\ 0 & \text{para qualquer outro valor} \end{cases}$$
(8)

com $k_0^{\min} = k_0^{\max} \exp(-\beta d_0)$. A descrição detalhada da derivação da equação (8) se encontra no APÊNDICE C, e está graficamente expressa pela Figura 41C.



Figura 41. (A) gráfico da função probabilidade de d, a distância através da qual ocorre o tunelamento de elétrons entre o eletrodo e a enzima (equação (7)). (B) dependência de k_0 (constante de transferência interfacial de elétrons sob sobrepotencial zero) com a distância d (equação (6)). (C) Função probabilidade resultante para k_0 (equação (8)). Gráfico retirado da referência 165.

Para obter uma equação representativa do formato das curvas de redução de O₂ como função de um único potencial de redução ($E_{O/R}$), da freqüência de turnover da enzima, k_{cat} , e da constante de transferência interfacial de elétrons em sobrepotencial zero, k_0 , a corrente expressa pela da equação (5) deve ser integrada através da distribuição dos possíveis valores de k_0 , dentro do intervalo

 $\begin{bmatrix} k_0^{\min}, k_0^{\max} \end{bmatrix} \quad (\text{equação} \quad (8)), \quad \text{pela integral} \quad i^* = \int_{k_0^{\min}}^{k_0^{\max}} i(k_0) p(k_0) dk_0, \quad \text{com}$ $k_0^{\min} = k_0^{\max} \exp(-\beta d_0) \text{ e usando a notação reduzida } e_{O/R} = \exp\left[\frac{F}{RT} \left(E - E_{O/R}\right)\right], \text{ ou seja,}$

$$\frac{i^{*}}{i_{\lim}} = \int_{k_{0}^{\min}}^{k_{0}^{\max}} \frac{1}{1 + e_{O/R} + \frac{k_{cat}}{u} \left(e_{O/R}^{1/2} \right)} \cdot \frac{1}{\beta d_{0} u} \cdot du$$
(9)

de cuja integração se obtém a equação da corrente catalítica de redução corrigida pelo efeito de dispersão de taxas de transferência de elétrons entre as moléculas de *Mv*BO e a superfície do eletrodo:

$$i^{*} = \frac{i_{\lim}}{1 + e_{O/R}} \left[1 + \frac{1}{\beta d_{0}} \ln \left(\frac{1 + e_{O/R} + \frac{k_{cat}}{k_{0}^{\max}} e_{O/R}^{1/2}}{1 + e_{O/R} + \frac{k_{cat}}{k_{0}^{\max}} e_{O/R}^{1/2}} \exp(\beta d_{0})} \right) \right]$$
(10)

lembrando que $e_{O/R} = \exp\left[\frac{F}{RT}(E - E_{O/R})\right]$ e $i_{\lim} = -4FA\Gamma k_{cat}$. O desenvolvimento completo da equação (10) está descrito em detalhes no APÊNDICE D.

A partir da equação (10), é possível ajustar curvas teóricas às curvas experimentais utilizando dados conhecidos para os parâmetros cinéticos presentes na equação.

A Figura 42 mostra como os dados obtidos se adéquam a esse modelo, sendo as curvas em preto representantes dos dados experimentais e as curvas em vermelho referentes aos ajustes obtidos usando-se a equação (10).



Figura 42. Modelagem dos voltamogramas catalíticos para as curvas de redução de oxigênio no intervalo de pH estudado. Painéis superiores mostram as varreduras no sentido catódico para as curvas apresentadas na Figura 36 (preto) sobrepostas com o modelo proposto por Léger *et al.* ¹⁶⁵ (vermelho). A condição de baixo pH resulta em um voltamograma em que a corrente aumenta continuamente com o potencial (domínio da dependência do potencial, definida por uma pequena dispersão das orientações das moléculas), ao passo que na condição de alto pH o voltamograma assume um formato mais sigmoidal, com potencial de meia onda próximo ao potencial de redução do Cu Tipo 1. Painéis inferiores (em azul) mostram os resíduos do *fitting* (na escala de corrente de nA) do modelo às curvas experimentais.

Para todos os voltamogramas mostrados na Figura 34 e aqueles abaixo de pH 7 na Figura 36, o produto βd_0 resultante é 8,4 ± 0,4 (parâmetros de ajuste mostrados na Tabela 5 e representado na forma de gráficos de barras na Fig. 43). Assim, para todas as combinações de temperatura e pH investigadas, o formato das curvas de redução de oxigênio catalisada pela MvBO é explicado por similares graus de heterogeneidade das taxas de transferência de elétrons na superfície do eletrodo, *i.e.* as enzimas apresentam orientações muito similares sobre a superfície do eletrodo para as diferentes condições estudadas, principalmente na investigação da dependência da corrente com a temperatura, sendo essa última o parâmetro a causar maior influência em alterações na orientação de moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo. Com base nos valores de β entre 10 e 12 nm⁻¹, ¹⁶⁵ os resultados sugerem que há uma variação máxima de apenas 1 Å na distância para transferência de elétrons com a variação de temperatura, para todas as moléculas de enzima em contato eletrônico com o eletrodo (Figura 43), uma vez que as distâncias calculadas residem em torno de 6 Å. Em outras palavras, há uma uniformidade de orientações de enzimas na superfície do eletrodo.

pН	<i>T</i> / °C	$E_{\rm cat}$ / V vs SHE	$\log(k_{\rm cat}/k_0^{\rm max})$	βd_0	i _{lim} / μA	χ^2
5,0	0	0,724	-0,621	8,31	-3,16	$6{,}32\times10^{-4}$
5,0	0	0,723	-0,686	8,51	-3,24	$8{,}21\times10^{-4}$
5,5	0	0,714	-0,612	8,11	-3,49	$1,06 imes 10^{-3}$
6,0	0	0,682	-0,869	8,24	-3,09	$1,08 \times 10^{-3}$
6,5	0	0,668	-1,030	8,57	-2,95	$1,\!30 imes 10^{-3}$
7,0	0	0,630	-1,810	8,86	-1,37	$4{,}81\times10^{-4}$
7,5	0	0,622	-1,862	9,78	-1,24	$2{,}26\times10^{-4}$
8,0	0	0,605	-2,202	9,87	-0,68	$6,\!98 imes 10^{-5}$
6,0	0	0,670	-0,695	8,40	-1,44	$9,84 imes 10^{-5}$
6,0	5	0,672	-0,713	8,30	-1,90	$1,77 imes 10^{-4}$
6,0	10	0,662	-0,906	8,89	-2,19	$2{,}86\times10^{-4}$
6,0	15	0,670	-0,787	8,20	-2,68	$3,\!22 imes 10^{-4}$
6,0	20	0,674	-0,809	8,20	-3,20	$4{,}26\times10^{-4}$
6,0	25	0,674	-0,886	8,25	-3,59	$5,\!30 imes 10^{-4}$
6,0	30	0,672	-0,992	8,32	-3,87	$6,\!13 imes 10^{-4}$
6,0	35	0,668	-1,167	8,59	-3,73	$6,\!57 imes10^{-4}$
6,0	40	0,673	-1,194	8,69	-3,62	$4,50 \times 10^{-4}$
5,8	20	0,661	-1,012	6,02	-0,23	8,84 × 10 ⁻⁸

Tabela 5 – Parâmetros de ajuste e dados da qualidade do ajuste teórico às curvas experimentais (γ^2) para os voltamogramas de redução de O₂ catalisada por MvBO.

1. Dados em itálico se referem à enzima adsorvida sobre Au(111).

2. Ajustes baseados na varredura catódica para cada curva.

3. Uma linha de base foi ajustada às curvas de redução, em um ponto antes do início da reação, e incorporada no modelo.

^{4.} $\chi^2 = \sum (i_{\text{fit}} - i_{\text{exp}})/n$, onde o somatório é feito abrangendo o intervalo de potencial usado no ajuste e *n* é o número de medições de corrente dentro desse intervalo.



Figura 43. Variação dos valores de d_0 (em Å) e βd_0 (adimensional) em função (A) da temperatura (em pH 6,0) e (B) do pH (a 0 °C). O comportamento observado para a pequena variação nos valores de d_0 com o aumento da temperatura (painel A), sugerindo vasta homogeneidade na orientação das moléculas de MvBO sobre a superfície do eletrodo de grafite pirolítico, corroboram a sobreposição das curvas de redução em diferentes valores de temperatura após a normalização da corrente (Figura 35A) e a proposta do átomo de Cu T1 ser a porta de entrada/saída de elétrons da enzima. O aumento nos valores de βd_0 a partir de pH 7 (painel B) é reflexo do aumento nos valores de k_0^{max} (Figura 45).

Esse resultado é totalmente consistente com a teoria de que os elétrons entram na enzima através de um único sítio da proteína, e que a interpretação é que o sítio contendo o Cu Tipo 1 é operativo em todos os casos. Além disso, a homogeneidade na orientação das moléculas sobre a superfície do eletrodo corrobora a sobreposição das curvas de redução de oxigênio em diferentes temperaturas quando as densidades de corrente são normalizadas para o intervalo [0,1], mostrada na Figura 35A. Em ouro, βd_0 é significativamente menor, cerca de 6,0, sugerindo que a dispersão de orientações sobre a superfície de Au(111) seja ainda menor (Figura 44). Essa diminuição pode ser racionalizada pela altamente ordenada e lisa superfície do Au(111): a proteína pode tanto estar imobilizada de forma mais próxima ao eletrodo quanto pode haver menos efeitos de interação lateral entre moléculas de enzima e eletrodo para a transferência de elétrons, devido ao baixo fator de rugosidade do eletrodo.



Figura 44. Modelagem da varredura no sentido catódico para a curva de redução de O_2 catalisada por MvBO adsorvida sobre a superfície de Au(111), sobrepostas com o modelo proposto por Léger *et al.*¹⁶⁵ Curva em preto representa os dados experimentais e a curva em vermelho representa o ajuste da curva. O painel inferior (azul) mostra a variação do residual de ajuste da equação (10) à curva experimental.

Conforme o pH aumenta e a atividade total diminui, a razão k_{cat}/k_0^{max} também diminui. Para o ajuste teórico das curvas, foi mantido um valor constante de k_{cat} para todos os ajustes (300 s⁻¹), observando-se um aumento nas taxas de k_0^{max} com o aumento do pH, indicando que a taxa de transferência de

elétrons entre o eletrodo e o sítio ativo das enzimas se torna mais efetiva em altos valores de pH (Figura 45D). Variando-se o valor de k_{cat} para mais ou para menos, os valores de k_0^{max} variaram no sentido oposto. Porém, independentemente dos valores inseridos para k_{cat} , foi observado o aumento do valor de k_0^{max} com o aumento do pH. Esse efeito pode ser usado para explicar os menores valores de sobrepotencial observados para a reação de redução em maiores valores de pH, mostrados na Figura 36. Em pH 7,0, sobre grafite, o produto βd_0 aumenta para próximo de 10. A razão k_{cat}/k_0^{max} , a qual influencia o formato da curva em baixos sobrepotenciais, 106, 156, 165 diminui por um fator de aproximadamente 10 além do esperado para menores taxas catalíticas (Figura 45).



Figura 45. Variação dos parâmetros $E_{O/R}$, i_{lim} e log (k_{cat}/k_0^{max}) com a temperatura (painel (A)) e com o pH (painel (B)) e variação de k_0^{max} com a temperatura (painel (C)) e com o pH (painel (D)) da solução eletrolítica para a reação de redução de O₂ catalisada por MvBO adsorvida sobre a superfície do eletrode GPE modificado com A6A2N. Para os painéis A e B, as linhas azuis representam a variação de $E_{O/R}$; linhas vermelhas representam a variação de i_{lim} ; linhas pretas representam a variação de log (k_{cat}/k_0^{max}) . Tampão fosfato de sódio (TFS) 0,1 mol L⁻¹.

Essas modificações refletem um deslocamento no fator determinante da reação para a eletrocatálise, e a transferência intramolecular de elétrons deve ser inerentemente rápida, dado o eficiente caminho de tunelamento dentro da enzima. ^{116, 183} A catálise em baixos valores de pH é controlada pela taxa de transferência de elétrons, a qual aumenta conforme o sobrepotencial também aumenta. Outra consideração é a possibilidade de uma interação fraca entre enzima e eletrodo em altos valores de pH (o p K_a do imidazol da histidina é aproximadamente 6), causando alterações nas propriedades eletrostáticas da superfície da enzima. O enfraquecimento das interações, permitindo à enzima explorar outros caminhos para a transferência de elétrons entre o eletrodo e o Cu T1, poderia levar a uma maior taxa de transferência interfacial. Essa idéia foi originalmente proposta para um eletrodo de ouro modificado com proteína periplásmica (citocromo c_{555} ^m de *Aquifex aeolicus*) — "proteína em uma corda" — o qual apresentou rápida taxa de transferência de elétrons, inesperadamente. ¹⁸⁴

5.3 Caracterização bioquímica do filme de A6A2N-MvBO

Para ajudar a resolver o complexo formato da curva de redução eletrocatalítica de O_2 sob diferentes condições, uma série de experimentos foi conduzida para estabelecer os parâmetros cinéticos gerais (K_M , a constante de Michaelis-Menten) e a corrente máxima independente da concentração de O_2 (i_{max} , proporcional à frequência de turnover e ao recobrimento da superfície) como funções do pH e do potencial do eletrodo. A Figura 46A mostra uma série de experimentos de cronoamperometria realizados com o mesmo filme de GPE modificado com A6A2N–MvBO, usando um intervalo de concentrações de O_2 , mostrado na Tabela 6.

Ar / sccm ^a	O_2 / sccm ^b	Fração de O ₂	[O ₂] / mM	$\sigma_{[O2]} / mM$	$\sigma_{[O2]}/[O_2]$
0	996	100,0%	1,300	0,037	2,9%
436	560	56,2%	0,731	0,024	3,2%
681	315	31,6%	0,411	0,017	$4,\!2\%$
819	177	17,8%	0,231	0,014	6,3%
896	100	10,0%	0,130	0,014	10,4%
940	56	5,6%	0,073	0,013	18,1%
965	31	3,2%	0,041	0,013	31,9%
976	20	2,0%	0,026	0,013	50,1%

Tabela <u>6</u> – Erros absoluto e relativo no fluxo de gás para a determinação de *K*_M e *i*_{max}.

^a 25 sccm de incerteza experimental do fluxímetro

^b 10 sccm de incerteza experimental do fluxímetro

Como mostrado na seção 5.2.3, experimentos foram realizados para se determinar a dependência da corrente com a velocidade angular do eletrodo, verificando-se que, em todos os casos, comportamento seguindo Koutecký-Levich foi obtido (a baixas rotações, a corrente era proporcional ao inverso da raiz quadrada da velocidade angular, mas a altas rotações, a corrente se tornava independente da velocidade angular, seção 5.2.3). Para todos os experimentos seguintes, foi usada a rotação mínima de 2500 rpm para garantir que a corrente não fosse limitada por transporte de massa. Os experimentos foram realizados todos em sequência, usando um único eletrodo de GPE modificado com A6A2N-MvBO: retornando à condição de 100% de O_2 após períodos de 4 h e 8 h, uma curva para a lenta perda de atividade do filme foi estabelecida, permitindo que os dados fossem corrigidos por esse fator (linha tracejada, Figura 46A).

Os voltamogramas cíclicos foram registrados após cada medida de cronoamperometria (Figura 46B) para investigar a dependência de $K_{\rm M}$ e $i_{\rm max}$ com o potencial do eletrodo. Para cada valor de concentração de O₂ na célula, foram realizados uma cronoamperometria (para correção dos dados à perda gradual de atividade) e 3 varreduras de voltametria cíclica, a 5 mV s⁻¹, para obtenção dos dados relativos à variação de $K_{\rm M}$ com o potencial aplicado. A partir dos voltamogramas em diferentes concentrações de O₂ e diferentes valores de pH, os gráficos de Lineweaver-Burk foram gerados e os parâmetros cinéticos foram determinados.



Figura 46. (A) Série de experimentos de cronoamperometria a 330 mV *vs* SHE, pH 5,0 e diferentes concentrações de O₂ (expressas em % de O₂ dentro da célula) mostrando a extensão da perda de atividade (filme) ao longo de 8 horas. (B) Série de experimentos de voltametria cíclica em diferentes concentrações de O₂, em pH 5,0 (corrigidas para a perda de atividade). (C) Dependência do $K_{\rm M}$ com o potencial, em diferentes valores de pH. (D) Dependência do $i_{\rm max}$ com o potencial, em diferentes valores de pH. Os dados mostrados em C e D foram derivados dos gráficos de Lineweaver-Burk, usando dados obtidos a uma rotação do eletrodo de 2500 rpm. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, 25 °C, e velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹.

O termo i_{max} é equivalente ao V_{max} em estudos cinéticos convencionais de enzimas e precisaria ser dividido pelo recobrimento eletroativo (concentração real de enzimas eletroativas no eletrodo) para ser convertido em freqüência de turnover (s⁻¹). Entretanto, o recobrimento eletroativo não é conhecido pelo fato de não ter sido vista a transferência não catalítica de elétrons entre o eletrodo e o Cu Tipo 1 nas várias tentativas realizadas, mesmo para o eletrodo modificado com A6A2N. As Figuras 46C e 46D mostram a dependência de $K_{\rm M}$ e $i_{\rm max}$ com o potencial aplicado ao eletrodo, determinada a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk (descrição do ajuste não-linear e parâmetros empregados estão descritos no APÊNDICE E), em diferentes valores de pH. Os dados assemelham-se muito às mudanças no formato das curvas de redução de O_2 em diferentes valores de pH (Figura 36), e mostram (a) i_{max} (diretamente relacionado à freqüência de turnover) é maior em baixo pH; (b) i_{max} varia com o potencial do eletrodo até alcançar um valor limite em alto pH; (c) $K_{\rm M}$ também varia com o potencial do eletrodo de eletrodo e se aproxima de um valor constante em baixos potenciais e alto valor de pH.

A Figura 47 mostra os gráficos de Lineweaver-Burk resultantes dos dados obtidos da variação da corrente com a concentração de O₂ em pH 5,9, com $K_{\rm M}$ = 0,5 mmol L⁻¹ a 330 mV *vs* SHE.



Figura 47. Gráficos de Lineweaver-burk para a reação de redução de O_2 catalisada por MvBO adsorvida sobre GPE modificado com A6A2N, em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, 25 °C e 2500 rpm. Painel (A) mostra a dependência logarítmica do inverso da corrente com o inverso da concentração de O_2 . Painel (B) mostra a dependência linear do inverso da corrente com o inverso da concentração de O_2 . Dados obtidos a partir das cronoamperometrias a 330 mV vs SHE, sob diferentes concentrações de O_2 (apresentados na Figura 46A), e corrigidos pela perda de atividade do filme.

Tendo estabelecido que a variação no formato da curva de redução de O_2 independe da natureza do material empregado como suporte eletródico e também não é causada por alterações na orientação das moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo, as dependências da corrente e formato da curva de redução de O_2 com o potencial do eletrodo, com a concentração do reagente e com o pH do
eletrólito podem ser explicadas com base no modelo de Michaelis-Menten para reações enzimáticas. O ciclo reacional representado no esquema 1 é repetido a seguir (para melhor compreensão do modelo cinético proposto), onde k_1 é a taxa com que O₂ se liga ao sítio ativo da enzima e k_{-1} é a taxa com que O₂ se dissocia da enzima, antes de ser reduzido.

$$\mathbf{E} + \mathbf{S} \xrightarrow{k_{1}} \mathbf{ES} \xrightarrow{k_{2}} \text{ produtos}$$

$$\mathbf{O}_{2} + \mathbf{E}_{R} \xrightarrow{k_{1}} \mathbf{PI} \xrightarrow{k_{cat}} \mathbf{NI} (=\mathbf{E}_{O})$$

$$\mathbf{PI} \xrightarrow{k_{cat}} \mathbf{NI} (=\mathbf{E}_{O})$$

$$\mathbf{PI} \xrightarrow{k_{cat}} \mathbf{PI} \xrightarrow{k_{cat}} \mathbf{P$$

A enzima é 'recuperada' ao estado no qual O₂ se liga com a taxa k_2 , a qual incorpora outras duas taxas elementares k_{cat} (freqüência de turnover inerente ao sítio ativo da enzima) e $k_{et}^{(E)}$, que é a taxa de transferência interfacial de elétrons, dependente do potencial, incorporada no modelo de dispersão. A etapa determinante da reação pode ocorrer antes ou depois da etapa de associação do O₂ com a enzima, sendo definida tanto por k_{cat} ou por $k_{et}^{(E)}$. A apropriada relação matemática do modelo de Michaelis-Menten está descrita na equação (11):

$$\frac{\text{taxa}}{[\text{E}]} = \frac{\text{corrente}}{nFA\Gamma} = \frac{k_1 k_{et}^{(E)} k_{cat} [\text{O}_2]}{(k_{-1} + k_1 [\text{O}_2])(k_{et}^{(E)} + k_{cat}) + k_{et}^{(E)} k_{cat}}$$
(11)

sendo n o número de elétrons transferidos durante cada ciclo catalítico (=4), F a constante de Faraday, A a área superficial do eletrodo e Γ o recobrimento eletroativo de enzima (a descrição completa da derivação da equação (11) se

encontra no APÊNDICE F). Dessa relação, dois casos limites podem ser considerados, de acordo com as condições em que $k_{et}^{(E)} >> k_{cat}$ (12) ou $k_{cat} >> k_{et}^{(E)}$ (13), ou seja,

$$\frac{\tan a}{[E]} = \frac{k_1 k_{cat} [O_2]}{k_{-1} + k_1 [O_2] + k_{cat}}$$
(12)

$$\frac{\tan a}{[E]} = \frac{k_1 k_{et}^{(E)} [O_2]}{k_{-1} + k_1 [O_2] + k_{et}^{(E)}}$$
(13)

A equação (12) é a expressão padrão do modelo de Michaelis-Menten, sendo que a constante de Michaelis-Menten é dada pela equação (14):

$$k_{\rm M} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \tag{14}$$

A equação (13) é uma forma alternativa da expressão de Michaelis-Menten, gerando uma corrente dependente do potencial. A resolução das dependências de $K_{\rm M}$ e $i_{\rm max}$ ($i_{\rm max}$ é proporcional a k_2 e controlada por $k_{\rm cat}$ ou $k_{\rm et}^{(E)}$, o qual for maior) com o potencial do eletrodo (Figuras 46C e 46D) resulta em curvas semelhantes aos voltamogramas de redução de oxigênio, sendo então consideradas como 'extrapolações informativas' desses voltamogramas, em que se estabelece a clara relação entre corrente, potencial e características bioquímicas da enzima. A Figura 46C mostra que $K_{\rm M}$ se aproxima de um valor constante conforme o potencial aplicado se torna mais negativo, embora isso seja mais óbvio para valores de pH > 6. Na Figura 46D, o efeito do $K_{\rm M}$ nas curvas de redução de O_2 foi eliminado, ou seja, as correntes mostradas na Figura 46D são aquelas que seriam obtidas em condição de completa eliminação dos efeitos de transporte de massa e máxima atividade das moléculas de enzima sobre a superfície do eletrodo, e as curvas estão focadas na taxa de turnover da enzima: ao contrário do que é apresentado na Figura 36, observa-se que a corrente não alcança um valor limite em pH 6,8, mas continua a aumentar conforme o pH é diminuído.

Em baixos valores de pH, a freqüência de turnover inerente à enzima é muito alta e a corrente é determinada pela taxa com que elétrons podem ser transferidos para o sítio ativo da enzima, observando que um ciclo completo requer quatro etapas redox por molécula de O₂. Em altos valores de pH, a taxa reacional passa a ser limitada por uma etapa a qual não responde ao aumento do potencial aplicado ao eletrodo, tal como a transferência de prótons, e a transferência interfacial de elétrons entre superfície do grafite e sítio ativo da enzima deixa de ser a etapa limitante. No modelo básico de Michaelis-Menten, esse valor constante é associado à constante de dissociação $K_{\rm D}$ (= k_{-1}/k_1), a qual é observada ser aproximadamente 0,2 mmol L⁻¹, em pH 7,85, na Figura 46C.

A dependência da corrente com o potencial, mostrada na Figura 36 e em mais detalhes na Figura 46, refletem o pK_a do(s) grupo(s) envolvido(s) na transferência de prótons durante a redução de O₂ a água. Tem sido proposto ¹¹⁸ que a transferência de prótons é altamente dependente do resíduo de aminoácido aspartato (D105, na Figura 21), que tem um pK_a de aproximadamente 5,4, localizado próximo do sítio trinuclear Tipo 2/Tipo 3. ¹¹⁴ A menor corrente em maiores valores de pH, ocorre, portanto, pelo fato do grupo carboxila desprotonado ser incapaz de se ligar e suprir H⁺ para a reação de redução de O₂.

Para investigar se um passo de transferência elementar de prótons poderia ser a etapa limitante da redução de O₂ sob qualquer condição e, assim, contribuir para o formato da curva (particularmente o formato sigmoidal e o valor limite de i_{max} aproximado em alto pH), voltametrias cíclicas foram medidas usando soluções de D₂O ao invés de H₂O, ajustadas aos diferentes valores de pL (lyonium, L⁺ = H⁺, D⁺). Cada medida foi feita realizando-se transferências sucessivas entre as soluções tampão de H₂O e D₂O (Figura 48). O eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO foi imerso na solução tampão de H₂O saturada de O₂, no valor de pH desejado, e três varreduras de voltametria cíclica foram registrados, a 5 mV s⁻¹, sendo que o eletrodo foi transferido para a solução tampão de D₂O saturada de O₂, com o equivalente valor de pD. Três varreduras foram, então, registradas, sob exatamente as mesmas condições, e o eletrodo foi retornado para a solução tampão de H₂O, repetindo-se o processo por mais duas séries. Esse procedimento foi conduzido para cada valor de pL entre 5,0 e 9,0. Apenas diferenças muito pequenas foram observadas em todos os casos, de tal forma que um efeito de isótopo H/D foi descartado como sendo limitante na reação de redução de O₂ como um componente observável para um determinado valor específico de pH, apesar da transferência de prótons ser considerada etapa limitante sob condições de pH > 7.



Figura 48. Voltametrias cíclicas em diferentes valores de pL (L⁺ = H⁺, D⁺) obtidas durante sucessivas transferências entre soluções tampão de H₂O e D₂O para investigação de efeito de isótopo. Eletrodo de GPE modificado com A6A2N–*Mv*BO foi imerso em uma solução tampão de H₂O no pH desejado, três ciclos foram registrados, e o eletrodo foi transferido (removendo-se o excesso de eletrólito) para a solução tampão de D₂O de pD equivalente (pD = leitura no pHmetro + 0,4). Três ciclos foram registrados antes de retornar o eletrodo à solução de H₂O, e novamente à de D₂O. Esse procedimento foi repetido para cada valor de pL. Sistema de tampão misto: 2,85 mmol L⁻¹ Na₂B₄O₇.10H₂O (tetraborato de sódio), 10,0 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄.7H₂O (fosfato de sódio dibásico heptahidratado) e 6,70 mmol L⁻¹ Na₃C₆H₅O₇ (citrato de sódio). O valor desejado de pL foi ajustado pela adição de NaOH/NaOD e H₂SO₄/D₂SO₄. Voltametrias cíclicas conduzidas a 5 mV s⁻¹, 22 °C, 1600 rpm.

Os resultados têm uma explicação mecanística simples, a qual é ilustrada na Figura 49. O Cu Tipo 1 é crucial para a reação do ponto de vista de que há uma forte evidência nos estudos de mutagênese pontual de aminoácidos e substituição de íons metálicos dos sítios ativos de que esse Cu é a porta de entrada dos elétrons envolvidos na reação. ⁷⁵ Em baixos valores de pH, onde a enzima é muito ativa, a taxa de redução de O₂ é limitada pela taxa com que o Cu Tipo 1 pode conduzir elétrons, observando que são necessários quatro ciclos redox por molécula de O₂. O Cu Tipo 1 é muito rapidamente re-oxidado por transferência intramolecular de elétrons em direção aos átomos de Cu Tipo 2/Tipo 3, mas essa transferência intramolecular deve ser balanceada por uma suficientemente rápida taxa de transferência interfacial de elétrons a partir do eletrodo. Os intermediários catalíticos até o presente momento identificados, PI e NI, são altamente reativos ^{42, 183, 185} e a transferência intramolecular de elétrons deve ser inerentemente rápida dado o eficiente caminho de tunelamento dentro da enzima. ^{183, 186}



Rápido processo intramolecular. Taxa de turnover (corrente) determinada pela taxa de ciclagem redox do Cu T1. Potencial de redução do Cu T1 influencia mas não define o potencial de eletrocatálise.

Condições Alcalina/Neutra (pH 8)



Lento processo intramolecular. Taxa de turnover (corrente) determinada pela taxa de processos intramoleculares. Cu T1 é o centro de controle eletroquímico e define o potencial de eletrocatálise.

Figura 49. Representações do fluxo catalítico de elétrons através da bilirrubina oxidase imobilizada ao eletrodo. A duas figuras comparam condições (esquerda) em baixo valor de pH, onde o sítio ativo reduz O_2 muito rapidamente e a 'etapa lenta' da reação é a transferência de elétrons via o Cu Tipo 1, e (direita) em alto valor de pH, onde o sítio ativo é menos eficiente e o Cu Tipo 1 se comporta como um centro de controle eletroquímico. ¹⁸⁷ A situação da esquerda produz um voltamograma catalítico em que a corrente aumenta continuamente com o potencial, ao passo que a situação da direita produz um voltamograma sigmoidal com o potencial de meia onda próximo ao potencial do Cu Tipo 1.

No caso da transferência de elétrons intramolecular ser lenta ou limitada por um evento químico tal como transferência de prótons, uma curva catalítica sigmoidal seria esperada, como previsto pelo modelo de dispersão 165 para pequenos valores de k_{cat}/k_0^{max} em alto pH, tendo um potencial de meia onda correspondendo ao potencial redox do Cu Tipo 1 (ou seja, o Cu Tipo 1 atua como o centro de controle eletroquímico da enzima). ¹⁸⁷ Esse pode, de fato, ser o caso em alto pH, em que o formato da curva se torna mais sigmoidal, apesar da menor corrente catalítica. Em pH 8,0 o potencial de meia onda é próximo de 600 mV. O potencial de redução do Cu Tipo 1 tem sido determinado por técnicas de espectroeletroquímicas e valores independentes de 650 mV e 670 mV têm sido obtidos em pH 7. ^{124, 188} Em contraste, a baixo pH a atividade catalítica é tão alta que o centro Tipo 1 se torna o fator limitante para a transferência dos elétrons. Imediatamente após o Cu Tipo 1 receber um elétron a partir do eletrodo, esse elétron é transferido para o cluster trinuclear Tipo 2/Tipo 3 e deve ser reposto. A taxa de reação catalítica é então controlada pelo potencial do eletrodo, o qual conduz a redução do Cu Tipo 1. Apenas se a transferência interfacial de elétrons fosse extremamente fácil seria possível obter uma curva sigmoidal em baixo pH. 165, 187

De forma interessante, em baixo pH o início da atividade deve ser provavelmente maior que o potencial de redução do Cu Tipo 1. Essa observação é facilmente explicada pela rápida e espontânea transferência intramolecular de elétrons que continuamente reoxida o Cu Tipo 1 (mesmo a um potencial em que está inteiramente no estado oxidado, no equilíbrio). O modelo proposto por Solomon ⁴² é então modificado com a proposta de que, sob condições eletroquímicas, e talvez em solução em que não ocorram interações com moléculas redutoras, o estado da enzima totalmente reduzida não se forma durante todo o ciclo catalítico, ou apresenta tempo de vida extremamente curto por reagir muito rapidamente com O₂. Posto de outra forma, exercendo sua função natural, o turnover catalítico da enzima é raramente 'ciclado' tão rapidamente quanto ocorre sob a extrema demanda eletroquímica imposta por um eletrodo sobre o qual a enzima está diretamente acoplada.

5.4 MvBO como catalisador mais eficiente que Platina

Existe muito interesse prático e fundamental em novos eletrocatalisadores capazes de diminuir o sobrepotencial da reação eletroquímica de O_2 (E^{Θ} = 1,23 V). 47, 159, 160, 189-194 Dentre os catalisadores metálicos mais usualmente empregados em cátodos de células a combustível convencionais do tipo PEM, os que apresentam maior atividade são aqueles à base de Platina e incluem as ligas de Pt₃Ni e Pt₃Co. ^{161, 166, 195-198} Novos catalisadores vêm sendo investigados, ^{5, 199, 200} devido ao alto custo da Pt e indesejáveis características (como formação de peróxidos como sub-produtos) que limitam a gama de materiais compatíveis e restringem o uso em novas aplicações como dispositivos médicos implantáveis. O substancial sobrepotencial para a redução de O2 sobre Pt é a maior fonte de ineficiência nas células de baixa temperatura do tipo PEM e esse problema se torna mais evidente em pH neutro. Reações eletroquímicas entre enzimas redox e eletrodos têm sido extensivamente estudadas, não apenas para investigação fundamental das propriedades dos sítios ativos, mas também para obter inspiração e explorar as aplicações reais das enzimas como eletrocatalisadores em biossensores, biorreatores e biocélulas a combustível. ^{16, 201, 202} Algumas 'blue' Cu oxidases têm sido identificadas como sendo catalisadores eficientes na reação de redução de O₂, realizando redução rápida e direta a quatro elétrons, sem formação de intermediários, e com baixos sobrepotenciais. 75, 116, 183, 189, 190, 203, 204

O desempenho das *'blue'* Cu oxidases comparado ao da Pt tem sido destacado por Heller e colaboradores, que alcançaram altas densidades de corrente para a redução de O₂ embutindo lacase e bilirrubina oxidase em um hidrogel polimérico redox contendo complexos de Os-piridina. ^{56, 190, 203, 205} Nesses estudos, um grande número de moléculas de enzima está presente na superfície e existe uma razão alta do número de átomos de Os ligados no polímero por molécula de enzima (cálculos ^b forneceram uma razão de aproximadamente 43 átomos de ósmio para cada molécula de enzima, e uma cobertura da superfície de 12 nmol cm⁻²). ⁵⁶ Nessa condição, a corrente total é limitada pela difusão dos reagentes e o potencial em que a redução de O₂ se inicia depende do potencial de redução do complexo de Os. ^{50, 51, 206-209} Por exemplo, sistemas usando PVI-[Os(da-bpy)₂Cl]^{+/2+} e poly(n-VI₁₅[Os(tpy)(bpy)]^{2+/3+}) como mediadores transferem elétrons nos potenciais de 0,08 V e 0,82 V (*vs* SHE), respectivamente. ^{56, 206} Esses valores são atribuídos ao potencial de redução de cada um dos mediadores e são os potenciais em que as reações com as enzimas ocorrem.

A metodologia proposta para a modificação da superfície do eletrodo pelo aumento da densidade de grupos funcionais naftóicos, já existentes na superfície *'edge'* do grafite pirolítico, seguido pela adsorção das moléculas de enzima, possibilitou um estudo mais aprofundado do sobrepotencial de redução de O₂ catalisado pela bilirrubina oxidase diretamente em contato com a superfície do eletrodo. Sem as limitações eletroquímicas intrínsecas existentes no emprego de mediadores para transferir elétrons entre eletrodo e enzima, a eficiente "comunicação eletrônica" entre enzima e eletrodo permitiu a determinação dos potenciais de redução do átomo de Cu Tipo 1 sob diferentes condições de pH.

A Figura 50A mostra os voltamogramas da redução de O₂ catalisada por bilirrubina oxidase adsorvida sobre GPE modificado (A6A2N–MvBO) e por Pt eletrodepositada sobre GPE comparando, em detalhes, o sobrepotencial da reação para cada sistema. Por conveniência e maior precisão, a comparação entre os potenciais foi feita relativamente ao potencial padrão termodinâmico do par redox O₂/2H₂O, a 25 °C e em pH 6,0 (0,876 V *vs* SHE). ²¹⁰

^b Cálculos baseados em 1.0×10^{-4} g de um polímero redox e 9.2×10^{-5} g de MvBO sobre tecido de carbono de 4 mm de diâmetro e massas moleculares relativas de 60,0 kg (mol MvBO)⁻¹ e 1,5 kg (mol complexo Os)⁻¹.



Figura 50. (A) Comparação entre a redução de O_2 catalisada por GPE modificado com A6A2N–MvBO e por Pt eletrodepositada sobre GPE, em pH 6,0 e 25 °C (as curvas foram normalizadas por área geométrica). (B) Derivada segunda das curvas de redução de O_2 , mostrando o potencial em que existe a 'máxima aceleração' da reação para ambos os catalisadores. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 6,0; 25 °C, velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹ e velocidade angular do eletrodo de 2500 rpm.

As densidades de corrente para a Pt eletrodepositada sobre a superfície de GPE são demasiado maiores que as obtidas para a enzima adsorvida, e alcançam valor limite em baixos potenciais (como referência, GPE platinizado resultou em corrente limite de aproximadamente 10 mA cm⁻² – área geométrica, comparado ao valor de aproximadamente 0,7 mA cm⁻², em 0,3 V, para GPE modificado com A6A2N–MvBO). Uma cobertura de Pt de aproximadamente 2150 pmol cm⁻² foi calculada a partir da carga de oxidação de monóxido de carbono previamente

adsorvido sobre a superfície da Pt, em 50 mV *vs* ERH, em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e 25 °C. Para comparação, foi estimado que o recobrimento da superfície do eletrodo por bilirrubina oxidase eletroativa deve ser menor que 2 pmol cm⁻², baseado na impossibilidade de observar qualquer sinal faradáico não catalítico (non-turnover) confiável para a enzima na ausência de O₂, o qual deveria surgir da transferência reversível de elétrons entre eletrodo e o Cu Tipo 1 (note que essa quantidade é muito menor que a quantidade de enzima adicionada à superfície do eletrodo durante a preparação do filme catalítico). Esse valor de recobrimento por enzima foi estimado com base no diâmetro médio das moléculas de enzimas multicobre oxidases, cerca de 6 nm, e a área geométrica do eletrodo. Dessa forma, foi possível estimar que a atividade específica da bilirrubina oxidase é de 350 μ A pmol⁻¹ de enzima ativa na superfície, cerca de 70 vezes maior que a atividade específica da Pt para a mesma reação (aproximadamente 5 μ A pmol⁻¹ de Pt ativa na superfície), sob as mesmas condições experimentais.

Outra dificuldade encontrada foi como definir um 'sobrepotencial' para o complexo perfil voltamétrico da redução de O_2 por MvBO. Como referência, foi adotada uma aproximação empírica para sobrepotencial a derivada segunda das curvas de redução (Figura 50B), ou seja, o valor de potencial em que a 'aceleração da reação' é máxima. O sobrepotencial para a redução catalítica de O_2 por bilirrubina oxidase é consideravelmente menor que o obtido com Pt eletrodepositada em GPE, sob as mesmas condições experimentais. Esse menor sobrepotencial é também evidente em comparação à mesma reação catalisada por Pt(111), mostrado na Figura 38D, em que a corrente de redução de O_2 catalisada por MvBO adsorvida sobre Pt(111) aparece como uma 'pré-curva catalítica' frente à curva de redução de O_2 sobre o metal. Não obstante, tem-se ainda que o sobrepotencial da reação para a bilirrubina oxidase diminui cerca de 50 mV quando o pH é aumentado de 5,0 para 8,0 (Figura 37).

Esses resultados podem ser uma característica geral das '*blue*' Cu oxidases que possuem altos valores de potencial redox para o Cu Tipo 1, mas tal comparação ainda não havia sido diretamente demonstrada. Sob a luz da discussão acima, onde fica claro que o Cu Tipo 1 possui um papel crucial na mediação dos elétrons, é previsto aqui que o sobrepotencial para a redução de O_2 está associado ao centro Tipo 2/Tipo 3 e o valor real do sobrepotencial deve ser ainda menor, até mesmo a uma extensão de catalisador bidirecional. Embora não foi detectada a oxidação de água catalisada por MvBO (dados não mostrados devido a resultados insatisfatórios) de acordo com experimentos históricos, ^{211, 212} uma enzima mutante com um sítio Tipo 1 'aperfeiçoado', isto é, apresentando um potencial ainda maior, e combinado com pequenas reorganizações de energia (particularmente necessárias para uma transferência de elétrons do tipo *uphill* ou transferência reversível de elétrons) pode ser desenvolvida para se obter um desempenho de eletrocatalisador 'reversível' para O₂.

5.5 Estudos de inibição da MvBO

Um parâmetro importante a ser considerado na caracterização de catalisadores para emprego em células a combustível é a estabilidade e inibição por agentes comumente encontrados na natureza. A vasta maioria dos estudos de inibição em cátodo de células enzimáticas é voltada para a inibição das lacases, sendo pequenos ânions como fluoreto e azida os mais investigados. ²¹³ Porém, a maioria dos estudos de inibição de multicobre oxidases tem sido feita por meio de ensaios enzimáticos em solução, envolvendo compostos doadores de elétrons, como o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), utilizado como ilustrado na seção 5.1 para determinação da atividade específica da *Mv*BO antes e depois da purificação. Tais estudos estabelecem que a força de interação inibidor–enzima segue a ordem: N₃⁻ > SCN⁻ > F⁻ > Cl⁻ > Br⁻. ²¹⁴⁻²¹⁶

Neste trabalho, foram investigados os efeitos que alguns monoânions (Cl⁻, F⁻, CN⁻, N₃⁻, sendo fluoreto e cloreto haletos comumente presentes na água ²¹⁴) e metanol (comumente usado como combustível nas células) causam sobre a eletrocatalise de redução de O₂ por MvBO. Uma vez que a estabilidade do sistema é um fator crucial para o desempenho de uma célula, é importante determinar os efeitos que esses inibidores proporcionam no âmbito da aplicação da enzima MvBO como catalisador catódico. ^{217, 218}

5.5.1 Fluoreto, cloreto, azida e cianeto

Na presença de concentrações de azida na ordem de micromolar, a catálise de redução de oxigênio é drasticamente diminuída. A inibição é evidenciada predominantemente pela diminuição da magnitude da corrente catalítica conforme a concentração de azida inserida na solução aumenta, como mostrado na Figura 51A. O gráfico interno mostra a derivada das varreduras catódicas de redução de O₂, revelando o deslocamento do valor de E_{cat} com o aumento da concentração de azida na solução.



Figura 51. Efeito de inibição na reação de redução de O_2 catalisada por MvBO, causado por (A) azida, (B) fluoreto (C) cloreto e (D) cianeto. Setas mostram a direção de varredura catalítica. Gráficos internos mostram as derivadas das curvas catalíticas de varredura no sentido catódico com o aumento da concentração de inibidor, como mostrado pelas setas longas.

A Figura 51B mostra a inibição da enzima MvBO por fluoreto, em que aproximadamente 20 vezes mais fluoreto é necessário para promover a mesma taxa de inibição promovida por azida. Um efeito curioso ocorreu durante a varredura anódica, em que a magnitude da corrente aumentou levemente, como se a concentração de oxigênio na solução estivesse aumentando (ou os átomos de cobre(I) fossem oxidados para cobre(II) por algum agente externo). Ao repetir a varredura, entretanto, o formato da curva permaneceu o mesmo. Essa histerese desapareceu para velocidades de varredura superiores a 50 mV s⁻¹, sugerindo que essa histerese seja um fenômeno relativamente lento. Dentre os inibidores monovalentes estudados, somente a azida não apresentou essa histerese.

Uma concentração demasiado maior de cloreto precisou ser adicionada à solução, especialmente em comparação às concentrações de fluoreto e azida, antes que qualquer efeito de inibição por esse haleto fosse observado. De fato, concentrações na ordem de milimolar para o cloreto são necessárias para iniciar a inibição da enzima, sendo que 24 vezes mais cloreto é requerido para inibir a enzima na mesma taxa que fluoreto. Para o íon cloreto, como fluoreto e azida, a magnitude da corrente diminui com o aumento da concentração de cloreto em solução (Figura 51C), porém, ao contrário do observado para os dois íons anteriores, não houve deslocamento de E_{cat} com o aumento da concentração de cloreto a redução de oxigênio. Por outro lado, o efeito de histerese observado para o fluoreto é mais evidente para o cloreto, de tal forma que em menores potenciais e altas velocidades de varredura a histerese ainda era observada.

Comportamento muito semelhante foi observado para a inibição da enzima por íons cianeto (Figura 51D). O fenômeno de histerese também é observado, principalmente para cerca de 80% de inibição, mas a concentração de cianeto necessária para inibir a MvBO na mesma taxa que cloreto é de cerca de 1000 vezes menor, corroborando a ordem força de interação dos inibidores com as multicobre oxidases, apresentado anteriormente, em que azida e cianeto são os inibidores mais fortes.

A Figura 52 mostra os deslocamentos no valor de E_{cat} para MvBO inibida por azida (verde), fluoreto (azul), cloreto (vermelho) e cianeto (preto), obtidos a partir das derivadas das varreduras no sentido catódico das curvas de redução de oxigênio, com o aumento da concentração de inibidor. O íon cloreto é o único que não apresenta deslocamento significativo nos valores de potencial catalítico. O íon cianeto, apesar de diminuir rapidamente a atividade catalítica do eletrodo, apresenta deslocamento de E_{cat} no sentido positivo, diminuindo o sobrepotencial da reação. Azida e fluoreto, por outro lado, apresentam deslocamento de E_{cat} no sentido negativo, aumentando o sobrepotencial da reação em aproximadamente 95 mV e 64 mV, respectivamente.



Figura 52. Comparação dos deslocamentos dos potenciais catalíticos com o aumento da concentração de inibidor, usando as derivadas das curvas de redução de O_2 (varreduras no sentido catódico) apresentadas nos gráficos internos dos painéis da Figura 51.

As constantes de inibição foram obtidas usando um modelo que assumiu o seguinte equilíbrio:

$$Cu(I) + X^{-} \rightleftharpoons Cu(II) - X, \text{ em que } K_{i} = \frac{[Cu(I)][X^{-}]}{[Cu(II) - X]}$$
(15)

Assumindo também que, no ponto em que i_{lim} é medido, 0,34 V *vs* SHE, todos os átomos de cobre estão na forma reduzida e, com isso, tem-se $i_{\text{lim}} \propto [\text{Cu}(\text{I})]$. A concentração total de cobre é dada por $[\text{Cu}]_0 = [\text{Cu}(\text{I})] + [\text{Cu}(\text{II})$, cujo valor permanece constante. Substituindo na equação (15) os termos acima assumidos, obtém-se a equação (16),

$$K_{i} = \frac{\left[\operatorname{Cu}(\mathrm{I})\right]\left[\mathrm{X}^{-}\right]}{\left[\operatorname{Cu}\right]_{0} - \left[\operatorname{Cu}(\mathrm{I})\right]}$$
(16)

que, rearranjada, resulta na equação (17):

$$\frac{1}{[Cu(I)]} = \frac{1}{[Cu]_0} + \frac{1}{K_i [Cu]_0} \cdot [X^-]$$
(17)

Uma vez que [Cu(I)] é proporcional a i_{lim} , um gráfico de 1/ i_{lim} (onde i_{lim} é a corrente limite em 340 mV) vs [X-] (a concentração de inibidor) resulta em uma reta cujo gradiente é $1/aK_i$ e intersecção é 1/a, sendo a uma constante. K_i é então obtido pela divisão da intersecção da reta pelo seu gradiente (Figura 53).



Figura 53. (A) Gráfico de $1/i_{\text{lim}} vs [X^-]$ para determinação das constantes de inibição, K_i e (B) gráfico de $i_{\text{lim}} vs \text{ Log } [X^-]$ para determinação dos valores de I_{50} para cada um dos inibidores monovalentes investigados. Valores de *i* registrados a 340 mV *vs* SHE.

Os valores de K_i e I₅₀ (concentração de inibidor necessária para diminuir a atividade em 50% de seu valor inicial) estão apresentados na Tabela 7. Claramente se observa que a sequência decrescente de força de interação entre inibidor e enzima (N₃⁻ > CN⁻ > F⁻ > Cl⁻) para reações enzimáticas convencionais em solução é obedecida também para as reações bioeletroquímicas, para enzimas adsorvidas sobre a superfície de um eletrodo.

Inibidor	$K_{ m i}$ / ${ m M}$	${ m I_{50}}/{ m M}$	
Azida	131×10^{-6}	43×10^{-6}	
Cianeto	$480 imes 10^{-6}$	522×10^{-6}	
Fluoreto	$9,84 imes 10^{-3}$	$6,45 imes 10^{-3}$	
Cloreto	454×10^{-3}	$84,6 \times 10^{-3}$	

Tabela 7 – Constantes de inibição para MvBO na presença de azida, cianeto, fluoreto e cloreto.

5.5.1.1 Onde os inibidores se ligam?

Tem sido proposto que o ânion fluoreto se liga ao átomo de cobre Tipo 2 das multicobre oxidases, devido aos experimentos de EPR na presença de fluoreto revelarem um *splitting* hiperfino no sinal do Cu T2. ²¹⁹⁻²²¹ Ademais, estudos usando EPR sugerem que dois íons fluoreto devem se ligar ao átomo de Cu T2. ²²¹ O inibidor deve afetar também os átomos de Cu T3 de forma semelhante (apesar de que os Cu's T3 não são observáveis por experimentos de EPR). De fato, o íon fluoreto afeta o potencial de redução dos Cu's T3 em aproximadamente 200 mV. ²²²

Para a inibição das enzimas com azida, observam-se padrões distintos de interação para as várias multicobre oxidases: para a lacase CotA, a azida se liga ao sítio ativo de tal forma que um dos N terminais da molécula forma uma ponte com os dois átomos de Cu T3, ²²³ mostrado na Figura 54A. Para ascorbato oxidase, duas moléculas de azida estão ligadas a um único Cu T3, ²²³ Fig. 54B. Para ceruloplasmina, uma molécula de azida se liga a apenas um dos Cu's T3, ²²⁴ embora algumas publicações mostrem que a azida se liga ao Cu T2, verificado pelo deslocamento do sinal T2 nos experimentos de EPR. ²²⁵ Entretanto, esse deslocamento pode ser devido à alta concentração de azida usada nos experimentos (10 mmol L⁻¹), que pode causar desnaturação da enzima e fazer com que os átomos de cobre apareçam tanto como íons livres (Cu²⁺) quanto na forma de complexo cobre-azida. Outras propostas sugerem que a azida é capaz de se ligar com os três átomos de cobre do cluster trinuclear ao mesmo tempo. ²²⁶



Figura 54. Ligação da azida em (A) lacase de CotA e (B) ascorbato oxidase. Os átomos de Cu estão mostrados como esferas marrons (T2 = Tipo 2 e T3 = Tipo 3), água/hidroxila estão mostrados como esferas vermelhas e azida como barras verdes. Distâncias de ligação mostradas em Ångstrøn.

Para o caso dos ions cloreto, a única evidência mais concreta obtida experimentalmente vem da estrutura cristalográfica da lacase de *Melanocarpus albomyces*, em que existe um íon cloreto ligado ao Cu T2 (Figura 55). ¹¹³



Figura 55. Posição de ligação do cloreto na estrutura cristalográfica da lacase de *Melanocarpus albomyces*. Cobres mostrados em marrom, cloreto em verde e oxigênio (ligado entre os dois Cu's T3) em vermelho. A distância de ligação está mostrada em Ångstrøn.

Para o íon cianeto, existem várias publicações mostrando a empregabilidade deste composto como agente quelante dos átomos de cobre da enzima durante o processo de remoção dos Cu's para substituição por outros átomos metálicos. ²²⁷⁻²³¹

De fato, dependendo das condições experimentais, é possível controlar quantitativamente quais átomos de cobre serão removidos, de tal forma que a baixas concentrações de cianeto (50 mmol L^{-1}), e curtos tempos de incubação (2–3 horas) em diálise, o átomo de Cu Tipo 2 é removido preferencialmente. Por outro lado, em altas concentrações de cianeto e longos períodos de incubação, todos os átomos de cobre são removidos da proteína. ^{228, 232} Entretanto, a força de interação entre enzima e inibidor difere dentre os vários tipos de multicobre oxidases, de tal forma que para algumas lacases o método de remoção dos átomos de cobre com cianeto não é muito eficiente, devido à menor força de interação entre cianeto e átomos de cobre, possuindo estes últimos, para algumas enzimas, forte interação com os aminoácidos, especialmente a ligação Cu T1/S-Cis. ²²⁸

As diferenças aparentes entre os modos de ligação dos inibidores e as multicobre oxidases pode ser devido à cristalização das proteínas ter ocorrido em diferentes estágios do ciclo catalítico, ou que podem apresentar formas não pertencentes ao ciclo catalítico como um todo. Ascorbato oxidase e lacases de CotA e Melanocarpus albomyces apresentam apenas 35% de identidade da sequência de aminoácidos da bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria e, ao mesmo tempo que a discussão acima pode fornecer indícios de onde e como os inibidores se ligam ao sítio ativo da MvBO estudada nessa tese, também podem não indicar absolutamente nada, dada as diferenças entre as sequências de aminoácidos. Apesar de existirem poucas formas de controlar o estado em que a enzima se cristaliza, é possível realizar experimentos de EPR sob potencial controlado, fornecendo maiores informações a respeito dos mecanismos de redução de oxigênio e de inibição da reação. Entretanto, pode não fazer sentido tentar definir um único e isolado sítio de ligação para cada inibidor por causa do cluster T2/T3 poder existir como um cluster flexível, que sofre reorganização estrutural quando inibidores se ligam. ²³³

5.5.2 Metanol

A Figura 56 mostra o efeito da concentração de metanol na catálise da MvBO até 12,2 mol L⁻¹ de metanol em solução (veja seção 4.8). Os experimentos foram realizados por cronoamperometria, seguida de 2-3 varreduras de voltametria cíclica, de tal forma que as soluções contendo metanol eram intercaladas com soluções livres de metanol, de forma a verificar a taxa de recuperação do filme após cada inibição com metanol.

Como pode ser observado na Figura 56C, o aumento da concentração de metanol não desloca o valor de E_{cat} . A solubilidade de oxigênio em metanol a 0 °C é 11 vezes maior e a 40 °C é 21 vezes maior que em água, ^{234, 235} de tal forma que os resultados mostram a real inibição de MvBO por metanol e não simples atenuação da corrente por diminuição da solubilidade de oxigênio conforme a concentração de metanol aumenta (porém, deve ser mencionado que o efeito de diminuição do transporte de prótons em metanol não foi levado em conta). Se o pH foi mantido como pH 4 para cada concentração de metanol, então, em baixas concentrações de metanol (0–1 mol L⁻¹), a atividade eletrocatalítica da MvBO, medida como magnitude da corrente, foi aumentada (foi mais negativa) em comparação à solução tampão livre de metanol, possivelmente devido à maior solubilidade de oxigênio em metanol. ²³⁶



Figura 56. Efeito do metanol na catálise de redução de O_2 catalisada pelo filme de A6A2N–*Mv*BO: (A) Cronoamperometrias para registro da variação da corrente em função do tempo e da concentração de metanol. (B) Voltamogramas cíclicos registrados após as cronoamperometrias, para cada valor de [MeOH], mostrados em (A); (C) Derivadas das curvas catalíticas em diferentes concentrações de metanol, mostradas em (B). A linha tracejada mostra o máximo das curvas na ausência de metanol e a linha pontilhada mostra o máximo das curvas na presença de metanol. Condição: tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, 25 °C e 2500 rpm. Velocidade de varredura em (B) de 5mV s⁻¹.

Resultados mostrando a tolerância ao metanol para um cátodo contendo lacases foram previamente publicados, revelando que tal tolerância era maior que a tolerância oferecida pela platina. ²¹⁸ A perda da densidade de corrente foi atribuída ao 'desinchamento' da matriz de hidrogel do mediador redox e à pobre transferência de elétrons causada por se empregar metanol como solvente. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou a tolerância de lacases a 10 mol L^{-1} de metanol em solução e redução de corrente de cerca de 30%, além do valor de potencial de circuito aberto ter sido reduzido em 300 mV em comparação ao mesmo sistema na ausência de metanol. ²³⁷ Nos resultados apresentados nessa tese, existe uma redução mais evidente da corrente na presença de 10 mol L^{-1} de metanol em comparação a zero metanol em solução (apesar de que grande parte da diminuição da corrente foi atribuída à perda natural de atividade do filme catalítico ao longo do tempo – seção 5.5.3 – e cujo efeito é muito difícil de ser fatorado dos resultados obtidos por tratamento matemático, dadas as interferências do metanol na atividade da enzima). Por outro lado, o valor de E_{cat} (o qual é deslocado proporcionalmente ao potencial de circuito aberto) não mudou entre 0 e 10 mol L^{-1} de metanol em solução. Isso pode ser reflexo do fato das lacases da ref. [237] estarem imobilizadas em uma matriz hidrogel redox, onde a transferência de elétrons é mediada, ao invés de imobilizada na superfície de um eletrodo com transferência direta de elétrons, empregado nesse trabalho.

O fato do valor de E_{cat} não ser deslocado na presença de metanol é uma vantagem para a aplicação da bilirrubina oxidase como catalisador catódico em células a combustível usando metanol no ânodo: para um máximo de potência a ser obtida na célula, os valores de potencial catalítico para ânodo e cátodo devem permanecer o mais distante possível, pois $P = I \times V$ (sendo P a potência, I a corrente e V a diferença de potencial), e uma maior diferença de potencial resulta em maior potência. Em DMFC's (direct methanol fuel cells) e DEFC's (direct ethanol fuel cells), metanol/etanol crossover é um problema que diminui a eficiência da célula. DMFC's são células a combustível de baixa temperatura, as quais geralmente empregam PEM (polymer electrolyte membrane) como eletrólito e platina como catalisador, tanto no ânodo quando no cátodo. O crossover é a permeação de reagente através da membrana. A oxidação de metanol permeado e a redução de oxigênio podem ocorrer simultaneamente, em diferentes sítios no cátodo de platina, o que produz um potencial misto no cátodo e, ademais, posterior deslocamento do potencial pode ser causado pela adsorção de CO oriundo da incompleta oxidação do metanol, envenenando a platina. Além disso, metanol reage com oxigênio presente no cátodo para formar CO_2 , o qual diminui a taxa de redução de oxigênio em 20%. Em contraste à reação de redução de oxigênio catalisada por MvBO, a presença de metanol diminui o potencial do cátodo de platina (aumenta o sobrepotencial de redução) em até 200 mV. ²³⁸⁻²⁴¹

5.5.3 Inativação da MvBO por excesso de substrato

Ao longo do desenvolvimento do trabalho, era comum constatar a diminuição de atividade do filme catalítico frente à redução de oxigênio, independentemente das condições experimentais aplicadas ao sistema. Por se tratar de moléculas de enzima adsorvidas por interação hidrofóbica/hidrofílica sobre a superfície edge de um grafite pirolítico, a probabilidade de que as moléculas de enzima se dessorvessem da superfície, e/ou perdessem atividade de forma gradual por desnaturação, seria racionalmente aceitável. De fato, tais dessorção e inativação seriam coerentes com o comportamento de um componente bioquímico alocado fora das condições naturais de existência, *i.e.* fora do habitat natural do fungo hospedeiro Myrothecium verrucaria. Como consequência dessa perda gradual de atividade do filme catalítico, era aplicada às análises de corrente *vs* potencial uma correção à queda de corrente, sempre que necessária, para que interpretações mais corretas e confiáveis fossem feitas e, dessa forma, informações mais conclusivas, e ainda nunca investigadas, pudessem ser exploradas. Um dos casos em que tal correção foi empregada se encontra na seção 5.3, em que a perda de atividade do filme catalítico foi subtraída antes da determinação dos parâmetros cinéticos bioquímicos da proteína, como as constantes de Michaelis-Menten.

Além disso, também era comum verificar que a taxa de decaimento de corrente quando o eletrodo era mantido em funcionamento contínuo não seguia o

mesmo padrão de diminuição de corrente quando comparada às situações em que o eletrodo era armazenado em solução tampão fosfato de sódio, em temperatura entre 4–8 °C, em que a atividade do filme catalítico era medida por 6 séries de 5 varreduras de voltametria cíclica, dentro de um intervalo de 21 dias consecutivos (Figura 57). Devido a tal comportamento, era racional a idéia de que as moléculas de enzima se dessorviam mais rapidamente quando sob atividade contínua (potencial aplicado constantemente ao eletrodo), em contato com solução saturada de O_2 .



Figura 57. (A) Estabilidade de um eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO submetido a varreduras de voltametria cíclica para a redução de oxigênio, operando continuamente durante 14 horas. Gráfico interno mostra a diminuição da corrente com o tempo, amostrada em 0,1 V vs ECS, a cada 10 ciclos (curva em vermelho mostra a diminuição da corrente seguindo um decaimento exponencial de segunda ordem). (B) Estabilidade de um eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO (curva preta) e de um eletrodo modificado apenas por adsorção convencional de MvBO (curva em vermelho) submetidos a 6 séries de 5 varreduras de voltametria cíclica para a redução de oxigênio, em um intervalo de 21 dias de experimento. Condições: solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,0, a 25 °C, 2500 rpm e 5 mV s⁻¹, saturada de O₂.

Entretanto, na ocasião de um estudo da dependência da corrente catalítica com a velocidade de rotação do eletrodo em diferentes concentrações de O_2 , foi verificado um comportamento muito interessante, e que deu início a uma investigação a respeito da estabilidade bioeletroquímica da enzima. Durante os experimentos, foi constatado que a diminuição da atividade do filme catalítico ao longo do tempo era mais evidente para maiores concentrações de O_2 , dado que em baixa percentagem de gás em solução (~2,0%), não foi observada nenhuma queda de corrente (Figura 58). Esse resultado sugere que o aumento na concentração de oxigênio faz com que a diminuição da atividade do filme também aumente. Dessa forma, ter-se-ia uma condição em que o próprio substrato da reação agiria como "inibidor" da enzima, a partir de uma determinada concentração em solução.



Figura 58. Cronoamperometrias do filme catalítico em 100 mV *vs* ECS, mostrando a dependência da corrente catalítica com a velocidade angular do eletrodo de GPE modificado com A6A2N–MvBO, sob diferentes concentrações de O₂. Os números acima e abaixo das curvas indicam a velocidade angular do eletrodo, em RPM. Condições: tampão fosfato de sódio (TFS) 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,0, 25 °C.

Se a especulação de que o excesso de oxigênio cause inativação do filme catalítico for verdadeira, e tal queda de atividade não for causada por dessorção

de proteína da superfície do eletrodo, a substituição de oxigênio por um gás inerte impediria que a inibição ocorresse enquanto oxigênio estivesse ausente do meio. Dessa forma, após a re-inserção do reagente na solução, a corrente catalítica retomaria o mesmo valor que apresentava no ponto em que oxigênio foi retirado da solução, e seria então observada a diminuição dessa corrente com o tempo. Sendo assim, foi realizado um experimento de cronoamperometria de três estágios, em que a redução de oxigênio, registrada durante aproximadamente 40 minutos (1º estágio), foi interrompida pela inserção de argônio na solução, por 50 minutos (2º estágio), e retomada pela re-inserção do reagente (3º estágio), como pode ser visto na Figura 59.



Figura 59. Cronoamperometria de três estágios para verificação da inativação da MvBO por excesso de oxigênio em solução. Primeiro estágio (área amarela): verificação do decaimento da corrente de redução de O₂ durante 40 minutos; segundo estágio (área cinza): interrupção da reação por inserção de argônio, durante 50 minutos; terceiro estágio (área azul): retomada da reação de redução de oxigênio, por mais 50 minutos, por re-borbulhamento do gás na solução. Condição: tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, em pH 6,15, 25 °C e 2500 rpm. Curvas em azul e vermelho são ajustes à curva experimental por equação de decaimento exponencial de segunda ordem, como verificado no gráfico interno à Figura 57A.

Com o eletrodo rotacionando a 2500 rpm e eletrólito saturado com oxigênio, a cronoamperometria foi iniciada em 600 mV vs ECS (durante 1 minuto), saltando para 100 mV durante o restante do tempo. No primeiro estágio do experimento, a corrente alcançou um valor máximo de –9,6 μ A, diminuindo exponencialmente até –7,8 μ A, após 40 minutos. Em seguida, argônio foi inserido na célula (por borbulhamento direto no eletrólito), expulsando o oxigênio presente na solução, e a corrente catalítica decaiu drasticamente até –0,01 μ A, durante 50 minutos. Por fim, oxigênio foi inserido novamente na solução, no mesmo fluxo que no primeiro estágio, e a corrente reassumiu o valor de –7,8 μ A, que foi exatamente o mesmo valor de corrente que o filme catalítico apresentava quando se iniciou a inserção de argônio na solução, e essa corrente continuou a decair exponencialmente, como no primeiro estágio.

A partir dos resultados mostrados nas figuras anteriores, fica evidente que a diminuição de corrente é atribuída à presença de oxigênio em solução, principalmente pelo fato dos valores das correntes ao final do primeiro estágio e início do terceiro, na Figura 59, serem exatamente iguais. Essa diminuição de atividade observada na presença de oxigênio pode ser atribuída ao efeito do 'excesso' de substrato em solução, agindo como "inibidor" da enzima. A atribuição do termo 'excesso' é cabível dado os valores de concentração dos componentes do sistema. Em 100% de oxigênio em solução, a concentração do reagente é de 1,3 mmol L^{-1} (veja os valores de concentração de oxigênio em mol L^{-1} e em percentagem na Tabela 6), o que corresponde a 2,6 × 10⁷ vezes mais oxigênio em solução em comparação à quantidade estimada de enzima presente no eletrodo (quantidade máxima ideal de 1 × 10⁻¹² mol de enzima adsorvida sobre uma superfície de 0,049 cm² e 2,6 × 10⁻⁵ mol de oxigênio em 20 mL de solução eletrolítica).

Se a diminuição da atividade catalítica fosse atribuída à dessorção de moléculas de enzima da superfície do eletrodo, a corrente de redução estaria em constante decaimento, principalmente durante os 50 minutos em que argônio era mantido dentro da célula. Como conseqüência, o valor de corrente ao final do primeiro estágio na Figura 59 não coincidiria com o valor da corrente no início do terceiro estágio, uma vez que as moléculas de enzima estariam se dessorvendo constantemente ao longo do tempo, e menor quantidade de enzima estaria ativa a cada instante do experimento. Argumento similar se emprega ao potencial aplicado ao eletrodo, o qual permaneceu o mesmo durante todo o tempo de experimento (100 mV vs ECS), principalmente na presença de argônio e, dessa forma, uma especulação a respeito da desnaturação da enzima causada pelo potencial aplicado pode ser descartada. Ao contrário do esperado para um efeito de dessorção das enzimas, o que se observa é que a diminuição da atividade é interrompida durante o período de tempo em que argônio é mantido em solução, sendo reiniciada quando oxigênio é reinserido na célula. Porém, esses resultados apenas mostram um efeito presente na catálise da MvBO para a redução de oxigênio e estão longe de serem conclusivos. Ao contrário, um estudo envolvendo técnicas avançadas de caracterização espectroscópica, como absorção de Raios-X in situ, ^{242, 243} deve ser realizado, com dificuldades inerentes as quais caracterizariam tal estudo como objeto de trabalho para uma tese inteira e, portanto, está fora do escopo da presente tese.

Apesar das informações obtidas serem importantes para o conhecimento das características de comportamento da enzima (e que podem ser semelhantes a outras enzimas empregadas comumente em células a combustível enzimáticas), a inativação da enzima pode ser um fator limitante para a aplicação como catalisador da reação de redução de oxigênio em um cátodo de célula eletroquímica. Essa baixa vida útil comprometeria a operação da célula por longos períodos de tempo.

Neste contexto, um estudo mais avançado a respeito de outras metodologias de imobilização da enzima e confecção de eletrodos com elevada quantidade de catalisador eletroquimicamente ativo se torna crucial no empenho em desenvolver uma célula a combustível enzimática de aplicação prática dentro dos padrões desejados de durabilidade, ao longo de anos de funcionamento.

Conclusões

A enzima bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria se adsorve sobre a superfície 'edge' de grafite pirolítico covalentemente modificado com a função orgânica naftil-2-carboxilato por acoplamento de sal de diazônio, intercambiando elétrons com o eletrodo a elevadas taxas de transferência. Uma gama de moléculas orgânicas, de diferentes comprimentos e hidrofobicidade, foi investigada para determinar qual tipo de grupo funcional apresenta melhor interação com as moléculas de enzima. Os eletrodos modificados com o grupo funcional naftil-2-carboxilato, recobertos por bilirrubina oxidase, resultam em voltamogramas para a redução eletrocatalítica de O₂ com maior densidade de corrente, até quatro vezes a corrente obtida para a mesma reação com eletrodos não modificados, contendo a enzima adsorvida de forma convencional. Para os eletrodos modificados com moléculas orgânicas apolares, ou com polaridade positiva, as densidades de corrente obtidas são menores que as obtidas para os eletrodos não modificados por acoplamento de diazônio, mostrando a importância do grupo carboxílico acoplado à estrutura hidrofóbica naftílica. Como consequência, a corrente por molécula de bilirrubina oxidase (a atividade específica) é maior comparada a estudos em que a enzima foi imobilizada em hidrogel contendo complexos redox ativos como mediadores de elétrons e, ainda mais importante, é cerca de 70 vezes maior que a corrente por átomo de Platina ativa eletrodepositada sobre a superfície de GPE.

O formato dos voltamogramas para a redução de O_2 catalisada por bilirrubina oxidase é muito semelhante para ambas as superfícies não modificada e modificada com o ácido 2-naftóico, e também para as superfícies de monocristal de Au(111) e Pt(111), revelando para estes últimos que a atividade enzimática se inicia muito antes da catálise inorgânica. Esse comportamento, observado pela primeira vez através da adsorção da bilirrubina oxidase sobre ouro e platina (dos Santos, L. *et al.* **Mechanistic Studies of the 'Blue' Cu Enzyme, Bilirubin Oxidase, as a Highly Efficient Electrocatalyst for the Oxygen Reduction Reaction** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, DOI:10.1039/C0CP00018C), sugere que a atividade da enzima não depende da modificação da superfície do eletrodo, mas a maior densidade de corrente, oriunda da maior quantidade de moléculas de enzima adsorvida após a modificação, depende de a superfície estar modificada pela função orgânica ácido 2-naftóico. A atividade eletrocatalítica da bilirrubina oxidase aparece como uma curva proeminente antecipada em potencial à curva obtida por catálise com Platina, sob as mesmas condições experimentais, revelando o menor sobrepotencial para a catálise enzimática de redução de O_2 . As comparações são estendidas para medidas em um intervalo de valores de pH entre 5,0 e 8,0, sendo que, em pH 6,0, o potencial de início da atividade da enzima, medido pelo 'máximo da aceleração' da reação com relação ao potencial aplicado, é de 140 mV menor que o potencial reversível termodinâmico do par $O_2/2H_2O$.

A variação do formato do voltamograma com o pH, linear em pH 5,0 e tornando-se sigmoidal com o aumento do valor do pH do meio, reproduz a dependência do $K_{\rm M}$ com o potencial aplicado ao eletrodo, sob os mesmos valores de pH estudados. Isso mostra que a etapa determinante do processo, em pH 5,0, se dá pela transferência de elétrons dependente do potencial, em que a atividade enzimática é muito alta e tanto a transferência intramolecular de elétrons quanto a transferência dos elétrons do eletrodo em direção ao sítio ativo da enzima dependem do potencial aplicado. Entretanto, esse comportamento muda em altos valores de pH, de tal forma que em pH 8,0 o processo reacional passa a ser eletroquimicamente independente, *i.e.* se torna independente do sobrepotencial aplicado após a ativação da reação. A atividade catalítica se torna menor e passa a não depender mais da taxa de transferência de elétrons entre eletrodo e sítio ativo, mas apenas da disponibilidade de prótons no meio reacional e consequente transferência de prótons entre o(s) aminoácido(s) envolvidos na reação de redução e as espécies oxigenadas. Essas observações permitiram, portanto, propor uma alteração ao mecanismo reacional em que, sob condições eletroquímicas, o estado da enzima totalmente reduzida não se forma durante todo o ciclo catalítico, ou apresenta tempo de vida extremamente curto por reagir rapidamente com O₂.

A aplicação do modelo de dispersão das taxas de transferência de elétrons, o qual assume a possibilidade de alteração da orientação das moléculas de enzima adsorvidas sobre a superfície do eletrodo, revela que a variação da temperatura (parâmetro de maior influência na orientação das moléculas) não causa nenhum efeito de dispersão ao filme catalítico, de tal forma que a variação das distâncias de transferência de elétrons entre enzima e eletrodo é de apenas 1 ângstron, não interferindo nos valores de taxa de transferência, corroborando a teoria de que os elétrons entram na enzima através de um único sítio da proteína, sendo o sítio contendo o Cu Tipo 1 operativo em todos os casos. Entretanto, para um mesmo valor de temperatura e diferentes valores de pH, observa-se um aumento nas taxas de k_0^{max} com o aumento do pH, indicando que a taxa de transferência de elétrons entre o eletrodo e o sítio ativo das enzimas se torna mais efetiva em altos valores de pH, possibilitando o menor valor de sobrepotencial de ativação da reação observado em maiores valores de pH.

Os resultados inéditos de inibição da bilirrubina oxidase mostraram maior resistência da enzima à presença de haletos e pseudo-haletos em comparação a outras multicobre oxidases, como lacase, revelada através dos maiores valores obtidos para K_i e I₅₀, seguindo a mesma sequência de força de inibição N₃⁻ > CN⁻ $> F^{-} > Cl^{-}$. Além dos experimentos de inibição por haletos e pseudo-haletos, é observado, também pela primeira vez, a inativação gradual da bilirrubina oxidase por excesso de reagente, oxigênio, em solução. Na presença de oxigênio, observase uma diminuição da atividade da enzima seguindo um decaimento exponencial de segunda ordem ao longo do tempo. Porém, esse decaimento não ocorre na presença de gás inerte, como argônio. A diminuição da atividade catalítica atribuída à dessorção de moléculas de enzima da superfície do eletrodo resultaria no constante decaimento da corrente de redução com o tempo. O que se observa, no entanto, é a interrupção da diminuição da atividade durante o período em que argônio é mantido em solução, sendo a queda de atividade reiniciada, seguindo o mesmo decaimento exponencial de segunda ordem apresentado anteriormente, quando oxigênio é inserido novamente na célula.

A presente tese apresentou uma metodologia diferenciada de investigação das propriedades bioeletroquímicas da bilirrubina oxidase, revelando os resultados inéditos descritos e resultados mais precisos que os publicados até o presente momento, como a dependência de $K_{\rm M}$ com o pH e o potencial. Tal método de investigação pode ser aplicado ao estudo de várias outras enzimas oxidases capazes de transferir elétrons diretamente com a superfície de um eletrodo.

Apêndices

APÊNDICE A. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar da *Mv*BO

A razão principal da realização dos experimentos de UV/Vis foi a determinação das atividades específicas da bilirrubina oxidase, purificada e nãopurificada, frente a oxidação de ABTS. Como a concentração de MvBO no material comercial é desconhecida, mesmo que a embalagem fornecida pelo fabricante indique 2,6 U mg⁻¹ (o que inclui a elevada quantidade de estabilizante), a forma mais confiável de se medir a concentração total de proteína nas amostras é através da determinação do coeficiente de extinção molar da proteína a 280 nm. Para isso, foi usada a sequência de aminoácidos da enzima bilirrubina oxidase no software ProtParam – Expasy Proteomics Server <u>http://www.expasy.ch/tools/protparam.html</u>), o qual gerou um coeficiente de extinção molar no valor de 95230 L mol⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm, além de várias outras informações importantes a respeito da enzima, descritas abaixo:

Sequência de aminoácidos da bilirrubina oxidase de Myrothecium verrucaria:

1 <u>0</u>	2 <u>0</u>	3 <u>0</u>	4 <u>0</u>	5 <u>0</u>	6 <u>0</u>
MFKHTLGAAA	LSLLFNSNAV	QASPVPETSP	ATGHLFKRVA	QISPQYPMFT	VPLPIPPVKQ
70	80	90	100	110	120
PRLTVTNPVN	GQEIWYYEVE	IKPFTHQVYP	DLGSADLVGY	DGMSPGPTFQ	VPRGVETVVR
130	140	150	160	170	180
FINNAEAPNS	V <mark>H</mark> L <mark>H</mark> GSFSRA	AFDGWAEDIT	EPGSFKDYYY	PNRQSARTLW	Y <mark>H</mark> DHAMHITA
100	200	21.0	220	220	240
ENAYRGOAGL	YMLTDPAEDA	LNLPSGYGEF	DIPMILTSKO	23 <u>0</u> YTANGNLVTT	NGELNSFWGD
~~~~			~		
25 <u>0</u>	26 <u>0</u>	27 <u>0</u>	28 <u>0</u>	29 <u>0</u>	30 <u>0</u>
VIHVNGQPWP	FKNVEPRKYR	FRFLDAAVSR	SFGLYFADTD	AIDTRLPFKV	IASDSGLLEH
310	320	330	340	350	360
PADTSLLYIS	MAERYEVVFD	FSDYAGKTIE	$LRNLGGSIG\overline{G}$	IGTDTDYDNT	DKVMRFVVAD
250	200	200	400	41.0	400
		390	40 <u>0</u>	41 <u>0</u>	42 <u>0</u>
DIIQPDISVV	PANLRDVPFP	SPIINIPRQF	RFGRIGPIWI	INGVAFADVQ	NKLLANVPVG
43 <u>0</u>	440	45 <u>0</u>	460	47 <u>0</u>	48 <u>0</u>
TVERWELINA	GNGWT <mark>H</mark> PI <mark>H</mark> I	<mark>H</mark> LVDFKVISR	TSGNNARTVM	PYESGLKDVV	WLGRRETVVV
490	500	510	520	530	540
EAHYAPFPGV	YMF <mark>HCH</mark> NLI <mark>H</mark>	EDHD <mark>M</mark> MAAFN	ATVLPDYGYN	ATVFVDPMEE	LWOARPYELG
55 <u>0</u>	56 <u>0</u>	57 <u>0</u>			
EFQAQSGQFS	VQAVTERIQT	MAEYRPYAAA	DE		

Aminoácidos ligados ao Cu T1 / Aminoácidos ligados aos Cu's T2/T3

## Número de aminácidos: 572 Massa Molecular: 63947,7 Ponto Isoelétrico teórico pI = 5.18

Composição do	s aminoácidos:
Ala (A) 49	8,6%
Arg (R) 29	5,1%
Asn (N) 30	5,2%
Asp (D) 35	6,1%
Cys (C) 1	0,2%
Gln (Q) 20	3,5%
Glu (E) 30	5,2%
Gly (G) 40	7,0%
His (H) 18	3,1%
Ile (I) 23	4,0%
Leu (L) 38	$6,\!6\%$
Lys (K) 13	2,3%
Met (M) 14	2,4%
Phe (F) 32	$5,\!6\%$
Pro (P) 43	7,5%
Ser (S) 30	$5,\!2\%$
Thr (T) 42	7,3%
Trp (W) 10	1,7%
Tyr (Y) 27	4,7%
Val (V) 48	8,4%
Pyl (O) 0	0,0%
Sec (U) 0	0,0%

Número total de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu): 65 Número total de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys): 42

### Composição atômica:

С	2890
Η	4332
Ν	768
0	852
$\mathbf{S}$	15
	C H N O S

Fórmula:  $C_{2890}H_{4332}N_{768}O_{852}S_{15}$ Número total de átomos: 8857

### Coeficientes de extinção molar:

Coeficientes de extinção molar estão em unidades de L $mol^{-1}$  cm⁻¹, a 280 nm medido em água.

 $\epsilon=95230$  – Abs 0,1% (=1 g  $L^{-1})$   $\,$  1,489, assumindo que todos os resíduos de Cisteína aparecem como meia cisteína.

 $\epsilon = 95230$  – Abs 0,1% (=1 g L⁻¹) 1,489, assumindo que nenhum resíduo de Cisteína aparece como meia cisteína.

### Meia-vida estimada:

O resíduo N-terminal da sequência cosiderado foi o M (Met). A estimada meia-vida foi de: 30 horas (*mammalian reticulocytes, in vitro*). 20 horas (levedura, *in vivo*). 10 horas (*Escherichia coli, in vivo*).

### Índice de instabilidade:

O índice de instabilidade (II) foi computado como sendo 36,73. Esse valor classifica a proteína como estável (corroborando os resultados de estabilidade bioquímica mostrados na seção 5.1).

A partir do valor obtido para o coeficiente de extinção molar da enzima, as concentrações de proteína total nas soluções estoque para as amostras purificadas e não-purificadas foram determinadas pela obtenção das curvas de absorção de UV (registradas a 200 nm min⁻¹) para diferentes alíquotas de enzima adicionadas à cubeta. A concentração de cada amostra foi obtida pela divisão da absorção a 280 nm por 95230 L mol⁻¹ cm⁻¹. Considerando cada diluição empregada durante as medições, foi possível determinar a concentração de cada uma das soluções estoque.

O equipamento usado em todos os experimentos de espectroscopia de absorção eletrônica da região de UV/Vis foi um JASCO V-630 Spectrophotometer.

# APÊNDICE B. Voltametria cíclica para o acoplamento de Diazônio dos modificadores investigados

A descrição completa da metodologia de modificação da superfície do eletrodo de grafite com as moléculas orgânicas estudadas se encontra em detalhes na seção 4.5. O presente apêndice destina-se apenas a mostrar o perfil voltamétrico de cada uma das moléculas estudadas como modificadores da superfície de grafite para adsorção das moléculas de enzima. A reação do composto orgânico com NaNO₂ converte a função  $-NH_2$  em  $-N_2$ , que é eliminado na forma de gás nitrogênio quando o sal de diazônio resultante é reduzido eletroquimicamente sobre o grafite, formando ligação covalente entre a superfície e o átomo de carbono ao qual se ligava a função  $-N_2$ .








#### APÊNDICE C. Derivação da equação de probabilidade para ko

Para o desenvolvimento da equação (8), foi denotado  $F_{k_0}(t)$  como sendo a função de distribuição cumulativa de  $k_0$ , ou seja, a probabilidade  $P(k_0 < t)$  que  $k_0$  assume um valor menor que t, e  $f_{k_0}(t)$  é a função densidade de  $k_0$  (sendo escrito no texto principal como  $p(k_0)$ ). As duas funções estão relacionadas entre si pela equação  $F_{k_0}(t) = \int_0^t f_{k_0}(u) du$ .

$$F_{k_0}(t) = P(k_0^{(d=0)} \exp(-\beta d) < t)$$
(A1)

$$F_{k_0}(t) = 1 - P\left(d < -\frac{1}{\beta} \ln \frac{t}{k_0^{(d=0)}}\right)$$
(A2)

$$F_{k_0}(t) = 1 - F_d\left(-\frac{1}{\beta}\ln\frac{t}{k_0^{(d=0)}}\right)$$
(A3)

Derivando a equação (A3) com relação a t encontra-se:

$$f_{k_0}(t) = \frac{1}{\beta t} f_d \left( -\frac{1}{\beta} \ln \frac{t}{k_0^{(d=0)}} \right)$$
(A4)

Sendo  $f_d\left(-\frac{1}{\beta}\ln\frac{t}{k_0^{(d=0)}}\right) = \begin{cases} 1/d_0 & \text{para } d \in [d_{\min}, d_{\max}]\\ 0 & \text{para qualquer outro valor} \end{cases}$  (A5)

e  $d_{\text{max}} = d_{\text{min}} + d_0$ , obtém-se a equação (8), com  $k_0^{\text{min}} = k_0^{\text{max}} \exp(-\beta d_0)$ :

$$f_{k_0}(t) = \begin{cases} 1/\beta d_0 t \text{ para } t \in \left[k_0^{\min}, k_0^{\max}\right] \\ 0 \text{ para qualquer outro valor} \end{cases}$$
(A6)

# APÊNDICE D. Desenvolvimento da corrente catalítica de redução de O₂

Para obter uma equação representativa do formato das curvas de redução de O₂ como função de um único potencial de redução ( $E_{O/R}$ ), da freqüência de turnover da enzima,  $k_{cat}$ , e da constante de transferência interfacial de elétrons em sobrepotencial zero,  $k_0$ , a corrente expressa pela da equação (5) deve ser integrada através da distribuição dos possíveis valores de  $k_0$ , dentro do intervalo

 $\begin{bmatrix} k_0^{\min}, k_0^{\max} \end{bmatrix} \quad (\text{equação} \quad (8)), \quad \text{pela integral} \quad i^* = \int_{k_0^{\min}}^{k_0^{\max}} i(k_0) p(k_0) dk_0, \quad \text{com}$  $k_0^{\min} = k_0^{\max} \exp(-\beta d_0) \text{ e usando a notação reduzida } e_{O/R} = \exp\left[\frac{F}{RT} \left(E - E_{O/R}\right)\right], \text{ ou seja,}$ 

$$\frac{i^{*}}{i_{\lim}} = \int_{k_{0}^{\min}}^{k_{0}^{\max}} \frac{1}{1 + e_{O/R} + \frac{k_{cat}}{u} \left( e_{O/R}^{1/2} \right)} \cdot \frac{1}{\beta d_{0} u} \cdot du$$
(A7)

Mudando as variáveis, tem-se que

$$v^{red} = \frac{k_{cat}}{u} (e_{O/R}^{1/2}) \ \mathbf{e} \ dv^{red} = -\frac{k_{cat}}{u^2} (e_{O/R}^{1/2}) \Longrightarrow \frac{1}{u} du = -\frac{1}{v^{red}} dv^{red}$$
(A8)

e que a equação (A7) assume a forma

$$\frac{i^{*}}{i_{\rm lim}} = -\frac{1}{\beta d_0} \int_{v_1^{red}}^{v_2^{red}} \frac{1}{a^{red} + v^{red}} \cdot \frac{1}{v^{red}} \cdot dv^{red}$$
(A9)

sendo  $a^{red} = 1 + e_{O/R}$ ,  $v_2^{red} = \frac{k_{cat}}{k_0^{max}} (e_{O/R}^{1/2})$  e  $v_1^{red} = v_2^{red} \exp(-\beta d_0)$ .

Usando 
$$\int \frac{1}{(a+v)} \frac{1}{v} dv = \frac{1}{a} [\ln(v) - \ln(a+v)]$$
 na equação (A9), tem-se que

$$\frac{i^{*}}{i_{\lim}} = \frac{1}{\beta d_{0}} \frac{1}{a^{red}} \Big[ -\ln v^{red} + \ln \left( a^{red} + v^{red} \right) \Big]_{v_{2}^{red} \exp(\beta d_{0})}^{v_{2}^{red}} \Big]$$

$$= \frac{1}{\beta d_{0}} \frac{1}{a^{red}} \Big\{ -\ln v_{2}^{red} + \ln v_{2}^{red} \exp(\beta d_{0}) + \ln \left( a^{red} + v_{2}^{red} \right) - \ln \left[ a^{red} + v_{2}^{red} \exp(\beta d_{0}) \right] \Big\}$$

$$= \frac{1}{\beta d_{0}} \frac{1}{a^{red}} \Big[ \beta d_{0} + \ln \left( \frac{a^{red} + v_{2}^{red}}{a^{red} + v_{2}^{red} \exp(\beta d_{0})} \right) \Big]$$
(A10)

Substituindo na equação (A10) os valores de  $a^{red} = 1 + e_{O/R}$  e  $v_2^{red} = \frac{k_{cat}}{k_0^{max}} (e_{O/R}^{1/2})$ ,

tem-se a equação da corrente catalítica de redução corrigida pelo efeito de dispersão de taxas de transferência de elétrons entre as moléculas de MvBO e a superfície do eletrodo:

$$i^{*} = \frac{i_{\lim}}{1 + e_{O/R}} \left[ 1 + \frac{1}{\beta d_{0}} \ln \left( \frac{1 + e_{O/R} + \frac{k_{cat}}{k_{0}^{\max}} e_{O/R}^{1/2}}{1 + e_{O/R} + \frac{k_{cat}}{k_{0}^{\max}} e_{O/R}^{1/2}} \exp(\beta d_{0})} \right) \right]$$
(10)

lembrando que  $e_{O/R} = \exp\left[\frac{F}{RT}(E - E_{O/R})\right]$  e  $i_{\text{lim}} = -4FA\Gamma k_{cat}$ .

### APÊNDICE E. Descrição do ajuste dos mínimos quadrados não-linear aplicado aos dados de corrente $vs p(O_2)$

Embora os dados estejam apresentados na forma de duplo-recíproco (gráficos de Lineweaver-Burk, seção 5.3), o ajuste aos dados foi feito pelo método dos mínimos quadrados não-linear em que a variável minimizada,  $\chi^2$ , foi estabelecida a partir dos erros relativos nas concentrações dos gases (equação (A11)). A equação de Michaelis-Menten foi resolvida para o ajuste da concentração de substrato (O₂) às correntes obtidas (equação (A12)), assumindo que as incertezas experimentais nas concentrações dos gases eram maiores que as incertezas relacionadas às medições das correntes. Para os erros relativos nas concentrações do substrato e no balanço entre os gases (O2 e Ar) foram consideradas as incertezas fornecidas pelo fabricante dos controladores de fluxo de gás (1% da escala total, sendo 10 sccm e 25 sccm – dois controladores foram usados) (equação (A13)). Embora o rearranjo na equação (A12) inverta as variáveis dependente e independente, no intuito de permitir que as incertezas nas concentrações dos gases se ajustem à minimização dos resíduos, estas variáveis permanecem independentes entre si. Esse método proposto contrasta com as análises empregando os métodos de Hanes-Woolf (S/v vs S) e Eadie-Hofstee (v vs v/S), em que a ordenada ou a abscissa dos respectivos gráficos são uma razão entre essas duas variáveis (dependente e independente).

$$\chi^{2} = \sum \left( \frac{S_{\text{fit}} - S_{\text{exp}}}{\left( \sigma_{s} / S_{\text{exp}} \right)} \right)^{2}$$
(A11)

$$S = \frac{\nu K_{\rm M}}{V_{\rm max} - \nu} \tag{A12}$$

$$\left(\frac{\sigma_{s}}{S_{exp}}\right) = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{s}}{S_{exp}}\right)^{2} + \left(\frac{\sqrt{\sigma_{s} + \sigma_{x}}}{S + X}\right)^{2}}$$
(A13)

sendo S e X as concentrações do substrato e o balanço entre os gases, respectivamente (no caso,  $[O_2]$  e [Ar], ambos proporcionais aos fluxos relativos; a diferença nas constantes de Henry para cada gás é menor que 10%);  $\nu e V_{\text{max}}$  são as taxas reacionais medida e máxima (extrapolada), respectivamente (ambas proporcionais à corrente),  $\sigma$  é o erro absoluto na medida da concentração e  $\chi^2$  é o parâmetro de minimização. Os valores de S, X e  $\sigma_S$  para os experimentos estão mostrados na Tabela 6.

## APÊNDICE F. Derivação da Equação de Michaelis-Menten dependente do potencial

A equação de Michaelis-Menten para estudos clássicos de cinética enzimática surge do desenvolvimento das equações de velocidade, no estado estacionário, para uma reação do tipo ²⁴⁴

$$E + S \xleftarrow{k_1 \ k_2} ES \xrightarrow{k_2}$$
 produtos, em que  $\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt} = 0$ .

As equações de velocidade de para a reação podem ser escritas por:

$$\frac{d[\mathrm{ES}]}{d\mathrm{t}} = k_1[\mathrm{E}]_{\mathrm{L}}[\mathrm{S}] \quad \mathrm{e} \quad -\frac{d[\mathrm{ES}]}{d\mathrm{t}} = (k_{-1} + k_2)[\mathrm{ES}],$$

sendo  $[E]_L$  a concentração de enzima livre em solução, não presente na forma de complexo enzima-substrato (ES), e sendo a concentração total de enzima igual à soma das duas formas de enzima em solução, *i.e.*  $[E] = [E]_L + [ES]$ .

Pela condição de estado estacionário, tem-se que as velocidades de formação e consumo do complexo ES são iguais  $(k_1[E]_L[S]=(k_{-1}+k_2)[ES])$  e, dessa forma, obtém-se a relação:

$$[ES] = \frac{[E]_{L}[S]k_{1}}{(k_{-1} + k_{2})} = \frac{[E]_{L}[S]}{\left(\frac{k_{-1} + k_{2}}{k_{1}}\right)} = \frac{[E]_{L}[S]}{K_{M}}$$
(A14)

Usando a relação  $[E] = [E]_L + [ES]$  na equação (A14), tem-se que

$$[ES] = \frac{([E] - [ES])[S]}{K_{M}} = \frac{[E][S]}{K_{M} + [S]}$$
(A15)

Inserindo à equação (A15) a relação matemática que descreve a taxa de formação de produto  $(v = k_2 [ES])$ , obtém-se a equação geral de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{k_2[\mathbf{E}][\mathbf{S}]}{K_{\mathrm{M}} + [\mathbf{S}]} \tag{A16}$$

Para o caso da reação de redução eletroquímica de oxigênio, catalisada pela enzima bilirrubina oxidase imobilizada sobre a superfície de um eletrodo, com a qual transfere elétrons a taxas dependentes do potencial aplicado ao eletrodo, a reação química é descrita pelo modelo

$$\mathbf{E} + \mathbf{S} \xrightarrow{k_1}_{k_{-1}} \mathbf{ES} \xrightarrow{k_2} \text{ produtos}$$



Substituindo [S] por  $[O_2]$  na equação (A16) e aplicando a relação de dependência de  $k_2$  com as demais constantes catalíticas  $k_{et}^{(E)}$  (taxa de transferência interfacial de elétrons) e  $k_{cat}$  (frequência de turnover inerente ao sítio ativo da enzima – puramente bioquímica), descrita na sessão 5.3,

$$\frac{1}{k_2} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{1}{k_{et}^{(E)}} \Longrightarrow k_2 = \frac{k_{cat}k_{et}^{(E)}}{k_{cat} + k_{et}^{(E)}}$$

obtém-se a apropriada relação matemática do modelo de Michaelis-Menten para a dependência das constantes cinéticas (e, portanto, da corrente) com o potencial aplicado ao eletrodo:

$$\upsilon = \frac{k_2[\mathbf{E}][\mathbf{O}_2]}{K_{\mathrm{M}} + [\mathbf{O}_2]} \Longrightarrow \frac{\upsilon}{[\mathbf{E}]} = \frac{k_2 k_1[\mathbf{O}_2]}{(k_{-1} + k_2) + k_1[\mathbf{O}_2]} \Longrightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{\upsilon}{[\mathrm{E}]} = \frac{\frac{k_{cat}k_{et}^{(E)}}{k_{cat} + k_{et}^{(E)}}k_1[\mathrm{O}_2]}{\left(k_{-1} + \frac{k_{cat}k_{et}^{(E)}}{k_{cat} + k_{et}^{(E)}}\right) + k_1[\mathrm{O}_2]} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{\upsilon}{[\mathrm{E}]} = \frac{k_{cat}k_{et}^{(E)}k_1[\mathrm{O}_2]}{k_{-1}(k_{cat}+k_{et}^{(E)})+k_{cat}k_{et}^{(E)}+k_1[\mathrm{O}_2](k_{cat}+k_{et}^{(E)})} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{\upsilon}{[\mathrm{E}]} = \frac{i}{nFA\Gamma} = \frac{k_{cat}k_{et}^{(E)}k_1[\mathrm{O}_2]}{\left(k_{-1} + k_1[\mathrm{O}_2]\right)\left(k_{cat} + k_{et}^{(E)}\right) + k_{cat}k_{et}^{(E)}}$$
(A17)

sendo n o número de elétrons transferidos durante cada ciclo catalítico (=4), F a constante de Faraday, A a área superficial do eletrodo e  $\Gamma$  o recobrimento eletroativo de enzima.

A equação (A17) descreve a dependência matemática entre corrente e potencial envolvendo as constantes cinéticas da reação de redução eletroquímica de oxigênio catalisada pela enzima bilirrubina oxidase, imobilizada sobre a superfície de um eletrodo.

### **Referências Bibliográficas**

1. GONZALEZ, E. R. Electrocatalysis and environmental pollution. **Quimica Nova**, v. 23, n. 2, p. 262-266, 2000.

2. TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. Células a Combustível: uma alternativa promissora para a geração de eletricidade. **Química Nova**, v. 12, n. 3, p. 168, 1989.

3. KORDESCH, K., SIMADER, G. Fuel cells and their applications, Weinheim: VCH, 1996, 1 v.

4. GANG, X.; QINGFENG, L.; AAGE, H.; N., D. Hydrogen oxidation on gas diffusion electrodes for phosphoric acid fuel cells in the presence of carbon monoxide and oxygen. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 142, n. 9, p. 2890-2893, 1995.

5. KATZ, E.; SHIPWAY, A. N.; WILLNER, I. Biochemical fuel cells. Ed. 1, **Handbook of Fuel Cells:** Fundamentals, Technology and Applications, Vol. 1, New York: John Wiley, 2003, p. 1-27.

6. GOTOH, Y.; KONDO, Y.; KAJI, H.; TAKEDA, A.; SAMEJIMA, T. Characterization of copper atoms in bilirubin oxidase by spectroscopic analyses. **Journal of Biochemistry**, v. 106, n. 4, p. 621-626, 1989.

7. KOIKEDA, S.; ANDO, K.; KAJI, H.; INOUE, T.; MURAO, S.; TAKEUCHI, K.; SAMEJIMA, T. Molecular-cloning of the gene for bilirubin oxidase from Myrothecium-verrucaria and its expression in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 25, p. 18801-18809, 1993.

8. HOLMES, C. F. Electrochemical power sources and the treatment of human illness. **The Electrochemical Society Interface**, v. 12, n. 3, p. 26-29, 2003.

9. DRAKE, R. F.; KUSSEROW, B. K.; MESSINGE.S; MATSUDA, S. A Tissue implantable fuel cell power supply. **Transactions American Society for Artificial Internal Organs**, v. 16, p. 199-205, 1970.

10. DAVIS, G.; HILL, H. A. O.; ASTON, W. J.; HIGGINS, I. J.; TURNER, A. P. F. Bioelectrochemical fuel-cell and sensor based on a quinoprotein, alcohol-dehydrogenase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 5, p. 383-388, 1983.

11. PATOLSKY, F.; TAO, G. L.; KATZ, E.; WILLNER, I. C-60-mediated bioelectrocatalyzed oxidation of glucose with glucose oxidase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 454, n. 1-2, p. 9-13, 1998.

12. BLONDER, R.; WILLNER, I.; BUCKMANN, A. F. Reconstitution of apo-glucose oxidase on nitrospiropyran and FAD mixed monolayers on gold electrodes: Photostimulation of bioelectrocatalytic features of the biocatalyst. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 36, p. 9335-9341, 1998.

13. WILLNER, I.; ARAD, G.; KATZ, E. A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-1 monolayer-functionalized electrodes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 44, n. 2, p. 209-214, 1998.

14. WILLNER, I.; HELEG-SHABTAI, V.; KATZ, E.; RAU, H. K.; HAEHNEL, W. Integration of a reconstituted de novo synthesized hemoprotein and native metalloproteins with electrode supports for bioelectronic and bioelectrocatalytic applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 27, p. 6455-6468, 1999.

15. WILKINSON, S. "Gastrobots" - Benefits and challenges of microbial fuel cells in food powered robot applications. **Autonomous Robots**, v. 9, n. 2, p. 99-111, 2000.

16. BARTON, S. C.; GALLAWAY, J.; ATANASSOV, P. Enzymatic biofuel cells for Implantable and microscale devices. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 10, p. 4867-4886, 2004.

17. PALMORE, G. T. R.; WHITESIDES, G. M. Microbial and enzymatic biofuel cells. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**, v. 566, p. 271-290, 1994.

18. TANISHO, S.; KAMIYA, N.; WAKAO, N. Microbial fuel cell using Enterobacter aerogenes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics** v. 21, n. 1, p. 25-32, 1989.

19. ARDELEANU, I.; MARGINEANU, D. G.; VAIS, H. Electrochemical conversion in biofuel cells using clostridium-butyricum or staphylococcus-aureus-oxford. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 11, n. 4-6, p. 273-277, 1983.

20. KIM, N.; CHOI, Y.; JUNG, S.; KIM, S. Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing Proteus vulgaris. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 1, p. 109-114, 2000.

21. PARK, D. H.; KIM, S. K.; SHIN, I. H.; JEONG, Y. J. Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with Neutral Red. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 16, p. 1301-1304, 2000.

22. ALLEN, M. J. The electrochemical aspects of some biochemical systems—IX. The anomalous behaviour of E. coli with mixed substrates. **Electrochimica Acta**, v. 11, n. 10, p. 1503-1508, 1966.

23. DAVIS, J. B.; YARBROUGH, H. F. Preliminary experiments on a microbial fuel cell. **Science**, v. 137, n. 3530, p. 615-616, 1962.

24. DELANEY, G. M.; BENNETTO, H. P.; MASON, J. R.; ROLLER, S. D.; STIRLING, J. L.; THURSTON, C. F. Electron-transfer coupling in microbial fuel-cells .2. Performance of fuel-cells containing selected microorganism mediator substrate combinations. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology B-Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 13-27, 1984.

25. THURSTON, C. F.; BENNETTO, H. P.; DELANEY, G. M.; MASON, J. R.; ROLLER, S. D.; STIRLING, J. L. Glucose-Metabolism in a microbial fuel-cell - stoichiometry of product formation in a thionine-mediated proteus-vulgaris fuel-cell and its relation to coulombic yields. **Journal of General Microbiology**, v. 131, n. 6, p. 1393-1401, 1985.

26. BENNETTO, H. P.; DELANEY, G. M.; MASON, J. R.; ROLLER, S. D.; STIRLING, J. L.; THURSTON, C. F. The Sucrose Fuel-Cell - Efficient biomass conversion using a microbial catalyst. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 10, p. 699-704, 1985.

27. LITHGOW, A. M.; ROMERO, L.; SANCHEZ, I. C.; SOUTO, F. A.; VEGA, C. A. Interception of the electron-transport chain in bacteria with hydrophilic redox mediators .1. Selective improvement of the performance of biofuel cells with 2,6-disulfonated thionine as mediator. **Journal of Chemical Research-S**, v. 5, p. 178-179, 1986.

28. VEGA, C. A.; FERNANDEZ, I. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuelcells with lactobacillus-plantarum, streptococcus-lactis, and erwinia dissolvens. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 17, n. 2, p. 217-222, 1987.

29. PARK, D. H.; KIM, B. H.; MOORE, B.; HILL, H. A. O.; SONG, M. K.; RHEE, H. W. Electrode reaction of Desulfovibrio desulfuricans modified with organic conductive compounds. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 3, p. 145-148, 1997.

30. PARK, D. H.; ZEIKUS, J. G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1292-1297, 2000.

31. ASTON, W. J.; TURNER, A. P. F. Biosensors and biofuel cells. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 1, p. 89-120, 1984.

32. YAHIRO, A. T.; LEE, S. M.; KIMBLE, D. O. Bioelectrochemistry .I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 88, n. 2, p. 375-383, 1964.

33. ARMSTRONG, F. A.; HILL, H. A. O.; WALTON, N. J. Reactions of electron-transfer proteins at electrodes. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 18, n. 3, p. 261-322, 1985.

34. WILLNER, I.; KATZ, E. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 39, n. 7, p. 1180-1218, 2000.

35. PARDO-YISSAR, V.; KATZ, E.; WILLNER, I.; KOTLYAR, A. B.; SANDERS, C.; LILL, H. Biomaterial engineered electrodes for bioelectronics. **Faraday Discussions**, v. 116, p. 119-134, 2000.

36. KANO, K.; IKEDA, T. Fundamentals and practices of mediated bioelectrocatalysis. **Analytical Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1013-1021, 2000.

37. KAGANER, E.; JOSELEVICH, E.; WILLNER, I.; CHEN, Z. P.; GUNTER, M. J.; GAYNESS, T. P.; JOHNSON, M. R. Photoinduced electron transfer in pi-donor-capped Zn(II) porphyrins and N,N '-dimethyl-4,4 '-bipyridinium supramolecular assemblies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 7, p. 1159-1165, 1998.

38. LAHAV, M.; KATZ, E.; WILLNER, I. A covalently linked quinone-ferrocene monolayerelectrode: A pH sensor with an internal reference. **Electroanalysis**, v. 10, n. 17, p. 1159-1162, 1998.

39. HILL, H. A. O. Bio-Electrochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 743-748, 1987.

40. NAKAMURA, K. A., M.; MIYAWAKI, O. Electro-enzymology, Coenzyme Regeneration, Berlin: Springer-Verlag, 1988, 1 v.

41. GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. **Electroanalysis**, v. 9, n. 9, p. 661-674, 1997.

42. SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2605, 1996.

43. GUPTA, G.; RAJENDRAN, V.; ATANASSOV, P. Bioelectrocatalysis of oxygen reduction reaction by laccase on gold electrodes. **Electroanalysis**, v. 16, n. 13-14, p. 1182-1185, 2004.

44. 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, n. 1, p. 155-161, 1998.

45. PIZZARIELLO, A.; STRED'ANSKY, M.; MIERTUS, S. A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix. **Bioelectrochemistry**, v. 56, n. 1-2, p. 99-105, 2002.

46. BARTLETT, P. N.; PRATT, K. F. E. Theoretical treatment of diffusion and kinetics in amperometric immobilized enzyme electrodes .1. Redox mediator entrapped within the film. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 397, n. 1-2, p. 61-78, 1995.

47. MANO, N.; MAO, F.; HELLER, A. Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 21, p. 6588-6594, 2003.

48. HABERMULLER, L.; MOSBACH, M.; SCHUHMANN, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 6-7, p. 560-568, 2000.

49. PALMISANO, F.; ZAMBONIN, P. G.; CENTONZE, D. Amperometric biosensors based on electrosynthesised polymeric films. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 6-7, p. 586-601, 2000.

50. TSUJIMURA, S.; TATSUMI, B.; OGAWA, J.; SHIMIZU, S.; KANO, K.; IKEDA, T. Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2 '-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 496, n. 1-2, p. 69-75, 2001.

51. 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, n. 1, p. 110-117, 1999.

52. SCOTT, S. L.; CHEN, W. J.; BAKAC, A.; ESPENSON, J. H. Spectroscopic parameters, electrode-potentials, acid ionization-constants, and electron-exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 25, p. 6710-6714, 1993.

53. BARTON, S. C.; KIM, H. H.; BINYAMIN, G.; ZHANG, Y. C.; HELLER, A. Electroreduction of O₂ to water on the "Wired" laccase cathode. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 47, p. 11917-11921, 2001.

54. BARTON, S. C.; PICKARD, M.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; HELLER, A. Electroreduction of O₂ to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the 'wired' Pleurotus ostreatus laccase cathode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 11-12, p. 1071-1074, 2002.

55. MANO, N.; KIM, H. H.; ZHANG, Y. C.; HELLER, A. An oxygen cathode operating in a physiological solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 22, p. 6480-6486, 2002.

56. KIM, H. H.; MANO, N.; ZHANG, X. C.; HELLER, A. A miniature membrane-less biofuel cell operating under physiological conditions at 0.5 V. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 150, n. 2, p. A209-A213, 2003.

57. MANO, N.; HELLER, A. A miniature membraneless biofuel cell operating at 0.36 V under physiological conditions. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 150, n. 8, p. A1136-A1138, 2003.

58. CHEN, T.; BARTON, S. C.; BINYAMIN, G.; GAO, Z. Q.; ZHANG, Y. C.; KIM, H. H.; HELLER, A. A miniature biofuel cell. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 35, p. 8630-8631, 2001.

59. DELUMLEYWOODYEAR, T.; ROCCA, P.; LINDSAY, J.; DROR, Y.; FREEMAN, A.; HELLER, A. A. Polyacrylamide-based redox polymer for connecting redox centers of enzymes to electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 1332-1338, 1995.

60. KENAUSIS, G.; TAYLOR, C.; KATAKIS, I.; HELLER, A. 'Wiring' of glucose oxidase and lactate oxidase within a hydrogel made with poly(vinyl pyridine) complexed with [Os(4,4'-dimehtoxy-2,2'-bipyridine)(2)Cl](+/2+). Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, v. 92, n. 20, p. 4131-4136, 1996.

61. MAO, F.; MANO, N.; HELLER, A. Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "wiring" hydrogels. Journal of the American Chemical Society, v. 125, n. 16, p. 4951-4957, 2003.

62. MANO, N.; MAO, F.; HELLER, A. A miniature biofuel cell operating in a physiological buffer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 44, p. 12962-12963, 2002.

63. SCHUHMANN, W.; OHARA, T. J.; SCHMIDT, H. L.; HELLER, A. Electron-transfer between glucose-oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 4, p. 1394-1397, 1991.

64. DEGANI, Y.; HELLER, A. Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal-electrodes .2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose-oxidase and d-amino-acid oxidase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 8, p. 2615-2620, 1988.

65. WILLNER, I.; KATZ, E.; RIKLIN, A.; KASHER, R. Mediated electron-transfer in glutathione-reductase organized in self-assembled monolayers on Au electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10965-10966, 1992.

66. WILLNER, I.; LAPIDOT, N.; RIKLIN, A.; KASHER, R.; ZAHAVY, E.; KATZ, E. Electrontransfer communication in glutathione-reductase assemblies - electrocatalytic, photocatalytic, and catalytic-systems for the reduction of oxidized glutathione. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 4, p. 1428-1441, 1994.

67. OHARA, T. J.; RAJAGOPALAN, R.; HELLER, A. Glucose electrodes based on cross-linked [Os(bpy)(2)](+/2+) complexed poly(l-vinylimidazole) films. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 23, p. 3512-3517, 1993.

68. OHARA, T. J.; RAJAGOPALAN, R.; HELLER, A. Wired Enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 15, p. 2451-2457, 1994.

69. GREGG, B. A.; HELLER, A. Cross-linked redox gels containing glucose-oxidase for amperometric biosensor applications. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 258-263, 1990.

70. WILLNER, I.; HELEG-SHABTAI, V.; BLONDER, R.; KATZ, E.; TAO, G. L.; BUCKMANN, A. F.; HELLER, A. Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 42, p. 10321-10322, 1996.

71. KATZ, E.; SCHLERETH, D. D.; SCHMIDT, H. L. Electrochemical study of pyrroloquinoline quinone covalently immobilized as a monolayer onto a cystamine-modified gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 367, n. 1-2, p. 59-70, 1994.

72. BARDEA, A.; KATZ, E.; BUCKMANN, A. F.; WILLNER, I. NAD(+)-dependent enzyme electrodes: Electrical contact of cofactor-dependent enzymes and electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 39, p. 9114-9119, 1997.

73. BEREZIN, I. V.; BOGDANOVSKAYA, V. A.; VARFOLOMEEV, S. D.; TARASEVICH, M. R.; YAROPOLOV, A. I. Bioelectrocatalysis. Equilibrium oxygen potential in the presence of laccase. **Dokl. Akad. Nauk SSSR**, v. 240, n. 3, p. 615-18, 1978.

74. KAMITAKA, Y.; TSUJIMURA, S.; IKEDA, T.; KANO, K. Electrochemical quartz crystal microbalance study of direct bioelectrocatalytic reduction of bilirubin oxidase. **Electrochemistry**, v. 74, n. 8, p. 642-644, 2006.

75. KAMITAKA, Y.; TSUJIMURA, S.; KATAOKA, K.; SAKURAI, T.; IKEDA, T.; KANO, K. Effects of axial ligand mutation of the type I copper site in bilirubin oxidase on direct electron transfer-type bioelectrocatalytic reduction of dioxygen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 601, n. 1-2, p. 119-124, 2007.

76. RAMIREZ, P.; MANO, N.; ANDREU, R.; RUZGAS, T.; HELLER, A.; GORTON, L.; SHLEEV, S. Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1777, n. 10, p. 1364-1369, 2008.

77. SHLEEV, S.; EL KASMI, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 9, p. 934-939, 2004.

78. SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROPOLOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 1, p. 115-124, 2005.

79. SHLEEV, S.; TKAC, J.; CHRISTENSON, A.; RUZGAS, T.; YAROPOLOV, A. I.; WHITTAKER, J. W.; GORTON, L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2517-2554, 2005.

80. SHLEEV, S.; CHRISTENSON, A.; SEREZHENKOV, V.; BURBAEV, D.; YAROPOLOV, A.; GORTON, L.; RUZGAS, T. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native Trametes hirsuta laccase at gold electrode. **Biochemical Journal**, v. 385, p. 745-754, 2005.

81. SHLEEV, S.; RUZGAS, T. Transistor-like behavior of a fungal laccase. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 38, p. 7270-7274, 2008.

82. THUESEN, M. H.; FARVER, O.; REINHAMMAR, B.; ULSTRUP, J. Cyclic voltammetry and electrocatalysis of the blue copper oxidase Polyporus versicolor laccase. Acta Chemica Scandinavica, v. 52, n. 5, p. 555-562, 1998.

83. TSUJIMURA, S.; NAKAGAWA, T.; KANO, K.; IKEDA, T. Kinetic study of direct bioelectrocatalysis of dioxygen reduction with bilirubin oxidase at carbon electrodes. **Electrochemistry**, v. 72, n. 6, p. 437-439, 2004.

84. TSUJIMURA, S.; KAMITAKA, Y.; KANO, K. Diffusion-controlled oxygen reduction on multicopper oxidase-adsorbed carbon aerogel electrodes without mediator. **Fuel Cells**, v. 7, n. 6, p. 463-469, 2007.

85. WEIGEL, M. C.; TRITSCHER, E.; LISDAT, F. Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 4, p. 689-693, 2007.

86. YAROPOLOV, A. I.; KHARYBIN, A. N.; EMNÉUS, J.; MARKO-VARGA, G.; GORTON, L. Electrochemical properties of some copper-containing oxidases. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 40, n. 1, p. 49-57, 1996.

87. ZHENG, W.; LI, Q. F.; SU, L.; YAN, Y. M.; ZHANG, J.; MAO, L. Q. Direct electrochemistry of multi-copper oxidases at carbon nanotubes noncovalently functionalized with cellulose derivatives. **Electroanalysis**, v. 18, n. 6, p. 587-594, 2006.

88. RAMÍREZ, P.; MANO, N.; ANDREU, R.; RUZGAS, T.; HELLER, A.; GORTON, L.; SHLEEV, S. Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1777, n. 10, p. 1364-1369, 2008.

89. ZHENG, W.; LI, Q.; SU, L.; YAN, Y.; ZHANG, J.; MAO, L. Direct electrochemistry of multicopper oxidases at carbon nanotubes noncovalently functionalized with cellulose derivatives. **Electroanalysis**, v. 18, n. 6, p. 587-594, 2006.

90. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods:** Fundamentals and aplications. Ed. 2, New York: John Wiley, 2001, 1 v.

91. HEERING, H. A.; MONDAL, M. S.; ARMSTRONG, F. A. Using the pulsed nature of staircase cyclic voltammetry to determine interfacial electron-transfer rates of adsorbed species. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 174-182, 1999.

92. XU, F.; SHIN, W. S.; BROWN, S. H.; WAHLEITHNER, J. A.; SUNDARAM, U. M.; SOLOMON, E. I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 2, p. 303-311, 1996.

93. HIROMI, K.; YAMAGUCHI, Y.; SUGIURA, Y.; IWAMOTO, H.; HIROSE, J. Bilirubin oxidase from trachyderma-tsunodae K-2593, a multicopper enzyme. **Bioscience Biotechnology** and **Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1349-1350, 1992.

94. MURAO, S.; TANAKA, N. A New enzyme bilirubin oxidase produced by myrotheciumverrucaria Mt-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 2383-2384, 1981.

95. HUANG, K. X.; FUJII, I.; EBIZUKA, Y.; GOMI, K.; SANKAWA, U. Molecular-cloning and heterologous expression of the gene encoding dihydrogeodin oxidase, a multicopper blue enzyme from aspergillus-terreus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21495-21502, 1995.

96. ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.

97. NORDLOV, H.; GATENBECK, S. Enzymatic-synthesis of (+)-bisdechlorogeodin and (-)-bisdechlorogeodin with sulochrin oxidase from penicillium-frequentans and oospora-sulphurea-ochracea. **Archives of Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 208-211, 1982.

98. ROBERTS, S. A.; WEICHSEL, A.; GRASS, G.; THAKALI, K.; HAZZARD, J. T.; TOLLIN, G.; RENSING, C.; MONTFORT, W. R. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2766-2771, 2002.

99. GRASS, G.; RENSING, C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in Escherichia coli. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 5, p. 902-908, 2001.

100. LONTIE, R. Copper Proteins and Copper Enzymes. Boca Raton: CRC Press, 1984, v. 3.

101. MALKIN, R.; MALMSTRO.BG; VANNGARD, T. Spectroscopic differentiation of electronaccepting sites in fungal laccase - association of a near ultraviolet band with a 2 electronaccepting unit. **European Journal of Biochemistry**, v. 10, n. 2, p. 324, 1969.

102. MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin - modeling and structural relationships. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 341-352, 1990.

103. ORTEL, T. L.; TAKAHASHI, N.; PUTNAM, F. W. Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic hydrophobic character, and secondary structure of domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 81, n. 15, p. 4761-4765, 1984.

104. BLANFORD, C. F.; FOSTER, C. E.; HEATH, R. S.; ARMSTRONG, F. A. Efficient electrocatalytic oxygen reduction by the 'blue' copper oxidase, laccase, directly attached to chemically modified carbons. **Faraday Discussions**, v. 140, p. 319-335, 2009.

105. BLANFORD, C. F.; HEATH, R. S.; ARMSTRONG, F. A. A stable electrode for highpotential, electrocatalytic O-2 reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface. **Chemical Communications**, v. 17, p. 1710-1712, 2007.

106. ALLONGUE, P.; DELAMAR, M.; DESBAT, B.; FAGEBAUME, O.; HITMI, R.; PINSON, J.; SAVEANT, J. M. Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 1, p. 201-207, 1997.

107. DELAMAR, M.; DESARMOT, G.; FAGEBAUME, O.; HITMI, R.; PINSON, J.; SAVEANT, J. M. Modification of carbon fiber surfaces by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: Application to carbon epoxy composites. **Carbon**, v. 35, n. 6, p. 801-807, 1997.

108. LU, X. K.; YU, M. F.; HUANG, H.; RUOFF, R. S. Tailoring graphite with the goal of achieving single sheets. **Nanotechnology**, v. 10, n. 3, p. 269-272, 1999.

109. URE, T. A. M.; BUTLER, L. R. P.; LVOV, B. V.; RUBESKA, I.; STURGEON, R. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis .12. terms related to electrothermal atomization. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 253-259, 1992.

110. CHALMERS, G. Handbook of vibrational spectroscopy. New York: Wiley, 2002, v. 3.

111. BOEHM, H. P. Some aspects of the surface-chemistry of carbon-blacks and other carbons. **Carbon**, v. 32, n. 5, p. 759-769, 1994.

112. BANKS, C. E.; COMPTON, R. G. Edge plane pyrolytic graphite electrodes in electroanalysis: An overview. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1263-1268, 2005.

113. HAKULINEN, N.; KIISKINEN, L. L.; KRUUS, K.; SALOHEIMO, M.; PAANANEN, A.; KOIVULA, A.; ROUVINEN, J. Crystal structure of a laccase from Melanocarpus albomyces with an intact trinuclear copper site. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 8, p. 601-605, 2002.

114. KATAOKA, K.; KITAGAWA, R.; INOUE, M.; NARUSE, D.; SAKURAI, T.; HUANG, H. W. Point mutations at the type ICu ligands, Cys457 and Met467, and at the putative proton donor, Asp105, in Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase and reactions with dioxygen. **Biochemistry**, v. 44, n. 18, p. 7004-7012, 2005.

115. POZDNYAKOVA, N. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O. V. Catalytic properties of yellow laccase from Pleurotus ostreatus D1. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v. 30, n. 1, p. 19-24, 2004.

116. SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O2 Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**, v. 30, p. 3921-3932, 2008.

117. MESSERSCHMIDT, A.; LADENSTEIN, R.; HUBER, R.; BOLOGNESI, M.; AVIGLIANO, L.; PETRUZZELLI, R.; ROSSI, A.; FINAZZIAGRO, A. Refined crystal-structure of ascorbate oxidase at 1.9 a resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 224, n. 1, p. 179-205, 1992.

118. SHIMIZU, A.; KWON, J. H.; SASAKI, T.; SATOH, T.; SAKURAI, N.; SAKURAI, T.; YAMAGUCHI, S.; SAMEJIMA, T. Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase and its mutants for potential copper ligands. **Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3034-3042, 1999.

119. QUINTANAR, L.; STOJ, C.; TAYLOR, A.; HART, P.; KOSMAN, D.; SOLOMON, E. Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. **Accounts of chemical research**, v. 40, n. 6, p. 445-452, 2007.

120. DURAO, P.; BENTO, I.; FERNANDES, A. T.; MELO, E. P.; LINDLEY, P. F.; MARTINS, L. O. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from Bacillus subtilis: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 514-526, 2006.

121. GRAY, H. B.; MALMSTROM, B. G.; WILLIAMS, R. J. P. Copper coordination in blue proteins. Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 5, n. 5, p. 551-559, 2000.

122. COLE, J. L.; CLARK, P. A.; SOLOMON, E. I. Spectroscopic and chemical studies of the laccase trinuclear copper active-site - geometric and electronic-structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 26, p. 9534-9548, 1990.

123. RULISEK, L.; SOLOMON, E. I.; RYDE, U. A combined quantum and molecular mechanical study of the O-2 reductive cleavage in the catalytic cycle of multicopper oxidases. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 16, p. 5612-5628, 2005.

124. CHRISTENSON, A.; SHLEEV, S.; MANO, N.; HELLER, A.; GORTON, L. Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1757, n. 12, p. 1634-1641, 2006.

125. SHIMIZU, A.; SASAKI, T.; KWON, J. H.; ODAKA, A.; SATOH, T.; SAKURAI, N.; SAKURAI, T.; YAMAGUCHI, S.; SAMEJIMA, T. Site-directed mutagenesis of a possible type 1 copper ligand of bilirubin oxidase; a Met467Gln mutant shows stellacyanin-like properties. **Journal of Biochemistry**, v. 125, n. 4, p. 662-668, 1999.

126. CLAYDEN, J.; WARREN, S. G. **Organic chemistry**, Oxford: Oxford University Press, 2001, 1 v.

127. ADENIER, A.; BERNARD, M. C.; CHEHIMI, M. M.; CABET-DELIRY, E.; DESBAT, B.; FAGEBAUME, O.; PINSON, J.; PODVORICA, F. Covalent modification of iron surfaces by electrochemical reduction of aryldiazonium salts. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 19, p. 4541-4549, 2001.

128. CHAUSSE, A.; CHEHIMI, M. M.; KARSI, N.; PINSON, J.; PODVORICA, F.; VAUTRIN-UL, C. The electrochemical reduction of diazonium salts on iron electrodes. The formation of covalently bonded organic layers and their effect on corrosion. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 1, p. 392-400, 2002.

129. LIU, G. Z.; BOCKING, T.; GOODING, J. J. Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 600, n. 2, p. 335-344, 2007.

130. STEWART, M. P.; MAYA, F.; KOSYNKIN, D. V.; DIRK, S. M.; STAPLETON, J. J.; MCGUINESS, C. L.; ALLARA, D. L.; TOUR, J. M. Direct covalent grafting of conjugated molecules onto Si, GaAs, and Pd surfaces from aryidiazonium salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 370-378, 2004.

131. HURLEY, B. L.; MCCREERY, R. L. Covalent bonding of organic molecules to Cu and Al alloy 2024 T3 surfaces via diazonium ion reduction. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 151, n. 5, p. B252-B259, 2004.

132. CHEN, B.; FLATT, A. K.; JIAN, H. H.; HUDSON, J. L.; TOUR, J. M. Molecular grafting to silicon surfaces in air using organic triazenes as stable diazonium sources and HF as a constant hydride-passivation source. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 19, p. 4832-4836, 2005.

133. PINSON, J.; PODVORICA, F. Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts. **Chemical Society Reviews**, v. 34, n. 5, p. 429-439, 2005.

134. DOWNARD, A. J.; RODDICK, A. D. Protein adsorption at glassy-carbon electrodes - the effect of covalently bound surface groups. **Electroanalysis**, v. 7, n. 4, p. 376-378, 1995.

135. BARANTON, S.; BELANGER, D. Electrochemical derivatization of carbon surface by reduction of in situ generated diazonium cations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 51, p. 24401-24410, 2005.

136. BLANKESPOOR, R.; LIMOGES, B.; SCHOLLHORN, B.; SYSSA-MAGALE, J. L.; YAZIDI, D. Dense monolayers of metal-chelating ligands covalently attached to carbon electrodes electrochemically and their useful application in affinity binding of histidine-tagged proteins. **Langmuir**, v. 21, n. 8, p. 3362-3375, 2005.

137. DOWNARD, A. J.; RODDICK, A. D.; BOND, A. M. Covalent modification of carbon electrodes for voltammetric differentiation of dopamine and ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 317, n. 1-3, p. 303-310, 1995.

138. FERREYRA, N.; COCHE-GUERENTE, L.; LABBE, P. Construction of layer-by-layer selfassemblies of glucose oxidase and cationic polyelectrolyte onto glassy carbon electrodes and electrochemical study of the redox-mediated enzymatic activity. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 3, p. 477-484, 2004.

139. HALL, S. B.; YANG, X.; OFFICER, D. L.; BELCHER, W. J.; BURRELL, A. K. Glassy carbon based sensors. **Synthetic Metals**, v. 137, n. 1-3, p. 1429-1430, 2003.

140. VAIK, K.; SARAPUU, A.; TAMMEVESKI, K.; MIRKHALAF, F.; SCHIFFRIN, D. J. Oxygen reduction on phenanthrenequinone-modified glassy carbon electrodes in 0.1 M KOH. Journal of **Electroanalytical Chemistry**, v. 564, n. 1-2, p. 159-166, 2004.

141. CREAGER, S.; LIU, B.; MEI, H.; PERPALL, M.; SMITH, D.; DESMARTEAU, D. Fluorosulfonimide electrolytes grafted onto carbon electrodes: Synthesis and characterization. In: SOUTHEAST REGIONAL MEETING OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 56. 2004, North Carolina. **Abstracts...**, Washington: American Chemical Society, 2004, GEN-757.

142. YANG, X. H.; HALL, S. B.; BURRELL, A. K.; OFFICER, D. L. A pH-responsive hydroquinone-functionalised glassy carbon electrode. **Chemical Communications**, v. 24, p. 2628-2629, 2001.

143. HEALD, C. G. R.; WILDGOOSE, G. G.; JIANG, L.; JONES, T. G. J.; COMPTON, R. G. Chemical derivatisation of multiwalled carbon nanotubes using diazonium salts. **Chemphyschem**, v. 5, n. 11, p. 1794-1799, 2004.

144. PISHKO, M. V.; KATAKIS, I.; LINDQUIST, S. E.; HELLER, A.; DEGANI, Y. Electrical communication between graphite-electrodes and glucose-oxidase redox polymer complexes. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 190, p. 221-249, 1990.

145. YOO, B. K.; MYUNG, S.; LEE, M.; HONG, S.; CHUN, K.; PAIK, H. J.; KIM, J.; LIM, J. K.; JOO, S. W. Self-assembly of functionalized single-walled carbon nanotubes prepared from aryl diazonium compounds on Ag surfaces. **Materials Letters**, v. 60, n. 27, p. 3224-3226, 2006.

146. QIN, S. H.; QIN, D. Q.; FORD, W. T.; ZHANG, Y. J.; KOTOV, N. A. Covalent cross-linked polymer/single-wall carbon nanotube multilayer films. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 8, p. 2131-2135, 2005.

147. KUO, T. C.; MCCREERY, R. L.; SWAIN, G. M. Electrochemical modification of boron-doped chemical vapor deposited diamond surfaces with covalently bonded monolayers. **Electrochemical and Solid State Letters**, v. 2, n. 6, p. 288-290, 1999.

148. UETSUKA, H.; SHIN, D.; TOKUDA, N.; SAEKI, K.; NEBEL, C. E. Electrochemical grafting of boron-doped single-crystalline chemical vapor deposition diamond with nitrophenyl molecules. **Langmuir**, v. 23, n. 6, p. 3466-3472, 2007.

149. WANG, J.; CARLISLE, J. A. Covalent immobilization of glucose oxidase on conducting ultrananocrystalline diamond thin films. **Diamond and Related Materials**, v. 15, n. 2-3, p. 279-284, 2006.

150. DOWNARD, A. J. Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes. **Electroanalysis**, v. 12, n. 14, p. 1085-1096, 2000.

151. PAN, Q. M.; WANG, H. B.; JIANG, Y. H. Natural graphite modified with nitrophenyl multilayers as anode materials for lithium ion batteries. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 329-334, 2007.

152. RUDIGER, O.; ABAD, J. M.; HATCHIKIAN, E. C.; FERNANDEZ, V. M.; DE LACEY, A. L. Oriented immobilization of Desulfovibrio gigas hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 46, p. 16008-16009, 2005.

153. BOURDILLON, C.; DELAMAR, M.; DEMAILLE, C.; HITMI, R.; MOIROUX, J.; PINSON, J. Immobilization of glucose-oxidase on a carbon surface derivatized by electrochemical reduction of diazonium salts. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 336, n. 1-2, p. 113-123, 1992.

154. IWASITA, T.; NART, F. C. In situ infrared spectroscopy at electrochemical interfaces. **Progress in Surface Science**, v. 55, n. 4, p. 271-340, 1997.

155. SOCRATES, G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Ed. 3, New York: John Wiley, 2001.

156. DRONOV, R.; KURTH, D. G.; MOEHWALD, H.; SCHELLER, F. W.; LISDAT, F. Communication in a protein stack: Electron transfer between cytochrome c and bilirubin oxidase within a polyelectrolyte multilayer. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 16, p. 3000-3003, 2008.

157. GOBEL, G.; LISDAT, F. Organic interlayers for oxygen reducing electrodes based on bilirubin oxidase and MWCNT modified gold. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 11, p. 1691-1694, 2008.

158. STAMENKOVIC, V.; SCHMIDT, T. J.; ROSS, P. N.; MARKOVIC, N. M. Surface composition effects in electrocatalysis: Kinetics of oxygen reduction on well-defined Pt3Ni and Pt3Co alloy surfaces. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 46, p. 11970-11979, 2002.

159. STAMENKOVIC, V.; SCHMIDT, T. J.; ROSS, P. N.; MARKOVIC, N. M. Surface segregation effects in electrocatalysis: kinetics of oxygen reduction reaction on polycrystalline Pt3Ni alloy surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 554, p. 191-199, 2003.

160. STAMENKOVIC, V. R.; FOWLER, B.; MUN, B. S.; WANG, G. F.; ROSS, P. N.; LUCAS, C. A.; MARKOVIC, N. M. Improved oxygen reduction activity on Pt3Ni(111) via increased surface site availability. **Science**, v. 315, n. 5811, p. 493-497, 2007.

161. STAMENKOVIC, V. R.; MUN, B. S.; MAYRHOFER, K. J. J.; ROSS, P. N.; MARKOVIC, N. M. Effect of surface composition on electronic structure, stability, and electrocatalytic properties of Pt-transition metal alloys: Pt-skin versus Pt-skeleton surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 27, p. 8813-8819, 2006.

162. BLURTON, K. F.; RIDDIFOR.AC Shapes of practical rotating disc electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 10, n. 5-6, p. 457-464, 1965.

163. MILLER, B.; BRUCKENS.S Rotating-disk electrode voltammetry using small sample volumes. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 13, p. 2033-2035, 1974.

164. PRATER, K. B.; ADAMS, R. N. A critical evaluation of practical rotated disk electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 153-155, 1966.

165. LEGER, C.; JONES, A. K.; ALBRACHT, S. P. J.; ARMSTRONG, F. A. Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [NiFe]-hydrogenase and other enzymes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 50, p. 13058-13063, 2002.

166. PAULUS, U. A.; WOKAUN, A.; SCHERER, G. G.; SCHMIDT, T. J.; STAMENKOVIC, V.; RADMILOVIC, V.; MARKOVIC, N. M.; ROSS, P. N. Oxygen reduction on carbon-supported Pt-Ni and Pt-Co alloy catalysts. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 16, p. 4181-4191, 2002.

167. SILVA, F.; SOTTOMAYOR, M. J.; MARTINS, A. A voltammetric study of a surface phase transformation of adsorbed HPO42- anion on Au(111) in the presence of Na+ cations. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 375, n. 1-2, p. 395-399, 1994.

168. FELIU, J. M.; VALLS, M. J.; ALDAZ, A.; CLIMENT, M. A.; CLAVILIER, J. Alkali metal cations and pH effects on a splitting of the unusual adsorption states of Pt(111) voltammograms in phosphate buffered solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 475-481, 1993.

169. REDA, T.; HIRST, J. Interpreting the catalytic voltammetry of an adsorbed enzyme by considering substrate mass transfer, enzyme turnover, and interfacial electron transport. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 3, p. 1394-1404, 2006.

170. HEFFRON, K.; LEGER, C.; ROTHERY, R. A.; WEINER, J. H.; ARMSTRONG, F. A. Determination of an optimal potential window for catalysis by E-coli dimethyl sulfoxide reductase and hypothesis on the role of Mo(V) in the reaction pathway. **Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3117-3126, 2001.

171. LEGER, C.; HEFFRON, K.; PERSHAD, H. R.; MAKLASHINA, E.; LUNA-CHAVEZ, C.; CECCHINI, G.; ACKRELL, B. A. C.; ARMSTRONG, F. A. Enzyme electrokinetics: Energetics of succinate oxidation by fumarate reductase and succinate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 40, n. 37, p. 11234-11245, 2001.

172. LEGER, C.; JONES, A. K.; ROSEBOOM, W.; ALBRACHT, S. P. J.; ARMSTRONG, F. A. Enzyme electrokinetics: Hydrogen evolution and oxidation by Allochromatium vinosum [NiFe]-hydrogenase. **Biochemistry**, v. 41, n. 52, p. 15736-15746, 2002.

173. ANDERSON, L. J.; RICHARDSON, D. J.; BUTT, J. N. Catalytic protein film voltammetry from a respiratory nitrate reductase provides evidence for complex electrochemical modulation of enzyme activity. **Biochemistry**, v. 40, n. 38, p. 11294-11307, 2001.

174. BIANCO, P.; HALADJIAN, J. Electrocatalytic hydrogen-evolution at the pyrolytic-graphite electrode in the presence of hydrogenase. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 139, n. 9, p. 2428-2432, 1992.

175. BUTT, J. N.; FILIPIAK, M.; HAGEN, W. R. Direct electrochemistry of Megasphaera elsdenii iron hydrogenase - Definition of the enzyme's catalytic operating potential and quantitation of the catalytic behaviour over a continuous potential range. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, n. 1, p. 116-122, 1997.

176. BUTT, J. N.; THORNTON, J.; RICHARDSON, D. J.; DOBBIN, P. S. Voltammetry of a flavocytochrome c(3): The lowest potential heme modulates fumarate reduction rates. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 2, p. 1001-1009, 2000.

177. HIRST, J.; SUCHETA, A.; ACKRELL, B. A. C.; ARMSTRONG, F. A. Electrocatalytic voltammetry of succinate dehydrogenase: Direct quantification of the catalytic properties of a complex electron-transport enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 21, p. 5031-5038, 1996.

178. HIRST, J.; ACKRELL, B. A. C.; ARMSTRONG, F. A. Global observation of hydrogen/deuterium isotope effects on bidirectional catalytic electron transport in an enzyme: Direct measurement by protein-film voltammetry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 32, p. 7434-7439, 1997.

179. JONES, A. K.; SILLERY, E.; ALBRACHT, S. P. J.; ARMSTRONG, F. A. Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst. **Chemical Communications**, v. 8, p. 866-867, 2002.

180. SUCHETA, A.; ACKRELL, B. A. C.; COCHRAN, B.; ARMSTRONG, F. A. Diode-like behavior of a mitochondrial electron-transport enzyme. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 361-362, 1992.

181. SUCHETA, A.; CAMMACK, R.; WEINER, J.; ARMSTRONG, F. A. Reversible electrochemistry of fumarate reductase immobilized on an electrode surface - direct voltammetric observations of redox centers and their participation in rapid catalytic electron-transport. **Biochemistry**, v. 32, n. 20, p. 5455-5465, 1993.

182. CHIDSEY, C. E. D. Free-energy and temperature-dependence of electron-transfer at the metal-electrolyte interface. **Science**, v. 251, n. 4996, p. 919-922, 1991.

183. SOLOMON, E. I.; SARANGI, R.; WOERTINK, J. S.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J.; GHOSH, S. O₂ and N₂O activation by bi-, tri-, and tetranuclear Cu clusters in biology. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 7, p. 581-591, 2007.

184. BAYMANN, F.; BARLOW, N. L.; AUBERT, C.; SCHOEPP-COTHENET, B.; LEROY, G.; ARMSTRONG, F. A. Voltammetry of a 'protein on a rope'. **FEBS Letters**, v. 539, n. 1-3, p. 91-94, 2003.

185. LEWIS, E. A.; TOLMAN, W. B. Reactivity of dioxygen-copper systems. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 1047-1076, 2004.

186. SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**, v. 30, p. 3921-3932, 2008.

187. LEGER, C.; ELLIOTT, S. J.; HOKE, K. R.; JEUKEN, L. J. C.; JONES, A. K.; ARMSTRONG, F. A. Enzyme electrokinetics: Using protein film voltammetry to investigate redox enzymes and their mechanisms. **Biochemistry**, v. 42, n. 29, p. 8653-8662, 2003.

188. TSUJIMURA, S.; KURIYAMA, A.; FUJIEDA, N.; KANO, K.; IKEDA, T. Mediated spectroelectrochemical titration of proteins for redox potential measurements by a separator-less one-compartment bulk electrolysis method. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 2, p. 325-331, 2005.

189. MANO, N.; FERNANDEZ, J. L.; KIM, Y.; SHIN, W.; BARD, A. J.; HELLER, A. Oxygen is electroreduced to water on a "wired" enzyme electrode at a lesser overpotential than on platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 50, p. 15290-15291, 2003.

190. SOUKHAREV, V.; MANO, N.; HELLER, A. A four-electron O₂-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V. Journal of the American Chemical Society, v. 126, n. 27, p. 8368-8369, 2004.

191. ROSSMEISL, J.; KARLBERG, G. S.; JARAMILLO, T.; NORSKOV, J. K. Steady state oxygen reduction and cyclic voltammetry. **Faraday Discussions**, v. 140, p. 337-346, 2008.

192. ZHANG, J. L.; VUKMIROVIC, M. B.; XU, Y.; MAVRIKAKIS, M.; ADZIC, R. R. Controlling the catalytic activity of platinum-monolayer electrocatalysts for oxygen reduction with different substrates. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 14, p. 2132-2135, 2005.

193. HERNANDEZ, J.; SOLLA-GULLON, J.; HERRERO, E.; ALDAZ, A.; FELIU, J. M. Electrochemistry of shape-controlled catalysts: Oxygen reduction reaction on cubic gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 38, p. 14078-14083, 2007.

194. NILEKAR, A. U.; MAVRIKAKIS, M. Improved oxygen reduction reactivity of platinum monolayers on transition metal surfaces. **Surface Science**, v. 602, n. 14, p. L89-L94, 2008.

195. YANG, H.; VOGEL, W.; LAMY, C.; ALONSO-VANTE, N. Structure and electrocatalytic activity of carbon-supported Pt-Ni alloy nanoparticles toward the oxygen reduction reaction. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 30, p. 11024-11034, 2004.

196. CHEN, S.; FERREIRA, P. J.; SHENG, W. C.; YABUUCHI, N.; ALLARD, L. F.; SHAO-HORN, Y. Enhanced activity for oxygen reduction reaction on "Pt₃CO" nanoparticles: Direct evidence of percolated and sandwich-segregation structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 42, p. 13818-13819, 2008.

197. LIMA, F. H. B.; ZHANG, J.; SHAO, M. H.; SASAKI, K.; VUKMIROVIC, M. B.; TICIANELLI, E. A.; ADZIC, R. R. Pt monolayer electrocatalysts for O₂ reduction: PdCo/C substrate-induced activity in alkaline media. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 4, p. 399-407, 2008.

198. PAULUS, U. A.; WOKAUN, A.; SCHERER, G. G.; SCHMIDT, T. J.; STAMENKOVIC, V.; MARKOVIC, N. M.; ROSS, P. N. Oxygen reduction on high surface area Pt-based alloy catalysts in comparison to well defined smooth bulk alloy electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 47, n. 22-23, p. 3787-3798, 2002.

199. PROCACCINI, R.; CERE, S.; VAZQUEZ, M. Oxygen reduction on Cu-Zn alloys. Journal of Applied Electrochemistry, v. 39, n. 2, p. 177-184, 2009.

200. ROCHE, I.; CHAINET, E.; CHATENET, M.; VONDRAK, J. Carbon-supported manganese oxide nanoparticles as electrocatalysts for the Oxygen Reduction Reaction (ORR) in alkaline medium: Physical characterizations and ORR mechanism. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 3, p. 1434-1443, 2007.

201. CHRISTENSON, A.; DIMCHEVA, N.; FERAPONTOVA, E. E.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; STOICA, L.; SHLEEV, S.; YAROPOLOV, A. L.; HALTRICH, D.; THORNELEY, R. N. F.; AUST, S. D. Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. **Electroanalysis**, v. 16, n. 13-14, p. 1074-1092, 2004.

202. HELLER, A. Miniature biofuel cells. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 2, p. 209-216, 2004.

203. BARTON, S. C.; KIM, H. H.; BINYAMIN, G.; ZHANG, Y. C.; HELLER, A. The "wired" laccase cathode: High current density electroreduction of O-2 to water at +0.7 V (NHE) at pH 5. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 24, p. 5802-5803, 2001.

204. MANO, N.; SOUKHAREV, V.; HELLER, A. A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O-2 electroreduction. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 23, p. 11180-11187, 2006.

205. KANG, C.; SHIN, H.; HELLER, A. On the stability of the "wired" bilirubin oxidase oxygen cathode in serum. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 1, p. 22-26, 2006.

206. GALLAWAY, J. W.; BARTON, S. A. C. Kinetics of redox polymer-mediated enzyme electrodes. Journal of the American Chemical Society, v. 130, n. 26, p. 8527-8536, 2008.

207. GAO, Z. Q.; BINYAMIN, G.; KIM, H. H.; BARTON, S. C.; ZHANG, Y. C.; HELLER, A. Electrodeposition of redox polymers and co-electrodeposition of enzymes by coordinative crosslinking. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 41, n. 5, p. 810-813, 2002.

208. TSUJIMURA, S.; KAWAHARADA, M.; NAKAGAWA, T.; KANO, K.; IKEDA, T. Mediated bioelectrocatalytic O-2 reduction to water at highly positive electrode potentials near neutral pH. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 2, p. 138-141, 2003.

209. NAKAGAWA, T.; TSUJIMURA, S.; KANO, K.; IKEDA, T. Bilirubin oxidase and [Fe(CN)(6)](3-/4-) modified electrode allowing diffusion-controlled reduction of O₂ to water at pH 7.0. **Chemistry Letters**, v. 32, n. 1, p. 54-55, 2003.

210. STEVEN, G., BRATSCH J Standard electrode potentials and coefficients in water at 298 K. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 18, n. 1, p. 1-21, 1989.

211. FEE, J. A., MALMSTROM, B. G., VANNGARD, T Colloquim der Gesellscahft fuer Biologische Chemie, Mosbach/Baden. Berlin: Springer-Verlag, 1968, p. 29.

212. FEE, J. A., MALMSTROM, B. G., VANNGARD, T The reduction of fungal laccase at high pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 197, p. 136-142, 1969.

213. BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

214. D'ALESSANDRO, W.; BELLOMO, S.; PARELLO, F.; BRUSCA, L.; LONGO, M. Survey on fluoride, bromide and chloride contents in public drinking water supplies in Sicily (Italy). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 145, n. 1-3, p. 303-313, 2008.

215. HIROSE, J.; INOUE, K.; SAKURAGI, H.; KIKKAWA, M.; MINAKAMI, M.; MORIKAWA, T.; IWAMOTO, H.; HIROMI, K. Anions binding to bilirubin oxidase from Trachyderma tsunodae K-2593. **Inorganica Chimica Acta**, v. 273, n. 1-2, p. 204-212, 1998.

216. XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7608-7614, 1996.

217. FARNETH, W. E.; D'AMORE, M. B. Encapsulated laccase electrodes for fuel cell cathodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 581, n. 2, p. 197-205, 2005.

218. SUN, Y. H.; BARTON, S. C. Methanol tolerance of a mediated, biocatalytic oxygen cathode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 590, n. 1, p. 57-65, 2006.

219. DAWSON, J. H.; DOOLEY, D. M.; GRAY, H. B. Coordination environment and fluoride binding of type-2 copper in blue copper oxidase ceruloplasmin. **Proceedings of the National** Academy of Sciences of the United States of America, v. 75, n. 9, p. 4078-4081, 1978.

220. DAWSON, J. H.; DOOLEY, D. M.; GRAY, H. B. Coordination environment and fluoride binding of type-2 copper in the blue copper protein ascorbate oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences**, v. 77, n. 9, p. 5028-5031, 1980.

221. MALKIN, R.; MALMSTROM, B. G.; VANNGARD, T. The requirement of the "non-blue" copper(II) for the activity of fungal laccase. **FEBS Letters**, v. 1, n. 1, p. 50-54, 1968.

222. REINHAMMAR, B. R. Oxidation-reduction potentials of electron acceptors in laccases and stellacyanin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 275, n. 2, p. 245-259, 1972.

223. MESSERSCHMIDT, A.; LUECKE, H.; HUBER, R. X-Ray Structures and mechanistic implications of 3 functional-derivatives of ascorbate oxidase from zucchini - reduced, peroxide and azide forms. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 3, p. 997-1014, 1993.

224. ZAITSEV, V. N.; ZAITSEVA, I.; PAPIZ, M.; LINDLEY, P. F. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi copper oxidase in the plasma. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 579-587, 1999.

225. DEINUM, J.; VANNGARD, T. Stoichiometry of paramagnetic copper and oxidationreduction potentials of type-i copper in human ceruloplasmin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 310, n. 2, p. 321-330, 1973.

226. ALLENDORF, M. D.; SPIRA, D. J.; SOLOMON, E. I. Low-temperature magnetic circulardichroism studies of native laccase - spectroscopic evidence for exogenous ligand bridging at a trinuclear copper active-site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 10, p. 3063-3067, 1985.

227. FRATERRIGO, T. L.; MILLER, C.; REINHAMMAR, B.; MCMILLIN, D. R. Which copper is paramagnetic in the type 2/type 3 cluster of laccase? **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 183-187, 1999.

228. HANNA, P. M.; MCMILLIN, D. R.; PASENKIEWICZGIERULA, M.; ANTHOLINE, W. E.; REINHAMMAR, B. Type-2-depleted fungal laccase. **Biochemical Journal**, v. 253, n. 2, p. 561-568, 1988.

229. MALKIN, R.; MALMSTRO.BG; VANNGARD, T. Reversible removal of one specific copper(2) from fungal laccase. **European Journal of Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 253, 1969.

230. MORPURGO, L.; MONDOVI, B.; FINAZZIA.A; ROTILIO, G. Studies of metal sites of copper proteins .4. stellacyanin - preparation of apoprotein and involvement of sulfhydryl and tryptophan in copper chromophore. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 271, n. 2, p. 292, 1972.

231. MORRIS, M. C.; HAUENSTEIN, B. L.; MCMILLIN, D. R. Metal-replacement studies of blue copper proteins - the removal and replacement of copper(i) from chinese laccase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 743, n. 3, p. 389-393, 1983.

232. SAVINI, I.; MORPURGO, L.; AVIGLIANO, L. Full, reversible copper removal from ascorbate oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 131, n. 3, p. 1251-1255, 1985.

233. PEYRATOUT, C. S.; SEVERNS, J. C.; HOLM, S. R.; MCMILLAN, D. R. EPR studies of ligand-binding to the type-2 type-3 cluster in tree laccase. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 314, n. 2, p. 405-411, 1994.

234. TOKUNAGA, J. Solubilities of oxygen, nitrogen, and carbon dioxide in aqueous alcohol solutions. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 20, n. 1, p. 41-46, 1975.

235. BATTINO, R. **Oxygen and Ozone**. (IUPAC Solubility Data Series, 7). Oxford: Pergamon Press, 1981, 1 v.

236. FOSTER, C. **Coupling of laccase to carbon surfaces**. 2008. 76 f. Part II Thesis. Inorganic Chemistry Laboratory, University of Oxford, Oxford, 2008.

237. HUDAK, N. S.; BARTON, S. C. Mediated biocatalytic cathode for direct methanol membrane-electrode assemblies. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 152, n. 5, p. A876-A881, 2005.

238. JIANG, L. H.; SUN, G. Q.; WANG, S. L.; WANG, G. X.; XIN, Q.; ZHOU, Z. H.; ZHOU, B. Electrode catalysts behavior during direct ethanol fuel cell life-time test. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 7, p. 663-668, 2005.

239. PAGANIN, V.; SITTA, E.; IWASITA, T.; VIELSTICH, W. Methanol crossover effect on the cathode potential of a direct PEM fuel cell. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 35, n. 12, p. 1239-1243, 2005.

240. SCHULTZ, T.; ZHOU, S.; SUNDMACHER, K. Current status of and recent developments in the direct methanol fuel cell. **Chemical Engineering & Technology**, v. 24, n. 12, p. 1223-1233, 2001.

241. ZHOU, S.; SCHULTZ, T.; PEGLOW, M.; SUNDMACHER, K. Analysis of the nonlinear dynamics of a direct methanol fuel cell. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, n. 3, p. 347-355, 2001.

242. LEE, S. K.; GEORGE, S. D.; ANTHOLINE, W. E.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; SOLOMON, E. I. Nature of the intermediate formed in the reduction of  $O_2$  to  $H_2O$  at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. Journal of the American Chemical Society, v. 124, n. 21, p. 6180-6193, 2002.

243. RYDE, U.; HSIAO, Y. W.; RULISEK, L.; SOLOMON, E. I. Identification of the peroxy adduct in multicopper oxidases by a combination of computational chemistry and extended X-ray absorption fine-structure measurements. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 4, p. 726-727, 2007.

244. COPELAND, R. A. **Enzymes:** A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. 2 ed., New York: Wiley-VCH, 2000, 1 v.