Universidade de São Paulo – USP
Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Programa de Pós-Graduação em Química

Kamila Cássia Pagnoncelli

Biocélula a combustível utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e álcool desidrogenase como biocatalisadores para bioprodução e oxidação de etanol

São Carlos

2017

Kamila Cássia Pagnoncelli

Biocélula a combustível utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e álcool desidrogenase como biocatalisadores para bioprodução e oxidação de etanol

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em ciências.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Margarida e Paulino, ao meu irmão Rodrigo, e ao meu esposo Rafael, minha fonte de amor, sabedoria e carinho, por todo apoio e compreensão!

AGRADECIMENTOS

❖ A Deus, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida, me abençoar a cada dia, dando força, saúde, alegria e disposição para alcançar meus objetivos e realizar meus sonhos.

❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. Frank N. Crespilho, por quem tenho muito respeito e admiração. Agradeço pela paciência, dedicação e contribuições científicas, acadêmica e pessoal.

❖ Aos amigos do Grupo de Bioeletroquímica e Interfaces, pelas conversas, brincadeiras e por ter aprendido muito com todos vocês. Agradeço em especial a Andressa e a Graziela por toda discussão e contribuição científicas dadas ao trabalho.

❖ Aos amigos que conquistei durante o doutorado. A amizade de todos foi essencial nesta caminhada em busca dos mesmos objetivos. Aos queridos amigos, Joice e Leandro, que me acompanharam desde a graduação. Obrigada pela convivência harmoniosa, amizade e sinceridade.

❖ Aos meus pais, Margarida e Paulino, exemplos de caráter e dedicação, que fizeram o possível para que eu sempre alcançasse meus objetivos. Por acreditarem em mim, pelo amor incondicional, incentivo, carinho e suporte. Por me fazerem entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente, que desde cedo me mostraram a nobreza do trabalho e que sempre me apoiaram em minhas decisões. Ao lado de pessoas tão maravilhosas aprendi a ter valores insubstituíveis. Vocês podem não ter estudado como muitos, mas para mim sempre serão os maiores doutores na arte da vida.

❖ Ao meu irmão Rodrigo, que foi exemplo de gratidão e companheirismo, me acompanhou desde a infância, estando sempre ao meu lado. Sem ele eu jamais saberia o que é cuidar, amar e crescer estando na companhia de uma pessoa tão especial.

❖ Ao meu esposo Rafael, o homem mais honesto, generoso, inteligente, bem humorado, responsável, bondoso, carinhoso e lindo que já conheci! Por todo amor, carinho, amizade e compreensão nos momentos em que não pude estar ao seu lado. Obrigada por me mostrar que paciência é algo fundamental. Sua forma positiva de enfrentar as dificuldades da vida foram incentivos determinantes para eu chegar até aqui. Te amo com amor de eternidade!

❖ A minha sobrinha/afilhada Sarah, minha princesa, a flor mais linda do meu jardim, todo esse tempo longe fortaleceu ainda mais a vontade de estar junto de você.

❖ A toda minha família, tios, primos, avós e a minha cunhada Karlane, pessoas tão queridas que sempre estiveram torcendo por mim. Agradeço por todo incentivo e pelas orações nos momentos em que mais precisei.

❖ Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação, Profa. Dr. Marcia Nitschke e Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo, pelas contribuições para o término desta obra.

❖ Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pela infraestrutura fornecida, fundamental para o desenvolvimento do meu projeto de doutorado; em especial a Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) e ao programa de Pós-Graduação em Química. Meu sincero reconhecimento aos professores e funcionários, por tudo que me ensinaram e pela estrutura que vocês mantêm nesse instituto, propícia à formação de tantos profissionais.

❖ Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram para minha formação acadêmica e na minha formação como pessoa, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

❖ À CAPES pela bolsa de doutorado concedida e pelo apoio financeiro para a realização do trabalho.

“Fazei tudo por amor. Assim não há coisas pequenas: tudo é grande. A perseverança nas pequenas coisas, por amor, é heroísmo.”

“Quero que estejas sempre contente, porque a alegria é parte integrante do teu caminho. Pede essa mesma alegria sobrenatural para todos.”

São Josemaria Escrivá

RESUMO

Biocélulas a combustível (BFCs) são definidas como dispositivos bioeletroquímicos que utilizam componentes biológicos, como enzimas ou microrganismos, para converter energia química em energia elétrica. Neste estudo, reporta-se o desenvolvimento de um bioeletrodo composto por fibras flexíveis de carbono (FFC) modificadas com a enzima álcool desidrogenase (ADH), o qual foi utilizado juntamente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo enzima e microrganismos usados como biocatalisadores cooperativos para bioprodução e oxidação de etanol. A glicose é oxidada pelas células de levedura sob condições anaeróbias, e o etanol formado pela fermentação alcoólica é, em seguida, oxidado a acetaldeído pela enzima ADH. A oxidação de etanol pela ADH resulta ainda, na redução da molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo, NAD^+ a NADH . Posteriormente, o NADH formado nessa reação é eletroquimicamente oxidado a NAD^+ na superfície do bioeletrodo de FFC baseado em ADH (FFC-ADH). Avaliou-se a influência da temperatura e do pH na bioeletrocatalise de etanol pela ADH e a melhor resposta obtida foi em 40 °C e pH 8,5. Além disso, obteve-se uma excelente correlação linear entre os valores de concentração de etanol e densidade de corrente, indicando que a resposta bioeletrocatalítica da ADH é diretamente proporcional à concentração de etanol produzido a partir da fermentação. O conceito de que microrganismos e enzimas podem trabalhar cooperativamente para produzir uma nova classe de bioeletrodos, foi introduzido nesse trabalho. Por fim, demonstrou-se, que o bioeletrodo cooperativo pode ser aplicado com sucesso em uma BFC, utilizando o biocátodo de difusão de gás contendo a enzima bilirrubina oxidase (BOx) imobilizada em sua superfície.

Palavras-chave: fibras flexíveis de carbono, álcool desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, bioeletrocatalise, biocátodo de difusão de gás, bilirrubina oxidase.

ABSTRACT

Biofuel cells (BFCs) are defined as bioelectrochemical devices that use biological components, such as enzymes or microorganisms, to convert chemical energy into electric energy. In this study, we report the development of a bioelectrode composed of flexible carbon fibers (FCF) modified with the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) together with *Saccharomyces cerevisiae* yeast, being enzyme and microorganisms used as cooperative biocatalysts for bioproduction and oxidation of ethanol. Glucose is oxidized by the yeast cells in anaerobic conditions, and ethanol is produced through alcoholic fermentation and then it is oxidized to acetaldehyde by the ADH enzyme. The ethanol oxidation by ADH also results in the reduction of the nicotinamide adenine dinucleotide molecule, NAD^+ to NADH. Subsequently, the NADH produced in this reaction is electrochemically oxidized to NAD^+ on the surface of the FCF bioelectrode based on ADH (FCF-ADH). The influence of temperature and pH on the bioelectrocatalysis of ethanol was evaluated and the best performance was found at 40 °C and pH 8.5. Additionally, the results demonstrated an excellent linear correlation between the ethanol concentration and the current generated, which indicates that the bioelectrocatalytic response of ADH is directly proportional to concentration of ethanol produced from the fermentation. The present study has introduced the concept that microorganisms and enzymes can work cooperatively to produce a new class of bioelectrodes. Finally, it has been demonstrated that the cooperative bioelectrode can be applied successfully to BFC using a gas-diffusion biocathode containing the bilirubin oxidase enzyme (BOx) immobilized on its surface.

Keywords: flexible carbon fibers, alcohol dehydrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, bioelectrocatalysis, gas-diffusion biocathode, bilirubin oxidase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do princípio de funcionamento de uma BFC enzimática. O esquema mostra o combustível oxidando no ânodo e o agente oxidante reduzindo no cátodo..... 23
- Figura 2** - Representação da estrutura da enzima BOx (PDB: 2XLL). Em destaque tem-se o sítio ativo da enzima com o átomo de cobre T1 juntamente com os átomos de cobre do cluster trinuclear T2/T3..... 30
- Figura 3** - Representação da estrutura da enzima ADH (PDB: 4W6Z) (a) e de sua coenzima NAD⁺ (b) 31
- Figura 4** - Representação da estrutura tetramérica da enzima ADH com destaque em seu sítio ativo 32
- Figura 5** - Representação esquemática do mecanismo cinético para a enzima ADH. Trata-se de uma releitura do mecanismo inicialmente proposto por Dickenson e Dickinson [74], em que os autores reportaram a cinética de oxidação de etanol por NAD⁺ e a redução de acetaldeído e butiraldeído por NADH, catalisadas pela ADH 34
- Figura 6** - Representação esquemática do sistema biocooperativo com ADH (PDB: 4W6Z) e *Saccharomyces cerevisiae*. Detalhes da enzima: a coenzima NAD⁺ e o átomo de zinco próximo aos resíduos de aminoácidos, Cis43, Cis153 e His66..... 37
- Figura 7** - Fluxograma com as etapas de obtenção dos bioeletrodos e as técnicas utilizadas no desenvolvimento do trabalho, estudos eletroquímicos e de caracterização..... 40
- Figura 8** - (a) Esquema ilustrativo do processo de imobilização enzimática da ADH na superfície das FFC. (b) Representação da estrutura molecular do náfion (micropolímero hidrofílico)..... 42
- Figura 9** - Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS da solução de ADH (1,6 mg mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio (0,10 mol L⁻¹) pH 7,5 antes do processo de adsorção física da enzima (linha preta) e das soluções de ADH após a imersão das FFC durante 24 horas a 4 °C (demais linhas)..... 47
- Figura 10** - Representação da ADH (PDB: 4W6Z) com os resíduos de aminoácidos presentes na enzima, tirosina, fenilalanina e triptofano, respectivamente, e a estrutura química de cada aminoácido aromático..... 48
- Figura 11** - (a) Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS da solução de ADH em tampão fosfato de sódio (0,10 mol L⁻¹) pH 7,5 em diferentes concentrações (0,3 a 2,1 mg mL⁻¹). (b) Curva de calibração obtida a partir dos espectros da solução de ADH em diferentes concentrações 49
- Figura 12** - (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ na ausência de etanol (●) e na presença de etanol (●). (b) Voltamogramas cíclicos do eletrodo FFC contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ na ausência de etanol (●) e na presença de etanol (●). (c) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH sem NAD⁺ no eletrólito, na ausência de etanol (●) e na presença de etanol (●) em atmosfera inerte (N₂). Concentração

final de etanol no eletrólito: 0,49 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C 52

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos dos bioeletrodos FFC-ADH usando a fibra tratada (a) e a fibra pristina (b) com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito, na ausência de etanol (linha preta) e após sucessivas adições de etanol em atmosfera inerte (N₂). Concentração inicial e final de etanol no eletrólito: 0,085 e 0,92 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C 53

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos (a) FFC pristina e (b) FFC tratada, na ausência de NADH (linha preta) e na presença de 0,001 mol L⁻¹ de NADH em solução (linha azul) em atmosfera inerte (N₂). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C 54

Figura 15 - Variação da corrente com o tempo para o bioeletrodo FFC-ADH após sucessivas adições de etanol ao eletrólito saturado com N₂ e contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ em diferentes potenciais (*vs* Ag/AgCl_{sat}). Concentração de etanol a cada adição: 0,085 mol L⁻¹. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C 56

Figura 16 - Variação da corrente com o tempo para o bioeletrodo FFC-ADH após sucessivas adições de etanol ao eletrólito saturado com N₂ e contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ no potencial de 0,700 V (*vs* Ag/AgCl_{sat}). Concentração de etanol a cada adição: 0,085 mol L⁻¹. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C. *Inset*: Valores de densidade de corrente catalítica variando com a concentração de etanol 56

Figura 17 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de 600 µL de etanol ao eletrólito saturado com N₂ em diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C). Concentração final de etanol no eletrólito: 0,25 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5 59

Figura 18 - (a) Dependência dos valores de potencial de *onset* para a oxidação de etanol com variação de temperatura. (b) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol no potencial de 0,600 V *vs* Ag/AgCl_{sat} com variação de temperatura 60

Figura 19 - (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de 0,25 mol L⁻¹ de etanol ao eletrólito saturado com N₂ na temperatura de 10 °C (linha vermelha) e 40 °C (linha roxa). (b) Ampliação dos voltamogramas cíclicos com destaque no potencial de *onset*. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5 61

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de 600 µL de etanol ao eletrólito saturado com N₂ em diferentes pH (9,0; 8,5; 8,0; 7,5; 7,0; 6,5 e 6,0). Concentração final de etanol no eletrólito: 0,25 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹. Temperatura: 25 °C 62

Figura 21 - (a) Dependência dos valores de potencial de *onset* para a oxidação de etanol com variação de pH. (b) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol no potencial de 0,600 V *vs* Ag/AgCl_{sat} com variação de pH 63

Figura 22 - (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol ao eletrólito saturado com N_2 em pH 6,0 (linha vermelha) e 9,0 (linha roxa). (b) Ampliação dos voltamogramas cíclicos com destaque no potencial de *onset*. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: 25°C 64

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito, na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de $600 \mu\text{L}$ de etanol em atmosfera inerte (N_2) (linha vermelha). Concentração final de etanol no eletrólito: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,5. Temperatura: 40°C 65

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH em solução de glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) contendo NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) e levedura durante 6 horas (a) e 24 horas de fermentação em atmosfera inerte (N_2) (b). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Temperatura: 40°C . Concentração de levedura: $0,05 \text{ g mL}^{-1}$. Soluções de glicose e NAD^+ em tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,5 66

Figura 25 - (a) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol pela ADH no potencial de $0,600 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$) com o tempo de fermentação pela *S. cerevisiae* em condições anaeróbias. (b) Dependência da concentração de etanol produzido com o tempo de fermentação pela *S. cerevisiae* em condições anaeróbias. (c) Correlação linear entre corrente bioeletrocatalítica e concentração de etanol 68

Figura 26 - (a) Cromatogramas CG-FID da solução padrão de etanol em diferentes concentrações ($0,04$ a $1,27 \text{ mol L}^{-1}$). (b) Curva de calibração obtida a partir dos cromatogramas da solução padrão de etanol em diferentes concentrações. (c) Cromatogramas CG-FID das amostras obtidas a partir da fermentação pela levedura no período de 24 horas. (d) Ampliação do pico de etanol..... 69

Figura 27 - Representação da curva típica de crescimento celular de leveduras com suas respectivas fases de crescimento, fase lag, fase de transição, exponencial, estacionária e a desaceleração do metabolismo microbiológico 70

Figura 28 - Representação esquemática do processo fermentativo. As leveduras degradam a molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, durante a glicólise, ocorrendo a fosforilação de duas moléculas de ADP em ATP e a redução de NAD^+ a NADH. Cada molécula de piruvato é convertida, via acetaldeído, em uma molécula de etanol e outra de dióxido de carbono, ocorrendo a regeneração de NAD^+ pela oxidação de NADH..... 72

Figura 29 - (a) Imagens de microscopia eletrônica de varredura das FFC após o tratamento químico com H_2SO_4 e KMnO_4 . (b) Imagens da FFC após o tratamento químico e adsorção da ADH ($8,0 \text{ mg mL}^{-1}$) após 24 horas. (c) Imagens do bioeletrodo na presença de ADH e microrganismos após 24 horas de fermentação. (d) Imagens do bioeletrodo com ampliação e tratamento de cor ilustrando a formação do biofilme produzido pela levedura 74

Figura 30 - Estrutura química dos esteróis presentes na membrana plasmática da *S. cerevisiae*, ergosterol, fecosterol, lanosterol e zimosterol, respectivamente..... 75

Figura 31 - (a) Curva de polarização em estado estacionário do bioeletrodo cooperativo em solução de glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) contendo NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência de levedura (linha preta) e na presença de $0,05 \text{ g mL}^{-1}$ de levedura após 5 horas de fermentação (linha azul). (b) Monitoramento de potencial de circuito aberto obtido com o bioeletrodo cooperativo após 5 horas de fermentação. Soluções de glicose e NAD^+ em tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,5. Temperatura: 40°C 76

Figura 32 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do suporte de tecido de carbono (a), da camada de difusão sobre o tecido de carbono (b), das FFC na superfície da camada de difusão (c) e biopolímero composto por náfon, glutaraldeído e BOx na superfície das FFC suportadas na camada de difusão (d) 77

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo de difusão de gás baseado em BOx em solução tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) em atmosfera inerte (Ar) (linha preta) e no modo de respiração aérea (linha vermelha). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Temperatura: 40°C 78

Figura 34 - Monitoramento de potencial de circuito aberto obtido com o biocátodo operando no modo de difusão de gás (linha preta) e bioânodo cooperativo após 5 horas de fermentação (linha vermelha). Condições: pH 7,5 e 40°C 79

Figura 35 - (a) Configuração da BFC combinando o biocátodo de difusão de gás e o bioânodo cooperativo na ausência de levedura e (b) na presença de levedura. (c) Biocátodo no modo de difusão de gás. (d) Biocátodo de difusão de gás com ampliação da imagem ilustrando o suporte de FFC sobre o tecido de carbono usado para manter o contato elétrico. (e) Formação de gotículas de água pela reação eletroquímica no biocátodo 80

Figura 36 - (a) Voltagem da BFC operando durante as 5 horas iniciais de fermentação pela levedura. (b) Curvas de polarização e (c) curvas de potência da BFC operando na ausência de levedura (linha preta) e na presença de levedura após 5 horas de fermentação (linha azul). (d) Voltagem da BFC operando durante 27 horas de fermentação. Compartimento anódico: solução tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5 contendo glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) e *S. cerevisiae* ($0,05 \text{ g mL}^{-1}$) em atmosfera inerte (N_2). Compartimento catódico: solução tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5. Temperatura: 40°C 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores obtidos de concentração de ADH, área dos eletrodos de FFC utilizados e quantidade de enzima adsorvida nas FFC	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFC – Biocélula a combustível

O₂ – Oxigênio molecular

ATP – Adenosina trifosfato

CO₂ – Dióxido de carbono

GOx – Glicose oxidase (em inglês, *Glucose Oxidase*)

MB – Azul de metileno (em inglês, *Methylene Blue*)

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo (em inglês, *Flavin Adenine Dinucleotide*)

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (em inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

ADH – Álcool desidrogenase (em inglês, *Alcohol Dehydrogenase*)

BOx – Bilirrubina oxidase (em inglês, *Bilirubin Oxidase*)

MCOs – Multicobre oxidases (em inglês, *Multicopper Oxidases*)

PDB – Banco de dados de proteínas (em inglês, *Protein Data Bank*)

RRO – Reação de redução de oxigênio

SHE – Eletrodo padrão de hidrogênio (em inglês, *Standard Hydrogen Electrode*)

CH₃CH₂OH – Etanol

CH₃CHO – Acetaldeído

PTFE – Politetrafluoretileno

FFC – Fibras flexíveis de carbono

KMnO₄ – Permanganato de potássio

MnO₂ – Dióxido de manganês

HCl – Ácido clorídrico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

UV-VIS/NIR – Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível e infravermelho próximo (em inglês, *Ultraviolet-Visible/Near Infrared*)

Ag/AgCl_{sat} – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata saturado

CG – Cromatografia gasosa

FID – Detector de ionização de chama (em inglês, *Flame Ionization Detector*)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares (em inglês, *Extracellular Polymeric Substances*)

OCP – Potencial de circuito aberto (em inglês, *Open Circuit Potential*)

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔE^0 – Variação de potencial de redução

E_c^0 – Potencial de redução da reação catódica

E_a^0 – Potencial de redução da reação anódica

E^0 – Potencial no estado padrão

E – Potencial

ΔE_{onset} – Variação de potencial de *onset*

R – Constante universal dos gases

Q – Taxa de atividade das espécies oxidadas e reduzidas/Quociente de reação

T – Temperatura absoluta

n – número de elétrons

F – Constante de Faraday

ΔG – Energia livre de Gibbs

ΔH – Variação de entalpia

ΔS – Variação de entropia

P – Potência

R_e – Resistência

A – Absorbância/Área geométrica do eletrodo

ε – Absortividade molar

b – Caminho óptico

c – Concentração

K_M – Constante de Michaelis-Menten

K_M^{app} – Constante de Michaelis-Menten aparente

I – Corrente

I_{ss} – Corrente de estado estacionário

$I_{\text{máx}}$ – Corrente máxima

j – Densidade de corrente

v – Velocidade de varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Biocélulas a combustível	20
1.2 Biocélula a combustível microbiológica.....	25
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.3 Biocélula a combustível enzimática	27
1.3.1 Enzima bilirrubina oxidase (BOx)	28
1.3.2 Enzima álcool desidrogenase (ADH).....	31
1.3.2.1 Mecanismo cinético da ADH	33
1.4 Características e aplicações das fibras flexíveis de carbono (FFC).....	35
1.5 Bioeletrodo cooperativo composto por ADH e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2 OBJETIVOS	38
3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	39
3.1 Materiais e reagentes	39
3.2 Preparo dos eletrodos.....	41
3.2.1 Tratamento das fibras flexíveis de carbono	41
3.2.2 Bioeletrodo FFC-ADH.....	41
3.3 Bioeletrodo de difusão de gás	42
3.4 Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS	43
3.5 Estudo eletroquímico	44
3.6 Cromatografia gasosa	44
3.6.1 Determinação e quantificação de etanol	44
3.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	45
3.8 Configuração da biocélula a combustível de glicose-etanol/O ₂	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Quantificação da ADH adsorvida nas FFC.....	46
4.2 Oxidação de etanol catalisada pela enzima ADH	51
4.2.1 Influência das FFC e efeito do NAD ⁺ na bioeletrocatalise de etanol	51
4.2.2 Influência do tratamento químico das FFC na bioeletrocatalise de etanol	53
4.2.3 Bioeletrocatalise de etanol	55
4.2.4 Efeito da temperatura na bioeletrocatalise de etanol.....	58
4.2.5 Efeito do pH na bioeletrocatalise de etanol.....	61
4.2.6 Bioeletrodo cooperativo com ADH e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : bioeletrocatalise de etanol	64

4.3 Análise morfológica do bioânodo	73
4.4 Estudo da biocélula a combustível cooperativa de glicose-etanol/O ₂	75
5 CONCLUSÃO.....	83
6 REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocélulas a combustível

O estágio de desenvolvimento de um país está diretamente relacionado com o consumo de energia. Recentemente, fatores econômicos e ambientais vêm pressionando a demanda por processos de produção de energia limpa e eficientes, resultando em uma busca contínua por fontes alternativas de energia, bem como o desenvolvimento de sistemas e tecnologias que deixem tais fontes de energia mais eficientes, preservando o meio ambiente sem o esgotamento dos recursos naturais.¹⁻⁴ Dentre os possíveis sistemas de conversão eletroquímica de energia, a utilização de células a combustível pode ser o alicerce de uma revolução não apenas energética, como também socioambiental, uma vez que poucas tecnologias de produção de energia possuem o conjunto de vantagens que as células a combustível oferecem, tais como baixa emissão de poluentes COx, NOx e aromáticos, alta qualidade e confiabilidade da energia produzida, flexibilidade com relação ao combustível utilizado, sistema seguro e flexível.⁵ Células a combustível são definidas como dispositivos eletroquímicos capazes de produzir energia elétrica e calor, a partir de energia química. A conversão eletroquímica nestes sistemas apresenta rendimento energético superior a outras fontes de energia, já que não está sujeita às limitações de rendimento impostas pelo ciclo de Carnot, como no caso das máquinas térmicas.⁶ Dessa forma, as células a combustível convencionais apresentam características únicas em termos de conversão energética.

Neste contexto, a biocélula a combustível (BFC) também tem ganhado destaque, sendo atualmente vista como um dos sistemas de conversão de energia mais promissor. Este dispositivo funciona de maneira similar à das células a combustível, entretanto, são utilizados catalisadores biológicos ao invés de catalisadores metálicos. A BFC, portanto, é um caso particular das células a combustível, no qual enzimas redox usadas em biocélulas a combustível enzimáticas, ou microrganismos no caso das biocélulas a combustível microbiológicas são utilizados como bioeletrocatalisadores ao invés dos tradicionais catalisadores inorgânicos.⁷ Existem ainda dispositivos que combinam o uso de catalisadores inorgânico e biológico, sendo denominados de BFCs híbridas.⁸⁻¹⁰ Esta classe de biocélulas engloba também as que fazem uso de microrganismos e enzimas em um mesmo dispositivo.¹¹

Nas BCFs são utilizados, então, biocatalisadores para a conversão de energia química em energia elétrica,^{12,13} tendo como princípio de funcionamento a oxidação eletroquímica de um combustível e a redução de agentes oxidantes, como o oxigênio molecular (O₂).⁶ Este processo baseia-se na transferência de elétrons do bioânodo, onde ocorre portanto, uma ou mais reações de oxidação, ao biocátodo, com consequente geração de corrente. As reações eletroquímicas geram uma diferença de potencial, chamada de potencial de circuito aberto (OCP), que corresponde ao potencial em que não há fluxo de corrente e, por conseguinte, ao potencial máximo da cela. Em princípio, este potencial deve ser igual a diferença entre os potenciais de redução (ΔE^0) das reações catódica e anódica (E_c^0 e E_a^0 , respectivamente), conforme descrito na Equação 1:¹⁴

$$\Delta E^0 = E_c^0 - E_a^0 \quad (1)$$

Como os valores de OCP dependem da temperatura, e das atividades dos reagentes e dos produtos da reação eletroquímica global, ou seja, da composição da solução, a equação de Nernst pode ser utilizada para calcular o OCP, como mostrado na Equação 2:^{7,8,15}

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (2)$$

Em que E representa o potencial da cela, E^0 é o valor de potencial no estado padrão, R é a constante universal dos gases, Q refere-se à taxa de atividade das espécies oxidadas e reduzidas ($[a_{ox}]/[a_{red}]$), denominada também como quociente de reação, T é a temperatura absoluta, n é o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica, e F é a constante de Faraday. Em um caso ideal, o valor de OCP pode ser determinado pela diferença entre os potenciais termodinâmicos do par redox combustível/produto oxidado e do par redox oxidante/produto reduzido.¹⁶ No entanto, o OCP obtido experimentalmente pode ser inferior ao valor esperado. Já a eficiência teórica pode ser calculada a partir da relação entre a produção de energia útil e a entrada de energia. Nesse caso, a produção de energia útil refere-se ao trabalho elétrico ($w_{el} = \Delta G_{T,p}$), e a entrada de energia à entalpia da reação de oxidação.¹⁷ Portanto, a eficiência de uma BFC é dada de acordo com a Equação 3:

$$\text{Eficiência} = \frac{\Delta G}{\Delta H} = 1 - \frac{T\Delta S}{\Delta H} \quad (3)$$

Como a eficiência eletroquímica está correlacionada com o OCP,¹⁷ tem-se que:

$$\text{Eficiência} = \frac{-nF\Delta E}{\Delta H} \quad (4)$$

Contudo, avaliando-se isso na prática, o valor obtido da eficiência é menor, o qual pode ser atribuído a diversos fatores, como limitações referentes ao transporte de massa,¹⁸ fatores cinéticos¹⁹ e perdas ôhmicas.²⁰

Para aplicações práticas, o parâmetro fundamental para avaliar o desempenho de qualquer BFC é a potência (P) gerada pelo sistema, sendo esse parâmetro determinado pela seguinte equação:²¹

$$P_{\text{cel}} = E \int I dt \quad (5)$$

Em que, P_{cel} refere-se à potência e E_{cel} ao potencial da cela, e $I dt$ é a variação de corrente com o tempo. Caso a corrente seja constante, tem-se ainda:

$$P_{\text{cel}} = E_{\text{cel}} I \quad (6)$$

O potencial da BFC pode ainda ser descrito de acordo com a Equação 7.²¹

$$E_{\text{cel}} = E_c - E_a - \sum IR_e \quad (7)$$

Em que, E_c e E_a são os potenciais do cátodo e do ânodo, respectivamente, e R_e representa a resistência [Ω] do sistema.

Vale ressaltar que as perdas na resistência ôhmica ($\sum IR_e$) presentes no dispositivo, podem ser minimizadas com a utilização de celas eletroquímicas mais apropriadas, as quais possam diminuir as resistências que cada sistema poderá apresentar, uma vez que diminuindo a distância entre os eletrodos da BFC, por exemplo, poderá facilitar o fluxo de corrente elétrica no dispositivo. Outro fator importante, a ser levado em consideração, é a maximização entre os potenciais de cada eletrodo ($E_c - E_a$), ou seja, quanto maior o OCP, melhor será o desempenho da BFC.^{8,21,22} Nesse sentido, busca-se a obtenção de bioeletrodos que possam facilitar cada vez mais, a transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo durante as reações catalíticas. Visto que, estabelecer uma via eficiente de

transferência de elétrons é crucial para o desenvolvimento de uma biocélula com máxima eficiência.⁸

Considerando, portanto, a utilização de bioeletrodos enzimáticos em uma BFC, a potência deve estar relacionada com a área geométrica do eletrodo (A), assim, tem-se a seguinte equação:²¹

$$\text{Densidade de potência} = \frac{P_{\text{cel}}}{A} \quad (8)$$

Na Figura 1 é mostrado o esquema de uma BFC enzimática. Esse dispositivo é constituído por dois eletrodos, denominados de ânodo e cátodo, os quais são imersos em um eletrólito. No ânodo ocorre a oxidação de um combustível, enquanto enzimas no cátodo catalisam a reação na presença de um agente oxidante. As mesmas se destacam e são atualmente vistas como um dos sistemas de produção de energia mais promissores, sendo que empregam catalisadores e substratos naturais de fontes renováveis, gerando subprodutos que não degradam o meio ambiente durante o processo de conversão de energia.^{8,9,21,23} Além disso, as enzimas possuem vantagens relevantes em relação aos catalisadores químicos devido as características que essas biomoléculas apresentam, como biocompatibilidade, alta estabilidade e atividade em condições brandas de temperatura e pH, e ainda, alta seletividade específica.⁸ Mais detalhes são discutidos no tópico 1.3.

Figura 1 - Representação esquemática do princípio de funcionamento de uma BFC enzimática. O esquema mostra o combustível oxidando no ânodo e o agente oxidante reduzindo no cátodo.

Fonte: Autoria própria. As imagens das enzimas foram obtidas pelo banco de dados de proteínas: BOx (PDB: 2XLL) e ADH (PDB: 4W6Z).

O desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos baseados em biomoléculas surgiu devido ao grande interesse em seu potencial de aplicação em muitas áreas, tais como biossensores amperométricos e, em particular, biodispositivos implantáveis para geração de energia ou BFCs.^{9,24-27} O primeiro trabalho reportado na literatura sobre a geração de energia utilizando microrganismos foi relatado por Potter no começo do século XIX, em que o autor citou “a desintegração de compostos orgânicos por microrganismos é acompanhada pela liberação de energia elétrica”,²⁸ que mais tarde deu origem a essa nova classe de biodispositivos denominada de biocélulas a combustível. A possibilidade de usar microrganismos para gerar energia a partir de uma célula a combustível biológica é um tipo particular de biodispositivo que utiliza componentes biológicos, para produzir energia elétrica a partir de processos redox eletroquímicos.⁴ As BFCs, podem ainda, ser utilizadas tanto para a geração de energia, quanto para o tratamento de águas residuais, biorremediação, produção de combustíveis e produtos químicos.²⁹⁻³³ Apesar disso, o desempenho desses dispositivos em termos de densidade de energia, tempo de vida e estabilidade operacional ainda é muito baixo comparativamente ao das células a combustível convencionais.

Para o desenvolvimento conveniente desse tipo de sistema de conversão de energia, a estabilidade é um aspecto chave. Assim, as BFCs devem apresentar tempos de vida que se estendem de meses a anos para serem aplicadas. Melhorias significativas em termos de densidade de potência, estabilidade, membranas com menor custo e maior durabilidade, materiais anódicos e catódicos mais eficientes, são ainda objetivos a serem alcançados. Nesse contexto, pesquisadores vêm buscando novas possibilidades em termos de materiais biológicos e mediadores com taxa de transferência eletrônica mais eficiente, além da incorporação/preparação de materiais nanoestruturados que possibilitem uma maior área superficial e uma interface com a superfície do eletrodo mais integrada à estrutura da enzima ou dos microrganismos.^{34,35}

Além disso, considera-se de extrema importância o conhecimento minucioso das biomoléculas que serão utilizadas, bem como das reações envolvidas no sistema eletroquímico. Isso engloba, a escolha de microrganismos e de enzimas apropriadas, tanto do ânodo como do cátodo, mecanismo de catálise enzimática, métodos de imobilização enzimática, transferência de elétrons na interface enzima-eletrodo, e ainda, a configuração do dispositivo. Dentre os exemplos citados, no caso deste último, sabe-se que o compartimento ideal bioanódico, deve ser seletivo, a fim de evitar a redução de oxigênio. A presença de oxigênio molecular dissolvido no meio eletrolítico, o qual é utilizado como substrato para a

reação biocatalítica no cátodo, quando em contato com o bioânodo pode interferir na atividade biocatalítica da enzima presente no eletrodo.

No presente estudo, será reportada a utilização de enzimas e leveduras como biocatalisadores anódicos; ambas serão usadas para a oxidação de combustíveis em um ambiente livre de oxigênio. Primeiramente, serão abordados os conceitos e as características das leveduras, as quais estimulam mecanismos complexos de degradação de moléculas orgânicas no processo de fermentação. Dentre elas, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 Biocélula a combustível microbiológica

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura alcoólica *S. cerevisiae* pertence ao Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e gênero *Saccharomyces*.³⁶ Devido a crescente utilização da levedura *S. cerevisiae* nos processos industriais, tais como produção de alimentos e bebidas alcoólicas e também na produção de combustível renovável, este microrganismo tem sido muito estudado em diversas áreas da ciência. É amplamente utilizado na produção de etanol através da fermentação alcoólica no Brasil, proporcionando ao nosso país o atributo de maior exportador de etanol do mundo além de estar em segundo lugar como produtor, com crescente aumento na produção.^{37,38}

Além disso, o etanol tem sido reconhecido como o álcool mais promissor usado como fonte de energia renovável em BFCs, devido a sua baixa toxicidade e propriedades físico-químicas favoráveis, apresentando também uma alta densidade de energia.³⁹ Ressalta-se ainda que o etanol é considerado um combustível alternativo por estar amplamente disponível, uma vez que pode ser produzido em grandes quantidades através da fermentação de produtos agrícolas por microrganismos.⁴⁰

A fermentação alcoólica envolve 12 reações enzimáticas em sequência ordenada, as quais ocorrem no citoplasma celular da levedura. As enzimas presentes nessas reações sofrem ações de diversos fatores, dentre eles, os nutrientes, vitaminas, minerais, inibidores, pH, temperatura, podendo favorecer ou não o desempenho das leveduras, uma vez que a reprodução dos microrganismos varia em função de todos esses fatores.³⁸

As leveduras da espécie *S. cerevisiae*, são organismos eucariontes facilmente cultiváveis e acessíveis a todos os métodos da genética clássica e molecular. Possuem genoma completamente sequenciado e, ainda, baixo custo associado à manutenção e crescimento dos

microrganismos comparado a outros modelos biológicos eucariotas. Devido a isso, são considerados como modelo ideal para investigações biotecnológicas e estudos bioquímicos. Além disso, as leveduras em geral, possuem rápido crescimento, com um tempo médio de divisão de aproximadamente 90 minutos em meio líquido, sendo capazes de crescer e se desenvolver em condições muito variáveis.^{41,42}

A vantagem de usar *S. cerevisiae* como biocatalisador é a sua capacidade de operar em condições aeróbicas e anaeróbicas. Esta levedura é um microrganismo aeróbio facultativo, portanto, na presença de oxigênio, a mesma transforma glicose em biomassa, CO₂ e H₂O. E na ausência de oxigênio, a maior parte da glicose é convertida em etanol e CO₂. Isso ocorre devido ao objetivo de obter ATP (adenosina trifosfato) para realização de suas atividades metabólicas, ou seja, conseguir energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol somente um subproduto desse processo. E ainda, a *S. cerevisiae* é uma levedura mesofílica, sendo a temperatura ótima de crescimento deste microrganismo compreendida entre 20 °C e 40 °C.

Nos estudos bioeletroquímicos o grande desafio é estabelecer uma melhor comunicação entre o transporte de elétrons com o microrganismo e a superfície do eletrodo. Apesar dos dispositivos microbiológicos alcançarem uma alta eficiência em termos de conversão de energia, ainda há muitos problemas associados a esta abordagem. As camadas externas dos microrganismos, em sua grande maioria, são basicamente compostas por membranas lipídicas de baixa condutividade, que dificultam o processo de transferência eletrônica diretamente com a superfície de um eletrodo. As células eucarióticas, como no caso da *S. cerevisiae*, são organizadas em uma rede complexa de membranas e compartimentos, que são especializadas para desempenhar diversas funções biológicas.⁴³ Dessa forma, a transferência de elétrons através da membrana deste microrganismo leva a um lento fluxo de íons e, conseqüentemente, produz baixos níveis de energia.⁴⁴

Uma das estratégias que pode ser adotada nesse caso é a utilização de microrganismos com enzimas para serem empregados como “biocatalisadores cooperativos”. Em um trabalho realizado por Fishilevich e colaboradores,⁴⁵ foi demonstrada uma BFC contendo *S. cerevisiae* exibindo a presença de enzimas redox imobilizadas em sua superfície, os quais foram usados como biocatalisadores para a oxidação de glicose. A enzima glicose oxidase (GOx) utilizada no estudo, é uma flavoenzima homodimérica, que apresenta peso molecular aparente de 160 kDa.⁴⁶ No compartimento anódico da biocélula estavam presentes, portanto, as células de levedura com GOx em sua superfície externa, o mediador redox azul de metileno (MB) e

glicose, a qual foi usada como combustível sob condições anaeróbicas. O compartimento catódico foi constituído por uma solução tampão de acetato contendo a enzima Lc obtida de *Trametes versicolor*, enzima redutora de oxigênio, e ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) usado como mediador redox. Os autores citam que a GOx é uma enzima redox altamente eficiente quando a mesma se encontra depositada na superfície da *S. cerevisiae*, uma vez que os valores de densidade de potência obtidos com a combinação de *S. cerevisiae* e GOx foram muito maiores ($13,6 \text{ mW m}^{-2}$) quando comparados com os obtidos apenas para a GOx purificada ou para as leveduras na ausência da enzima (cerca de 7 mW m^{-2}). Apesar disso, as BFCs enzimáticas sofrem uma desvantagem muito grande em relação ao funcionamento a longo prazo, devido à oxidação incompleta do substrato e perda de atividade enzimática devido ao curto tempo de vida e à estabilidade limitada. Dessa forma, um sistema conjugado na presença de enzimas e microrganismos apresenta características importantes, sendo uma nova abordagem no desenvolvimento de BFCs, como será demonstrado aqui nesse trabalho.

1.3 Biocélula a combustível enzimática

As enzimas são catalisadores excepcionais devido a alta especificidade destas com o substrato de interesse, e também devido ao menor tamanho dessas biomoléculas comparadas ao tamanho de células inteiras e organelas. Por esse motivo, as enzimas têm sido muito exploradas em estudos de bioeletroquímica, principalmente na preparação de bioeletrodos para BFCs, com o intuito de usufruir da grande especificidade em reações químicas desses materiais biológicos na superfície de um eletrodo. O desenvolvimento de dispositivos que se baseiam na imobilização de proteínas em superfícies sólidas é cada vez mais alvo de muitos grupos de pesquisa.^{4,40,47-49} O mecanismo no qual se fundamenta a obtenção de corrente elétrica por meio de reações catalisadas por enzimas, é intrinsicamente relacionado à ocorrência de reações bioeletroquímicas na superfície de um eletrodo e consequente aproveitamento dos elétrons gerados nas reações de oxidação catalisadas por enzimas.

As enzimas são conhecidas como catalisadores biológicos e sua atividade catalítica é dependente, de uma forma geral, da integridade da estrutura proteica do seu sítio catalítico. Apesar de serem catalisadores extremamente específicos e eficientes, possuem um tempo de vida bastante limitado quando se encontram em solução, por esta razão, sua utilização em estudos de bioeletroquímica para aplicações em BFCs requer uma etapa crucial, na qual essas

biomoléculas precisam ser imobilizadas na superfície do eletrodo, tendo em vista uma máxima eficiência na transferência de elétrons entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, como já discutido anteriormente.⁵⁰

Algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico, além de seus resíduos de aminoácidos. Outras podem apresentar um componente químico adicional chamado de cofator enzimático na estrutura proteica, sendo esse caracterizado pela presença de um ou mais íons inorgânicos, tal como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} , uma molécula orgânica complexa ou ainda uma molécula metalorgânica chamada de coenzima. As coenzimas se caracterizam por se ligarem fracamente, ou seja, estas não se mantêm ligadas permanentemente ao sítio ativo da enzima. As principais espécies orgânicas que atuam como coenzima de várias enzimas são a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+).

Como as enzimas são responsáveis pela catálise específica de uma substância química, elas são classificadas de acordo o tipo de reação a ser catalisada, ou seja, o combustível de interesse. Dentro das classes de enzimas, destacam-se as enzimas oxidorredutases as quais catalisam a transferência de elétrons de uma molécula para outra em uma reação redox. As enzimas desidrogenases e oxidases pertencentes à classe das oxidorredutases, são responsáveis pela oxidação de substratos específicos, além de serem amplamente utilizadas como catalisadores biológicos em bioeletrodos de BFCs.¹⁶

Destaque será dado nessa tese ao desenvolvimento de um bioânodo na presença da enzima álcool desidrogenase (ADH). Portanto nos tópicos seguintes serão abordados temas relacionados às principais características desta enzima, bem como seu mecanismo cinético. Além do interesse em bioânodos, a reação catódica também é muito importante no desenvolvimento de uma BFC, pois pode aumentar significativamente o potencial elétrico e a corrente nesses dispositivos. Assim, buscam-se metodologias cada vez mais eficientes no desenvolvimento de cátodos biológicos.

1.3.1 Enzima bilirrubina oxidase (BOx)

As enzimas mais utilizadas como bioeletrocatalisadores no cátodo são aquelas pertencentes à família das multicobre oxidases (MCOs), como a ascorbato oxidase, lacase e bilirrubina oxidase (BOx), sendo as duas últimas amplamente discutidas em trabalhos na literatura relacionados ao desenvolvimento de biocátodos para reduzir oxigênio na superfície

do eletrodo.⁵¹⁻⁵⁶ Considera-se o estudo de reações catalisadas por essas proteínas de extrema importância já que as mesmas desempenham papel essencial no desenvolvimento de BFCs.

A BOx foi descoberta em 1981 pelos pesquisadores Tanaka e Murao, sendo isolada a partir do fungo *Myrothecium verrucaria* MT-1.⁵⁷ Atualmente, essa enzima tem sido uma alternativa vantajosa na utilização como biocatalisador catódico, pois, além de ser uma enzima atrativa para a bioeletroredução de O₂ em BFCs, também exibe uma alta atividade catalítica em meios neutros, não produz intermediários oxigenados tóxicos e apresenta boa estabilidade quando comparada com outras enzimas de sua classe.^{24,56} Ressalta-se ainda, que a BOx não tem sua atividade inibida na presença de íons cloreto, como acontece no caso da enzima Lc quando é utilizada em medidas eletroquímicas de redução de oxigênio.^{52,58}

A BOx (EC 1.3.3.5) proveniente do fungo *Myrothecium verrucaria* é uma enzima monomérica glicosilada, com 534 resíduos de aminoácidos e quatro átomos de cobre, cujo peso molecular varia entre 52 e 68 kDa.⁵⁹ O sítio catalítico da BOx é composto por um arranjo de quatro íons Cu²⁺, denominados de Cu Tipo 1, Cu Tipo 2 e Cu Tipo 3, sendo este último composto por 2 íons Cu²⁺. O cobre T1 também é conhecido como cobre azul devido a banda de absorção que este apresenta em aproximadamente 600 nm resultante da transferência de carga entre o átomo de enxofre presente na cisteína e o átomo de cobre. Já o cobre T2, denominado de cobre “normal” é tipicamente coordenado por resíduos de histidina. E o Cu T3 é um complexo binuclear que apresenta uma ponte de ligação hidróxido entre os dois átomos de cobre.

Além disso, os cobres T2 e T3 formam um cluster trinuclear que se mantém localizado no interior da estrutura proteica e próximo ao Cu T1, átomo de cobre periférico, o qual se encontra próximo a superfície da enzima.⁶⁰ A Figura 2 mostra a estrutura da BOx apresentando os quatro átomos de cobre em seu interior, os quais são responsáveis pela redução biocatalítica de oxigênio.

Figura 2 - Representação da estrutura da enzima BOx (PDB: 2XLL). Em destaque tem-se o sítio ativo da enzima com o átomo de cobre T1 juntamente com os átomos de cobre do cluster trinuclear T2/T3.

Fonte: Autoria própria. A imagem da enzima BOx foi obtida pelo banco de dados de proteínas.

O átomo de Cu T1 está diretamente conectado ao cluster T2/T3 por uma sequência de três resíduos de aminoácidos, constituída por duas histidinas e uma cisteína, proporcionando assim, uma rápida rota na transferência de elétrons entre os átomos de cobre e portanto, apresentam importante desempenho no potencial de redução de oxigênio molecular.

A reação de redução de oxigênio (RRO) pode apresentar várias etapas elementares.⁶¹ No entanto, a utilização da enzima BOx como biocatalisador permite a catálise da redução de oxigênio à água por um mecanismo de transferência direta de quatro elétrons.⁶² O cobre T1 atua como imediato acceptor de elétrons, e em seguida, os elétrons são transferidos um a um ao cluster de Cu T2/T3. Na presença de O₂, os elétrons transferidos ao cluster são utilizados na redução de O₂ à água, como descrito na Equação 9.⁵⁸

Além disso, o comportamento eletroquímico dos centros redox dessa enzima já tem disso amplamente discutido na literatura. Sabe-se que o potencial de redução do Cu T1 varia entre 0,600 e 0,720 V *versus* eletrodo padrão de hidrogênio (SHE) em pH 7,0 e que o potencial de redução do cluster Cu T2/T3 é entre 0,38 e 0,39 V (vs. SHE, pH 7,0).^{55,63,64}

1.3.2 Enzima álcool desidrogenase (ADH)

A enzima ADH (EC 1.1.1.1) pertence à família das enzimas oxirredutases, sendo a função fisiológica dessa enzima catalisar a oxidação reversível de álcoois primários e secundários em aldeídos e cetonas, respectivamente.⁶⁵ A ADH possui maior estabilidade e especificidade com o etanol quando obtida da levedura *S. cerevisiae*, sendo esta enzima proveniente da levedura purificada e cristalizada pela primeira vez por Negelein e Wulff em 1937.⁶⁶ Embora a ADH possa reagir da mesma forma com outros álcoois alifáticos, isso ocorre com menor afinidade, sendo esta proporcional ao número de carbonos. Sua massa molecular corresponde a aproximadamente 150 kDa e sua estrutura é tetramérica composta por quatro subunidades idênticas, contendo NAD^+ como coenzima e um átomo de zinco como cofator metálico em cada uma das subunidades da enzima,^{67,68} sendo estes dois componentes essenciais para o mecanismo de catálise enzimática. A Figura 3 mostra a estrutura da enzima ADH e a estrutura molecular da coenzima NAD^+ que se encontra presente no interior de sua estrutura proteica.

Figura 3 - Representação da estrutura da enzima ADH (PDB: 4W6Z) (a) e de sua coenzima NAD^+ (b).

Fonte: Autoria própria. A imagem da enzima ADH foi obtida pelo banco de dados de proteínas.

A estrutura primária da ADH consiste em um tetrâmero composto por quatro subunidades, tendo cada uma massa molecular de 36 kDa. A Figura 4 ilustra a estrutura tetramérica da enzima com suas respectivas subunidades e sítios de ligação. Cada subunidade da enzima é dividida em dois domínios, o sítio catalítico e o sítio de ligação do NAD^+ . Os domínios são separados por uma fenda que contém uma cavidade profunda a qual acomoda o substrato, mais a parte correspondente ao anel nicotinamida da coenzima. O átomo de zinco presente na enzima é firmemente ligado pela presença de três aminoácidos: Cis43, Cis153 e His66 e estabiliza a estrutura da enzima promovendo o posicionamento do grupo hidroxila do etanol para que ocorra a transferência de hidreto. Com relação ao NAD^+ , o anel de ligação da adenosina fica bastante acessível à solução, enquanto o anel de nicotinamida permanece no centro da molécula em uma cavidade profunda da proteína e se mantém na posição correta pela presença de ligações de hidrogênio entre o mesmo e os aminoácidos Val295 e Val319.^{69,70}

Figura 4 - Representação da estrutura tetramérica da enzima ADH com destaque em seu sítio ativo.

Fonte: Adaptação de Pagnoncelli, K. C. (2017) a partir de Klinman, J. P., 1981, p. 39-78.

Para que ocorra a transferência de hidreto é preciso, portanto, que o etanol, substrato utilizado neste caso, esteja em uma parte da enzima que não seja acessível à solução, ou seja, no sítio ativo, onde a solução não interferirá na catálise enzimática.⁷¹ Além disso, é necessário que o sítio ativo da enzima esteja ligado a uma molécula de substrato e a uma molécula de NAD^+ . Com isso, o etanol se liga ao zinco e é posicionado próximo ao NAD^+ . Assim, ocorrerá a reação representada pela Equação 10. O NAD^+ é um agente oxidante obrigatório na reação catalisada pela enzima ADH. O produto NADH dissocia-se da enzima para sua eventual reoxidação a NAD^+ em uma reação enzimática independente.

A reação acima é reversível e o equilíbrio tende a deslocar para a esquerda em $\text{pH} < 7$.^{71,72}

Embora possamos considerar a Eq. 10 como a reação global de oxidação de etanol catalisada pela enzima ADH, vale ressaltar que algumas abordagens mais sofisticadas relacionadas ao mecanismo cinético da ADH têm sido demonstradas em vários estudos da literatura. No tópico seguinte será abordado o mecanismo cinético da ADH e as reações que ocorrem em cada etapa.

1.3.2.1 Mecanismo cinético da ADH

O mecanismo cinético da enzima ADH foi descrito em diversos trabalhos,^{69,71,73-79} nos quais alguns autores sugerem que a ADH segue um mecanismo ordenado em estado-estacionário, tipicamente denominado de mecanismo ordenado Bi-Bi, conforme ilustrado na Figura 5. As reações de álcool- NAD^+ indicam que durante seu mecanismo podem ocorrer dissociações da coenzima pelo complexo ternário ativo enzima- NAD^+ -álcool. Dessa forma, o mecanismo proposto sugere que a coenzima NAD^+ se liga primeiro à enzima (ADH-NAD^+), com subsequente ligação ao substrato (ADH-etanol), formando assim um complexo ternário (ADH-NAD^+ -etanol). Após uma reação intra-molecular, forma-se então o complexo $\text{ADH-NADH-acetaldeído}$. A etapa limitante da velocidade de oxidação do etanol é a dissociação do produto, ou seja, a dissociação de NADH do complexo ADH-NADH (k_7). Assim, a coenzima NAD^+ se dissocia muito mais rápido do complexo ADH-NAD^+ (k_2) em comparação a dissociação da espécie NADH do complexo ADH-NADH ($\text{ADH-NADH} \rightleftharpoons \text{ADH} +$

NADH).⁷⁹ Van Eys e colaboradores,⁸⁰ citam ainda que a regeneração do complexo enzima-NADH é acompanhada por uma competição direta entre NAD^+ e NADH pelo sítio ativo da enzima.

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo cinético para a enzima ADH. Trata-se de uma releitura do mecanismo inicialmente proposto por Dickenson e Dickinson [74], em que os autores reportaram a cinética de oxidação de etanol por NAD^+ e a redução de acetaldeído e butiraldeído por NADH, catalisadas pela ADH.

Fonte: Adaptação de Pagnoncelli, K. C. (2017) a partir de Dickenson, C. J.; Dickinson, F. M., 1975, p. 307 e Pereira, A. R., de Souza, J. C. P., Gonçalves, A. D., Pagnoncelli, K. C., Crespilho, F. N., 2017, p. 1703.

Em termos de análise cinética, considera-se nesse mecanismo a coenzima NAD^+ como um co-substrato. As energias de ligação para cada etapa que ocorre entre o NAD^+ e a enzima livre ($\text{ADH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{ADH-NAD}^+$) podem ser calculadas a partir da constante de equilíbrio k_1/k_2 . No caso da dissociação de NADH, as energias de ligação podem ser calculadas de acordo com a constante de equilíbrio k_8/k_7 (Figura 5).

Por fim, as razões de constantes de velocidade k_1/k_2 e k_8/k_7 podem ser identificadas com a constante de associação de equilíbrio para a ligação de NAD^+ ou NADH à enzima livre, respectivamente.⁷² Se a dissociação de NADH do complexo ADH-NADH é a etapa limitante (k_7), pode-se considerar que a oxidação de NADH liberada pela reação pode ser utilizada para calcular parâmetros cinéticos a partir de dados de estado estacionário eletroquímico.

1.4 Características e aplicações das fibras flexíveis de carbono (FFC)

O uso de enzimas e microrganismos em uma BFC requer a compreensão de alguns conceitos importantes, como avaliar a conversão de energia e o desempenho de muitos tipos de configurações de eletrodos. É inquestionável a importância do estudo de novas plataformas para o desenvolvimento de bioeletrodos aplicáveis em BFCs. Destaca-se a utilização de materiais de carbono como plataformas para a imobilização enzimática. A utilização de eletrodos derivados de carbono é considerada um passo importante para o desenvolvimento de novos dispositivos eletroquímicos, pois estes proporcionam uma maior transferência de carga no sistema. Alguns trabalhos da literatura reportam o desenvolvimento de matrizes porosas de carbono para aumentar a densidade de corrente por área e a voltagem das BFCs.^{81,82} A estratégia adotada foi a utilização de eletrodos de carbono com altas áreas disponíveis para a reação, para que assim uma grande quantidade de enzima fosse imobilizada na superfície dos eletrodos.

Ressalta-se aqui a importância da utilização das fibras flexíveis de carbono (FFC), uma vez que os materiais a base de carbono vêm sendo amplamente empregados em estudos eletroquímicos devido às suas propriedades físico-químicas. Estas incluem alta condutividade elétrica, resistência à corrosão, baixa densidade e elasticidade, podendo ainda ser encontrados materiais com alto grau de pureza.⁸³ As FFC apresentam características únicas que fazem destas materiais com ampla aplicação, as quais compreendem alta flexibilidade, resistência mecânica e elasticidade, e ainda alta condutividade elétrica/térmica.^{84,85}

A modificação da superfície das fibras de carbono é de extrema importância para processos de adesão,⁸⁶ adsorção,⁸⁷ molhabilidade⁸⁸ e, principalmente, em processos eletroquímicos,⁸⁹ pois estes ocorrem exclusivamente na interface. Para promover a alteração das propriedades da região interfacial, as FFC são submetidas a tratamentos de superfície, os

quais podem ser feitos por métodos químicos,⁹⁰ oxidação eletroquímica⁹¹ e ainda com a utilização de plasma.⁹²

1.5 Bioeletrodo cooperativo composto por ADH e *Saccharomyces cerevisiae*

A incorporação de enzimas sobre a superfície de eletrodos se tornou uma alternativa atraente na concepção de dispositivos de conversão de energia,^{34,93,94} contudo, apesar das características promissoras no caso das BFCs, ainda é preciso estabelecer sistemas que possam produzir e regenerar eletroquimicamente os compostos envolvidos a fim de alcançar um bioeletrodo eficiente. Dessa maneira busca-se a obtenção de sistemas que possam fornecer maiores valores de densidade de potência, tendo em vista a oxidação completa do combustível de interesse e a formação de um produto pela catálise enzimática economicamente viável e termodinamicamente mais favorável. Além disso, há cada vez mais a necessidade de trabalhos que contribuam com fontes mais completas de informações relacionadas ao desenvolvimento de BFCs, principalmente no que tange a aplicação de produtos renováveis oriundo da biomassa brasileira para conversão de energia.

Neste contexto, será demonstrado aqui, o desenvolvimento de eletrodos compostos por fibras flexíveis de carbono modificadas com a enzima ADH, sendo posteriormente utilizados em um meio contendo *S. cerevisiae* para aplicação como biocatalisadores cooperativos na oxidação indireta de glicose via rota etanólica. Busca-se avaliar o comportamento bioeletroquímico de um sistema composto por enzima e microrganismos, uma vez que esta nova integração pode levar a construção de sistemas compostos por bioeletrodos cooperativos bifuncionais. Será avaliada a cooperação entre os biocatalisadores para demonstrar a atividade catalítica da ADH a partir da oxidação etanol, o qual será produzido pela fermentação da *S. cerevisiae* em condições anaeróbias utilizando glicose como substrato para os microrganismos. A glicose será oxidada pela *S. cerevisiae* e o etanol será produzido, sendo este um produto final da fermentação alcoólica, que compreende a etapa da glicólise, reação esta que ocorre no citosol das células de levedura. Ao mesmo tempo, a enzima ADH irá catalisar a conversão de etanol a acetaldeído, em que a reação de oxidação do etanol para acetaldeído ocorre conjuntamente com a redução do NAD^+ para NADH (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do sistema biocooperativo com ADH (PDB: 4W6Z) e *Saccharomyces cerevisiae*. Detalhes da enzima: a coenzima NAD^+ e o átomo de zinco próximo aos resíduos de aminoácidos, Cis43, Cis153 e His66.

Fonte: Autoria própria. A imagem da enzima ADH foi obtida pelo banco de dados de proteínas.

Assim, pretende-se introduzir com esse estudo um novo conceito de que enzimas e microrganismos podem trabalhar em conjunto cooperativamente para produzir uma nova classe de bioeletrodos.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo desenvolver um eletrodo composto por FFC modificadas com a enzima ADH aplicável como bioânodo em um meio contendo *Saccharomyces cerevisiae*. E também, demonstrar o desempenho bioeletroquímico desse novo sistema com enzima e microrganismos operando cooperativamente para aplicação como biocatalisadores na bioprodução e oxidação de etanol. Objetivou-se, ainda, a obtenção de uma BFC cooperativa de glicose-etanol/O₂ operando com o bioânodo cooperativo e biocátodo de difusão de gás contendo a enzima BOx.

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A metodologia experimental foi dividida em nove partes. Serão apresentados os materiais e reagentes utilizados e o procedimento de limpeza das vidrarias. Em seguida, será descrita a preparação dos eletrodos, bem como o tratamento químico feito na superfície dos eletrodos a fim de melhorar as propriedades desses materiais. Após isso, tem-se descrito o procedimento de obtenção dos bioeletrodos na presença da enzima ADH imobilizada na superfície do eletrodo. E ainda, a obtenção do bioeletrodo de difusão de gás baseado em BOx. Por fim, nos últimos tópicos, será apresentada uma breve descrição abordando sobre a técnica de espectroscopia no UV-VIS, a qual foi utilizada na quantificação de ADH adsorvida nas fibras após o processo de imobilização enzimática. Serão discutidas também, as características do sistema e as técnicas eletroquímicas utilizadas durante a execução de todas as etapas experimentais, e ainda, condições e preparo das amostras usadas na análise da morfologia da superfície dos eletrodos. Tem-se, por fim, descrito nos últimos tópicos, as condições operacionais utilizadas para determinação e quantificação cromatográfica de etanol, e as características da biocélula, denominada aqui de BFC cooperativa de glicose-etanol/O₂.

3.1 Materiais e reagentes

O fermento biológico da marca Fleischmann[®] (*Saccharomyces cerevisiae*) foi obtido comercialmente. A enzima ADH, proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (EC 1.1.1.1, ≥ 300 U mg⁻¹) utilizada sem purificação prévia, etanol (absoluto extra puro), isopropanol (99,9%), solução de náfon[®] 117 (5%), solução de glutaraldeído (25%) e hidróxido de sódio (micropérolas) foram obtidos da Sigma-Aldrich[®]. A enzima BOx, proveniente do microrganismo *Myrothecium sp.* (EC 1.3.3.5, $\geq 1,2$ U mg⁻¹), também utilizada sem prévia purificação, foi adquirida da empresa Amano Enzyme, Inc. A dispersão de politetrafluoretileno - PTFE (Teflon[®] T-30, 60%) foi adquirida pela empresa DuPont[™] e o pó de carbono (Vulcan[®] VC-72) pela empresa Cabot. O tecido de carbono (PWB-3) foi obtido da empresa Stackpole Electronics, Inc. Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) foi obtida da Merck e os sais fosfato de sódio mono e bibásico utilizados na preparação das soluções de tampão fosfato, D-glicose anidra (Dextrose) P. A., ácido sulfúrico P. A., ácido clorídrico P. A. e permanganato de potássio P. A. foram adquiridos da Synth[®].

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e as vidrarias utilizadas no preparo de soluções e em cada etapa experimental foram previamente limpas com solução de permanganato de potássio (KMnO_4) e posteriormente com uma solução ácida ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$) (1:1:5).

A seguir será demonstrado um fluxograma para exemplificar algumas das etapas envolvidas na metodologia, as quais foram descritas anteriormente e que serão detalhadas nos tópicos seguintes, conforme representado esquematicamente na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma com as etapas de obtenção dos bioeletrodos e as técnicas utilizadas no desenvolvimento do trabalho, estudos eletroquímicos e de caracterização.

Fonte: Autoria própria.

3.2 Preparo dos eletrodos

3.2.1 Tratamento das fibras flexíveis de carbono

Para o preparo dos eletrodos, foram utilizadas fibras flexíveis de carbono, as quais são altamente flexíveis. Antes de serem utilizadas é necessário fazer um tratamento químico nas mesmas, a fim de esfoliar a superfície das fibras facilitando assim a adsorção da enzima e melhorar a interação entre a enzima e a superfície do eletrodo, uma vez que a eficiência da transferência de elétrons é um parâmetro importante a ser considerado nesses sistemas. Dessa maneira, as FFC retiradas de um tecido de carbono (CCS 200), foram submetidas a um tratamento de oxidação em uma solução contendo H_2SO_4 e KMnO_4 . Foram, portanto, adicionadas a uma mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (120 mL), a qual foi preparada pela dissolução de 464 mg de KMnO_4 em H_2SO_4 mol L^{-1} (1,0 mol L^{-1}). O sistema foi mantido em ultrassom durante 3 horas. Após isso, as fibras foram lavadas com HCl (37%) com o intuito de remover o MnO_2 formado e, em seguida, lavadas com água destilada, até que todo o ácido fosse removido com o pH da água de lavagem próximo do neutro. Por fim, foram secas à temperatura ambiente.⁹⁵ Após o tratamento das fibras, foram preparados os bioeletrodos na presença da enzima ADH, os quais serão utilizados como eletrodo de trabalho.

3.2.2 Bioeletrodo FFC-ADH

Antes da adsorção da enzima, as fibras flexíveis de carbono foram submetidas a um tratamento químico como descrito anteriormente. Posteriormente, os bioeletrodos FFC-ADH foram preparados pela adsorção física da enzima.^{8,95} A área da fibra foi delimitada com o auxílio de resina epóxi. Após a secagem desta, as FFC foram colocadas em contato com a solução de ADH (8,0 mg mL^{-1}) preparada em tampão fosfato de sódio 0,10 mol L^{-1} (pH 7,5) e permaneceram nesta durante 24 horas a 4 °C. Após a adsorção da enzima, os eletrodos foram retirados da solução, e então, adicionou-se 20 μL de uma solução de náfon 2,5% (previamente preparada em tampão fosfato de sódio) sobre as fibras contendo ADH. Em seguida, as mesmas foram secas a vácuo durante 10 minutos. A Figura 8 mostra o processo de imobilização da ADH nas FFC e a estrutura molecular do polímero náfon. Vale ressaltar que a camada polimérica de náfon impede a lixiviação da enzima durante os experimentos eletroquímicos,^{8,96} o que melhora a estabilidade do bioeletrodo, permitindo, portanto a troca de carga entre enzima e eletrodo mesmo na presença desse revestimento.

a)

3.3 Bioeletrodo de difusão de gás

42

Assim, para a camada catalítica, utilizou-se $2,3 \text{ mg cm}^{-2}$ de FFC em pó, as quais foram previamente lavadas com isopropanol e água deionizada. Em seguida, foram secas sob vácuo à temperatura ambiente, e por fim, maceradas originando um pó constituído por segmentos de fibra de carbono com comprimento médio de $75 \text{ }\mu\text{m}$ e diâmetro de $6,5 \text{ }\mu\text{m}$. Esse pó constituído por fibras foi então suspenso em isopropanol e aplicado sobre a camada de difusão. Após a evaporação do isopropanol por aproximadamente 3 horas em atmosfera e temperatura ambientes, imobilizou-se a enzima BOx por adsorção física sobre as fibras. Para isto, $36,3 \text{ }\mu\text{L}$ de uma mistura em gel contendo $1,7 \text{ mg}$ de BOx, $0,8\%$ (v/v) de náfon[®] e $0,8\%$ (v/v) de glutaraldeído preparados em tampão fosfato de sódio a pH 7,5 ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) foram depositados em uma área de $1,18 \text{ cm}^2$, correspondente a área geométrica do eletrodo exposta ao eletrólito. Ressalta-se que o glutaraldeído foi utilizado com o intuito de realizar o “*cross-linking*” com as moléculas de BOx.⁹⁸

Antes de sua utilização, o gel preparado foi mantido a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 3 horas e posteriormente, após a aplicação deste, o bioeletrodo foi mantido a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite. A quantidade final de BOx depositada na superfície do eletrodo foi de $1,4 \text{ mg cm}^{-2}$. O contato elétrico dos eletrodos foi feito com um arranjo de FFC, sendo fixado a uma face do tecido de carbono com o auxílio de resina epóxi. Vale ressaltar que o bioeletrodo desenvolvido recentemente em nosso grupo de pesquisa foi fornecido por G. C. Sedenho e F. N. Crespilho, para que fosse possível dar continuidade aos estudos eletroquímicos visando a aplicação em uma biocélula a combustível.

3.4 Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS

A espectroscopia no UV-VIS foi empregada para quantificar a ADH adsorvida nas FFC, as quais são utilizadas como eletrodo de trabalho. Obtiveram-se os espectros eletrônicos das soluções contendo ADH ($1,6 \text{ mg mL}^{-1}$) em tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5). Os experimentos foram realizados com o auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS/NIR (Jasco/V-670), que se encontra no laboratório do nosso grupo de pesquisa. Utilizou-se uma microcubeta de quartzo com caminho óptico de $1,0 \text{ cm}$, em um intervalo de comprimento de onda de 250 a 600 nm .

3.5 Estudo eletroquímico

Nos experimentos eletroquímicos utilizou-se uma cela eletroquímica convencional, contendo 20 mL de solução eletrolítica, em um sistema de três eletrodos acoplada a um Potenciostato/Galvanostato μ Autolab III. Utilizou-se fibras flexíveis de carbono como eletrodo de trabalho, platina como contra eletrodo e prata/cloreto de prata saturado ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$) como eletrodo de referência. Todas as soluções utilizadas foram preparadas em tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Antes de realizar os experimentos, o oxigênio contido no interior da cela foi removido pelo fluxo de gás nitrogênio ($\text{N}_2 \geq 99,0\%$) após o borbulhamento desse gás durante 10 minutos na solução. A atividade catalítica da ADH no bioeletrodo FFC-ADH-náfion foi avaliada por voltametria cíclica e cronoamperometria. Nos estudos para verificar a influência da temperatura e do pH na bioeletrocatalise do etanol pela ADH, foram obtidos voltamogramas cíclicos nos intervalos de 10 a 60 °C e de 6,0 a 9,0 para a temperatura e pH, respectivamente. Durante os experimentos a temperatura do eletrólito foi controlada utilizando-se um banho termostático de alta resolução ($0,10 \text{ }^\circ\text{C}$) proveniente da GE Healthcare Life Science (MultiTemp IV Thermostatic Circulator) e o ajuste de pH quando necessário, foi feito com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$).

3.6 Cromatografia gasosa

3.6.1 Determinação e quantificação de etanol

A determinação e quantificação de etanol foram realizadas por cromatografia gasosa (CG), utilizando-se um cromatógrafo gasoso GC-2010 Plus modelo Shimadzu, associado a um detector de ionização de chama (FID) e equipado com uma coluna Agilent®-Innovax (polietilenoglicol), 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno (ID) e 0,25 μm de espessura de fase estacionária. A temperatura do detector, injetor e da coluna foi fixada em 200 °C. A rampa de aquecimento teve início com 35 °C de temperatura inicial por 2 minutos, aumentando 10 °C por minuto até a temperatura final de 200 °C e permanecendo nessa temperatura por 10 minutos. Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste com um fluxo de $1,83 \text{ mL min}^{-1}$, trabalhando com *split* na razão de 1:30. O equipamento cromatográfico utilizado encontra-se localizado na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP). Nenhum tratamento prévio foi efetuado na amostra, e optou-se trabalhar com injeção direta com o auxílio de uma microseringa, sendo o volume injetado de

1,0 μL de amostra. As alíquotas submetidas à análise cromatográfica foram retiradas de uma solução contendo glicose, NAD^+ e levedura adicionadas em eppendorfs, em seguida foram centrifugadas em uma Centrífuga Eppendorf (5804 R) a 25 °C e 5000 rpm por 20 minutos. Posteriormente, o sobrenadante retirado das amostras foi separado e mantido sob refrigeração a aproximadamente -15 °C até o momento de análise.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura

Os eletrodos de FFC utilizados nos experimentos eletroquímicos permaneceram imersos na solução durante os experimentos e em seguida, foram retirados da solução, lavados cuidadosamente com água deionizada e secos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras de FFC contendo ADH e levedura adsorvidas foram recobertas com uma fina película de ouro (6 nm) em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara: $2,0 \cdot 10^{-2}$ mbar; corrente: 60 mA e taxa de deposição: $0,60 \text{ nm s}^{-1}$. As fotomicrografias de MEV foram obtidas na CAQI/IQSC/USP em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector Oxford (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV e corrente de 2,82 A.

3.8 Configuração da biocélula a combustível de glicose-etanol/ O_2

O desempenho da biocélula foi avaliado em uma cela eletroquímica convencional do tipo H (Pine Research Instrumentation, Inc.). Os compartimentos da cela continham 27 mL de solução eletrolítica os quais se mantiveram separados por um disco de vidro (*glass frit*) com poros de 4 a 8 μm , diâmetro de 20 mm e espessura de 3,5 mm. Este separador considerado como uma ponte salina permite a transferência de íons entre o compartimento anódico e catódico enquanto mantém a separação das moléculas de combustível que são reduzidas no ânodo e das moléculas oxidadas no cátodo. Isto faz com que seja mantido o equilíbrio de carga além de evitar que ocorra a mistura das duas soluções com consequente *crossover*, ou seja, reação cruzada. Além disso, o separador usado faz com que os microrganismos presentes em suspensão sejam mantidos apenas no compartimento anódico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados referentes ao bioeletrodo cooperativo. Primeiramente, antes dos estudos eletroquímicos, quantificou-se a quantidade de ADH adsorvida na superfície do eletrodo. Após isso, verificou-se a influência das fibras e da coenzima NAD^+ no comportamento bioeletrocatalítico de oxidação de etanol pela ADH. Demonstrou-se ainda, como o tratamento químico ao qual as fibras são submetidas influencia na resposta bioeletrocatalítica. Em seguida, foram avaliadas as curvas de variação de corrente com o tempo obtidas para o bioeletrodo FFC-ADH em diversos potenciais. E a partir disso, foi possível calcular a constante de Michaelis-Menten obtida para o sistema. Foi demonstrado o efeito da temperatura e do pH na bioeletrocatalise de etanol utilizando também o bioeletrodo FFC-ADH. Posteriormente, avaliou-se o desempenho do bioeletrodo nas condições ideais definidas nos estudos de temperatura e pH, tanto na ausência quanto na presença da levedura *S. cerevisiae*. Dessa forma, foi também possível demonstrar a dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol, e ainda, o comportamento dos valores de densidade de corrente obtidos comparados com a concentração de etanol produzido com o tempo de fermentação da levedura.

Após os estudos eletroquímicos, avaliou-se a morfologia do bioânodo por MEV. Por fim, demonstrou-se o funcionamento de uma BFC utilizando o bioânodo com ADH e levedura e o biocátodo de difusão de gás baseado em BOx. Vale ressaltar que os estudos de eletroquímica e morfologia do biocátodo também foram avaliados.

4.1 Quantificação da ADH adsorvida nas FFC

Para o estudo eletroquímico utilizou-se o bioeletrodo FFC-ADH como eletrodo de trabalho. No entanto, antes de prosseguir com os experimentos eletroquímicos, quantificou-se a ADH adsorvida nas FFC utilizando a espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS para assim, determinar a quantidade de enzima que se encontra presente no eletrodo.

A Figura 9 mostra os espectros de UV-VIS no intervalo de comprimento de onda de 250 a 600 nm relativos à solução de ADH ($1,6 \text{ mg mL}^{-1}$) antes do processo de adsorção física (linha preta) e após a adsorção de ADH em cada eletrodo (demais linhas). As soluções de ADH foram preparadas em tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5 e as FFC imersas nesta solução foram mantidas durante 24 horas a 4°C como descrito na parte experimental

(tópico 3.2.2). Após a adsorção da ADH, as fibras são retiradas da solução, faz-se a diluição necessária e então, mede-se a absorbância de cada solução.

Figura 9 - Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS da solução de ADH ($1,6 \text{ mg mL}^{-1}$) em tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5 antes do processo de adsorção física da enzima (linha preta) e das soluções de ADH após a imersão das FFC durante 24 horas a 4°C (demais linhas).

Observou-se uma banda de absorção a cerca de 270 nm, a qual é referente ao pico característico das cadeias polipeptídicas com anel aromático presentes na estrutura da proteína, fenilalanina, tirosina e triptofano,⁹⁹⁻¹⁰¹ cujas estruturas estão representadas na Figura 10.

Figura 10 - Representação da ADH (PDB: 4W6Z) com os resíduos de aminoácidos presentes na enzima, tirosina, fenilalanina e triptofano, respectivamente, e a estrutura química de cada aminoácido aromático.

Fonte: Autoria própria. A imagem da enzima ADH foi obtida pelo banco de dados de proteínas (PDB).

Em seguida, a partir da definição da banda característica da enzima, obteve-se a curva de calibração, para posterior quantificação. Utilizou-se soluções de ADH em diferentes concentrações (0,3 a 2,1 mg mL⁻¹) previamente preparadas em tampão fosfato de sódio (0,10 mol L⁻¹) pH 7,5. A Figura 11a corresponde aos espectros eletrônicos da ADH, os quais foram utilizados na construção da curva de calibração (Figura 11b).

Figura 11 - (a) Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS da solução de ADH em tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5 em diferentes concentrações ($0,3$ a $2,1 \text{ mg mL}^{-1}$). (b) Curva de calibração obtida a partir dos espectros da solução de ADH em diferentes concentrações.

A absorvidade da proteína pode ser obtida a partir da curva de calibração, mostrada na Figura 11b. A partir da reta obtida pelo gráfico, tem-se a seguinte equação:

$$y = 1,313 x - 0,0782 \quad (11)$$

Sendo y a absorvância e x a concentração de ADH em g L^{-1} . Pela Lei de Lambert-Beer,¹⁰² sabe-se que $A = \varepsilon bc$, em que ε corresponde a absorvidade do analito, b refere-se ao caminho óptico (cm) e c é a concentração do analito absorvente o qual se relaciona com a

absorbância. Utilizou-se uma microcubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm para as medidas, sendo portanto, a absorvidade calculada de acordo com a Equação 12, em que $b = 1,0$ cm.

$$\varepsilon = \frac{A}{c} \quad (12)$$

Dessa forma, utilizou-se a absorvidade média, a qual corresponde ao coeficiente angular da reta construída pelo gráfico de absorbância *versus* concentração de ADH. A absorvidade obtida para a ADH corresponde a $1,31 \pm 0,01 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Podemos calcular a concentração de cada amostra, considerando então a absorvidade da ADH obtida a partir da curva de calibração.

No entanto, a concentração de enzima adsorvida nas FFC corresponde à diferença entre a concentração da solução de ADH antes da adsorção e após a adsorção. Assim, calculou-se a quantidade de enzima presente em cada eletrodo. Vale ressaltar que a concentração obtida a partir da absorbância medida é relativa à solução diluída, dessa forma, a Tabela 1 contém os dados referentes às soluções iniciais, nas quais as FFC foram imersas. E ainda, têm-se os dados obtidos de enzima adsorvida em concentração (mg mL^{-1}), massa (mg) e a quantidade de ADH adsorvida por área (mg cm^{-2}).

Tabela 1 - Valores obtidos de concentração de ADH, área dos eletrodos de FFC utilizados e quantidade de enzima adsorvida nas FFC.

Amostras	Concentração da solução de ADH* (mg mL^{-1})	Concentração de ADH adsorvida (mg mL^{-1})	Quantidade de ADH adsorvida (mg)	Área das FFC (cm^2)	Quantificação (mg cm^{-2})
FFC 1	1,75	0,13	0,013	0,16	0,41
FFC 2	1,76	0,12	0,012	0,17	0,36
FFC 3	1,77	0,11	0,011	0,18	0,31
FFC 4	1,79	0,10	0,010	0,15	0,31
FFC 5	1,78	0,11	0,011	0,16	0,33
FFC 6	1,74	0,15	0,015	0,15	0,48

*Concentração das soluções de ADH após a imersão das FFC durante 24 horas a 4 °C.

A partir dos dados da Tabela acima, conclui-se que a quantidade de ADH adsorvida nas FFC corresponde a $0,37 \pm 0,07 \text{ mg cm}^{-2}$. Seis amostras ($n = 6$) foram usadas, e para o

cálculo do erro, utilizou-se a distribuição *t-student* com intervalo de confiança de 95%. É possível, ainda, calcular a quantidade de enzima adsorvida em concentração molar. Considerando a massa molecular da ADH correspondente a 150 kDa, uma vez que 1 Da equivale a $1,66 \cdot 10^{-24}$ g, tem-se que a quantidade de ADH nas FFC é de $2,45 \text{ nmol cm}^{-2}$. Os resultados obtidos estão em concordância com outros estudos da literatura com moléculas biológicas. Dentre os quais cita-se, a imobilização da enzima GOx em eletrodo modificado com polipirrol eletrodepositado em dióxido de titânio mesoporoso,¹⁰³ a formação de biofilmes de culturas bacterianas (*Shewanella oneidensis* MR-1 e *Shewanella sp.* MR-4) com riboflavina na superfície de eletrodos de carbono,¹⁰⁴ e a presença das enzimas GOx e xantina oxidase imobilizadas em eletrodos de carbono vítreo modificados com polímeros redox contendo grupos *p*-quinona.¹⁰⁵

4.2 Oxidação de etanol catalisada pela enzima ADH

4.2.1 Influência das FFC e efeito do NAD^+ na bioeletrocatalise de etanol

Primeiramente, verificou-se a influência das FFC e da coenzima NAD^+ utilizadas nos experimentos para avaliar o comportamento bioeletrocatalítico de oxidação de etanol pela enzima ADH. Dessa forma, avaliou-se a oxidação de etanol utilizando o eletrodo de FFC na ausência de enzima, e em seguida, FFC com ADH imobilizada na superfície deste, ou seja, o bioeletrodo FFC-ADH. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos na presença de NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução, sendo este adicionado ao eletrólito antes das medidas eletroquímicas. Como eletrólito suporte foi utilizado tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), o qual foi borbulhado com nitrogênio durante 10 minutos antes de cada medida, a fim de remover o oxigênio dissolvido, e em seguida manteve-se o sistema em atmosfera inerte. Como esperado, observa-se que a catálise ocorre apenas quando é utilizado o bioeletrodo (Figura 12a), e que, portanto, somente com o eletrodo de FFC, o voltamograma não apresenta comportamento de bioeletrocatalise, uma vez que não foi observado aumento de corrente ou um perfil catalítico após a adição de etanol 50% (v/v) no eletrólito suporte (Figura 12b).

Após isso, a fim de verificar a influência do NAD^+ na oxidação de etanol, compararam-se os voltamogramas cíclicos utilizando o bioeletrodo FFC-ADH na ausência e presença de etanol. A Figura 12c mostra que não há aumento na corrente catalítica após a adição de etanol quando o NAD^+ está ausente da solução eletrolítica. Assim, conclui-se, que o

seu uso é indispensável para que ocorra a bioeletrocatalise de etanol pela ADH, uma vez que na reação de oxidação de etanol a acetaldeído, esta coenzima é necessária como aceptora de elétrons, sendo estas condições utilizadas nos experimentos seguintes.

Figura 12 - (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ na ausência de etanol (●) e na presença de etanol (●). (b) Voltamogramas cíclicos do eletrodo FFC contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ na ausência de etanol (●) e na presença de etanol (●). (c) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH sem NAD⁺ no eletrólito, na ausência de etanol (●) e na presença de etanol (●) em atmosfera inerte (N₂). Concentração final de etanol no eletrólito: 0,49 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C.

4.2.2 Influência do tratamento químico das FFC na bioeletrocatalise de etanol

Em seguida, demonstrou-se a influência do tratamento químico feito na superfície das fibras, e como este interfere na resposta bioeletrocatalítica. Foram obtidos os voltamogramas cíclicos após sucessivas adições de etanol, utilizando o bioeletrodo FFC-ADH com a fibra tratada e com a fibra sem tratamento (pristina). A Figura 13 mostra os voltamogramas utilizando as FFC após o tratamento químico e adsorção da ADH (Fig. 13a) e das FFC somente com a enzima adsorvida (Fig. 13b), contendo $0,60 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAD^{+} em solução, na ausência e na presença de etanol 50% (v/v) com sucessivas adições deste ao eletrólito, sendo cada adição de $200 \text{ }\mu\text{L}$ ($0,085 \text{ mol L}^{-1}$). Observou-se um aumento de corrente catalítica a cada adição de etanol, sendo feitas as subseqüentes adições até o momento em que não houvesse aumento nos valores de corrente, sendo os valores máximos de concentração de substrato $0,41 \text{ mol L}^{-1}$ para o bioeletrodo FFC-ADH sem tratamento prévio das fibras, e de $0,92 \text{ mol L}^{-1}$ para o bioeletrodo tratado. Vale ressaltar que o perfil catalítico relacionado ao aumento de corrente corresponde ao processo de oxidação de etanol a acetaldeído pela enzima ADH.^{106–111}

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos dos bioeletrodos FFC-ADH usando a fibra tratada (a) e a fibra pristina (b) com NAD^{+} ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito, na ausência de etanol (linha preta) e após sucessivas adições de etanol em atmosfera inerte (N_2). Concentração inicial e final de etanol no eletrólito: $0,085$ e $0,92 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,5. Temperatura: $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Além disso, o potencial de *onset* para a oxidação de etanol observado nesse experimento corresponde a 0,630 V para a FFC pristina e 0,250 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) para a FFC tratada. Isso significa que o tratamento químico ao qual as FFC são submetidas é essencial para o bom funcionamento do eletrodo, dada a melhora na adsorção enzimática e consequente aumento na resposta bioeletrocatalítica.

Recentes estudos têm mostrado que o tratamento oxidativo pode promover a exfoliação e a formação de grupos C=O na superfície da fibra.¹¹² Vale ressaltar ainda que, o processo eletroquímico de oxidação do NADH é muito similar à oxidação de NADH em eletrodos modificados com grupo quinonas. A modificação da superfície dos eletrodos com quinonas pode melhorar significativamente a eletrooxidação de NADH,^{113–115} melhorando também por consequência o processo bioeletrocatalítico de enzimas NAD-dependente,^{114,116} como é o caso da ADH aqui neste estudo. A Figura 14 mostra os voltamogramas cíclicos utilizando os eletrodos de fibras na ausência de ADH, FFC pristina (Fig. 14a) e FFC após o tratamento oxidativo (Fig. 14b) contendo 0,001 mol L⁻¹ de NADH em solução. A partir dos voltamogramas, é possível observar o processo referente à oxidação de NADH nos dois eletrodos.

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos (a) FFC pristina e (b) FFC tratada, na ausência de NADH (linha preta) e na presença de 0,001 mol L⁻¹ de NADH em solução (linha azul) em atmosfera inerte (N₂). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 25 °C.

Em termos de corrente, quando avaliado o aumento de corrente de oxidação de NADH, este é 8 vezes maior para a FFC tratada (Fig. 14b) quando comparado com o valor de corrente obtido a partir do eletrodo de FFC pristina (Fig. 14a). Além disso, para a FFC pristina, é possível observar um potencial de *onset* de 0,006 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}), enquanto que no caso da FFC tratada esse valor decai para 0,090 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}).

É evidente que a presença de óxidos, devido ao aumento dos grupos carbonila, na superfície da fibra afeta drasticamente a oxidação de NADH. Nota-se ainda que o perfil do voltamograma obtido com a FFC tratada (Fig. 14b) é muito semelhante a oxidação de NADH utilizando eletrodos modificados com grupo quinonas em sua superfície.¹¹⁶ Os resultados sugerem, então, que estruturas semelhantes aos grupamentos quinonas podem estar envolvidas no processo de mediação eletrônica. Contudo, mais estudos ainda são necessários para se afirmar que há a formação de “quinonas específicas”, como é o caso da *o*-quinona, em que este grupo funcional é proposto na literatura como um dos melhores mediadores usado na catálise de reações.¹¹⁴

4.2.3 Bioeletrocatalise de etanol

Como mostrado na Figura 13a, o processo de imobilização enzimática foi eficaz. Assim, após esses estudos, a curva de variação de corrente com o tempo foi obtida para o bioeletrodo FFC-ADH, sob contínua agitação e com sucessivas adições de etanol, sendo cada adição correspondente a 0,085 mol L⁻¹. A Figura 15 mostra a cronoamperometria com FCF-ADH para sucessivas adições de etanol em diferentes potenciais, variando de 0,200 a 0,700 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}) durante 1200 segundos em solução tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,5) contendo 0,60 mmol L⁻¹ de NAD⁺ a 25 °C.

Observa-se que os valores de corrente aumentam acentuadamente com o aumento do potencial, e que após a adição de cada alíquota, houve também um aumento nos valores de corrente de oxidação. No entanto, para calcular os parâmetros cinéticos da enzima é necessário obter uma resposta amperométrica com maior quantidade de adições de substrato até atingir a saturação, visando obter uma curva com estado estacionário bem definido. Portanto, o comportamento do bioeletrodo foi avaliado aplicando-se o potencial 0,700 V, como será mostrado a seguir. Neste caso, o potencial escolhido deve-se ao fato de que com esse valor a corrente alcança um estado quase-estacionário durante a oxidação de etanol.

Figura 15 - Variação da corrente com o tempo para o bioeletrodo FFC-ADH após sucessivas adições de etanol ao eletrólito saturado com N_2 e contendo $0,60 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAD^+ em diferentes potenciais (*vs* $Ag/AgCl_{sat}$). Concentração de etanol a cada adição: $0,085 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,5. Temperatura: 25°C .

Na Figura 16 tem-se a resposta cronoamperométrica a $0,700 \text{ V}$ durante 2800 segundos. É possível observar o aumento nos valores de corrente com a concentração de etanol. As adições de etanol foram feitas até o momento em que os valores de corrente atingiram um valor máximo e, em seguida, mantiveram-se constante.

Figura 16 - Variação da corrente com o tempo para o bioeletrodo FFC-ADH após sucessivas adições de etanol ao eletrólito saturado com N_2 e contendo $0,60 \text{ mmol L}^{-1}$ de NAD^+ no potencial de $0,700 \text{ V}$ (*vs* $Ag/AgCl_{sat}$). Concentração de etanol a cada adição: $0,085 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,5. Temperatura: 25°C . *Inset*: Valores de densidade de corrente catalítica variando com a concentração de etanol.

Isto significa que com uma maior quantidade de substrato, muitos sítios catalíticos são ocupados. Dessa forma, após o ponto de saturação ser atingido, não se observa aumento significativo nos valores de corrente com a adição de etanol à solução. Nota-se ainda que em concentrações de etanol superiores a $1,50 \text{ mol L}^{-1}$ a curva atinge um platô, apresentando, portanto, características do mecanismo cinético de Michaelis-Menten, como pode ser visto no gráfico de corrente *versus* concentração de etanol na Figura 16.

O modelo de Michaelis-Menten é amplamente utilizado em estudos de caracterização cinética enzimática e fornece descrições qualitativas e quantitativas relevantes relacionadas às interações entre enzima e substrato.¹¹⁷ A atividade de uma enzima é geralmente descrita por parâmetros como a velocidade máxima da reação catalítica e a constante de Michaelis-Menten (K_M) a qual corresponde à concentração de substrato que resulta na metade da velocidade máxima para a reação enzimática e dá uma indicação da cinética enzima-substrato. A magnitude dessa constante varia significativamente com o tipo de enzima e de substrato, e uma interpretação prática da cinética Michaeliana indica que quanto menor o valor de K_M , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. Já a constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{app}) é usada comumente para avaliar a atividade biológica da enzima imobilizada no eletrodo. Dessa forma, o valor de K_M^{app} neste estudo foi calculado a partir da versão eletroquímica da equação de Lineweaver-Burk aplicada a eletrodos enzimáticos,^{108,109,118} como demonstrado a seguir (Equação 13). Vale ressaltar, que no caso de enzimas imobilizadas no eletrodo, o K_M^{app} não é uma propriedade intrínseca exclusiva da enzima, mas do sistema completo em um ambiente particular.¹¹⁹ Fatores como o método de imobilização, a quantidade de enzima adsorvida e difusão do substrato podem influenciar nos valores obtidos.¹²⁰

$$\frac{1}{I_{SS}} = \frac{1}{I_{\text{máx}}} + \frac{K_M^{\text{app}}}{I_{\text{máx}}} \frac{1}{c} \quad (13)$$

Em que I_{SS} é a corrente de estado estacionário após a adição de substrato, $I_{\text{máx}}$ é a corrente máxima medida sob condições de substrato saturado e c corresponde à concentração total de substrato.

Para este sistema, o valor de K_M^{app} obtido para o bioeletrodo FFC-ADH foi de $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$. O valor obtido neste caso é muito menor quando comparado com outros eletrodos modificados na presença de ADH. Alguns exemplos dessa constante são relatados

na literatura, tais como 0,91 mmol L⁻¹ no eletrodo de carbono vítreo modificado com azul de toluidina benzenodiazônio,¹⁰⁹ 4,95 mmol L⁻¹ em eletrodos compostos por nanotubos de carbono com ouro coloidal,¹²¹ 6,30 e 7,60 mmol L⁻¹ em eletrodos modificados com dióxido de titânia e náfon na presença e ausência de nanotubos de carbono,¹⁰⁸ respectivamente. Por fim, em um trabalho desenvolvido por Yang e colaboradores,¹⁰⁷ os autores obtiveram um K_M^{app} de 41,7 mmol L⁻¹ usando eletrodo de ouro modificado com hexacianoferrato de níquel.

É possível notar que a constante obtida no presente trabalho é menor comparada aos outros eletrodos citados. Além disso, em todos esses sistemas foi usado algum tipo de material na interface eletrodo/enzima, como nanotubos de carbono, mediadores redox, entre outros. Isto reforça a importância dos resultados obtidos com o bioeletrodo (FFC-ADH) desenvolvido nesse trabalho.

As reações catalisadas por enzimas são altamente dependentes do ambiente reacional, de maneira que temperatura e pH são pontos importantes a serem considerados. Portanto, serão avaliados os efeitos dessas variáveis na atividade bioeletrocatalítica da ADH em reações de oxidação de etanol na presença de NAD⁺.

4.2.4 Efeito da temperatura na bioeletrocatalise de etanol

A temperatura é a variável mais relevante em todo sistema biológico, sendo esta um fator importante na atividade das enzimas. É esperado que a temperatura tenha efeito não somente na atividade catalítica, mas também na estabilidade da enzima. Um aumento na temperatura aumenta a velocidade da reação química que está sendo catalisada. Entretanto, a partir de uma determinada temperatura em que a velocidade da reação enzimática atinge um máximo, a velocidade declina rapidamente, mesmo com o aumento da temperatura, uma vez que em altas temperaturas, a concentração de enzima ativa diminui durante a reação e a inativação começa a ser preponderante. Em temperaturas moderadas e por curtos períodos de tempo, a velocidade de inativação é insignificante e a velocidade inicial aumenta com a temperatura em qualquer reação química.^{74,122}

A partir disso, o efeito da temperatura na bioeletrocatalise de etanol foi avaliado por meio da variação de temperatura do eletrólito em um intervalo de 10 a 60 °C conforme mostra a Figura 17. Para encontrar a temperatura ótima da enzima ADH neste estudo, o bioeletrodo FFC-ADH foi utilizado nas medidas eletroquímicas e os voltamogramas cíclicos foram

registrados a 50 mV s^{-1} em um intervalo de onze temperaturas usando como eletrólito tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 7,5.

Figura 17 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de $600 \text{ }\mu\text{L}$ de etanol ao eletrólito saturado com N_2 em diferentes temperaturas ($10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$). Concentração final de etanol no eletrólito: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,5.

Como mostrado na Figura 17, os voltamogramas cíclicos apresentam o mesmo perfil catalítico, no entanto, pode-se observar uma mudança no potencial de *onset* para valores menos positivos quando a temperatura aumenta até $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta E_{\text{onset}} = 0,19 \text{ V}$) (Figura 18a). Além disso, a Figura 18b mostra a dependência da corrente catalítica com a temperatura, medida em $0,600 \text{ V}$ (*vs* $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$) para os voltamogramas com a mesma quantidade de etanol ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$). Observou-se um aumento nos valores de densidade de corrente quando a temperatura aumenta até $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Em temperaturas acima deste valor, a densidade de corrente diminui, indicando que as taxas metabólicas se tornam mais lentas, pois quando as proteínas são submetidas à elevação de temperatura, essas sofrem alterações em sua configuração espacial. Na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ os valores de densidade de corrente diminuem 7 vezes ($0,08 \text{ mA cm}^{-2}$) em comparação ao valor obtido em $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0,58 \text{ mA cm}^{-2}$).

Figura 18 - (a) Dependência dos valores de potencial de *onset* para a oxidação de etanol com variação de temperatura. (b) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol no potencial de 0,600 V *vs* Ag/AgCl_{sat} com variação de temperatura.

Vale ressaltar que o aumento de temperatura acelera a taxa de reação enzimática devido ao aumento de energia cinética das moléculas participantes da reação. Porém, se for ultrapassada certa temperatura, a agitação das moléculas se torna tão intensa, de maneira a interferir nas interações que mantêm as estruturas secundárias e terciárias, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, podendo causar a desnaturação proteica inativando a enzima.¹²² Nesse caso, tem-se que a temperatura ótima para a oxidação de etanol pela ADH no sistema eletroquímico em questão é de 40 °C. O resultado obtido coincide com os valores de temperatura ótimos reportados na literatura em estudos com a enzima ADH.^{123,124}

Avaliando ainda os voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH em diferentes temperaturas, é possível observar as diferenças citadas anteriormente de uma forma mais detalhada. Considerando dois valores extremos de temperatura, a Figura 19a mostra os voltamogramas do bioeletrodo FFC-ADH com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de 0,25 mol L⁻¹ de etanol ao eletrólito saturado com N₂ na temperatura de 10 °C (linha vermelha) e 40 °C (linha roxa). Enquanto na Figura 19b pode-se observar em destaque o deslocamento de potencial de *onset*. Nota-se que ocorre uma diminuição no potencial de *onset* quando a temperatura aumenta ($\Delta E_{\text{onset}} = 0,180 \pm 0,006$ V). E ainda, um correspondente aumento nos valores de densidade de corrente (linha roxa, Fig. 19a).

Figura 19 - (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD^+ ($0,60 \text{ mol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol ao eletrólito saturado com N_2 na temperatura de 10°C (linha vermelha) e 40°C (linha roxa). (b) Ampliação dos voltamogramas cíclicos com destaque no potencial de *onset*. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,5.

4.2.5 Efeito do pH na bioeletrocatalise de etanol

Assim como a temperatura, o pH também exerce grande influência sobre as reações enzimáticas, sendo geralmente relacionado à ionização reversível do substrato ou dos resíduos de aminoácidos das enzimas, este parâmetro se torna característico para cada tipo de enzima, variando também com o substrato. As enzimas são sensíveis à variação de pH apresentando pH ótimo onde a atividade e a velocidade das reações são máximas. Isto ocorre porque a protonação do meio afeta a ligação entre a enzima e o seu substrato, a atividade catalítica da enzima, e, principalmente, a estrutura da proteína.^{8,122,125}

A catálise de oxidação do etanol pela ADH ocorre com a redução do NAD^+ , como já discutido anteriormente e, por este motivo, a enzima transfere um próton e dois elétrons⁷ a partir do etanol para o NAD^+ utilizando átomos de Zn e coenzimas NAD^+ presentes em sua estrutura. O átomo de zinco presente na enzima é mantido pela presença de três aminoácidos (duas cisteínas e uma histidina), os quais estabilizam a estrutura da enzima permitindo, portanto a transferência de prótons nessa reação. Assim, a desprotonação da estrutura proteica é um fator importante para se alcançar a catálise ideal, já que o pH pode interferir na atividade enzimática alterando o padrão de cargas do sítio ativo, ou alterando a conformação geral da

proteína. Sendo assim, uma vez que a protonação da estrutura proteica desempenha papel importante em condições ótimas na bioeletrocatalise, avaliou-se o efeito do pH na oxidação de etanol pela ADH variando-se o pH da solução eletrolítica em um intervalo de 9,0 a 6,0 (Figura 20).

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de $600 \mu\text{L}$ de etanol ao eletrólito saturado com N_2 em diferentes pH (9,0; 8,5; 8,0; 7,5; 7,0; 6,5 e 6,0). Concentração final de etanol no eletrólito: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: 25°C .

A partir dos dados obtidos pelos voltamogramas cíclicos acima, foi possível observar que os valores de potencial de *onset* variam com a alteração de pH do eletrólito, de acordo com a Figura 21a. No intervalo de pH de 6,0 a 8,5 há um sutil decréscimo no potencial de *onset* conforme os valores de pH aumentam ($\Delta E_{\text{onset}} = 0,10 \text{ V}$). Posteriormente, em pH 9,0 observa-se que o potencial de *onset* aumenta novamente. Por outro lado, ao analisar os valores de densidade de corrente em potencial $0,600 \text{ V}$, observou-se que há um aumento na densidade de corrente em pH mais elevado. Estudos anteriores mostraram que a melhor resposta para a enzima ADH foi observada em um pH ótimo de 8,5.^{111,126} No entanto, a Figura 21b mostra que os valores de corrente continuam a aumentar acima deste pH, indicando que a ADH ainda catalisa a oxidação de etanol.

Figura 21 - (a) Dependência dos valores de potencial de *onset* para a oxidação de etanol com variação de pH. (b) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol no potencial de 0,600 V vs Ag/AgCl_{sat} com variação de pH.

Podem ocorrer diferenças significativas na atividade enzimática devido à conformação da enzima a qual é dependente do pH, uma vez que os grupos protonados/desprotonados presentes no sítio catalítico da enzima são essenciais durante a reação. De acordo com o mecanismo cinético da ADH, a etapa de ligação do etanol ao átomo de zinco para formar o complexo ternário requer a desprotonação da água ligada ao zinco no complexo ADH-NAD⁺.⁷⁰ Para que a catálise ocorra, o sítio ativo da enzima deve se ligar a uma molécula de substrato e a uma molécula de NAD⁺ de modo que possa ocorrer, portanto a transferência de hidreto entre eles. Depois de um álcool neutro se ligar ao átomo de zinco, o álcool é desprotonado, formando em seguida o alcóxido de zinco que é o estado fundamental para a etapa de transferência de hidreto na reação.^{125,70} Assim, a transferência de hidreto é promovida quando o complexo ADH-NAD⁺-etanol está em sua forma desprotonada.⁷⁴ Vale ressaltar que devido ao aumento no valor de potencial de *onset* em pH 9,0, nos estudos seguintes utilizaram-se soluções tampão fosfato de sódio em pH 8,5. Os dados obtidos estão em concordância com o pH ótimo da ADH reportado na literatura.^{123,126,127}

Assim, como mostrado no estudo da dependência da temperatura na bioeletrocatalise, os voltamogramas cíclicos com variação de pH também podem ser avaliados em condições extremas, com o intuito de se observar os detalhes causados pela alteração do pH da solução. A Figura 22a mostra os voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de

0,25 mol L⁻¹ de etanol ao eletrólito saturado com N₂ em pH 6,0 (linha vermelha) e 9,0 (linha roxa). Já a Figura 22b evidencia a região de deslocamento de potencial de *onset*. É possível observar uma sutil diferença nos valores de potencial de *onset* com a variação de pH ($\Delta E_{\text{onset}} = 0,100 \pm 0,007$ V). Enquanto os valores de densidade de corrente aumentam consideravelmente no mesmo intervalo avaliado.

Figura 22 - (a) Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) adicionado ao eletrólito na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de 0,25 mol L⁻¹ de etanol ao eletrólito saturado com N₂ em pH 6,0 (linha vermelha) e 9,0 (linha roxa). (b) Ampliação dos voltamogramas cíclicos com destaque no potencial de *onset*. $v = 50$ mV s⁻¹. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹. Temperatura: 25 °C.

4.2.6 Bioeletrodo cooperativo com ADH e *Saccharomyces cerevisiae*: bioeletrocatalise de etanol

Assim, de acordo com o que foi exposto, e após serem definidas as condições de pH e temperatura, avaliou-se o desempenho do bioeletrodo FFC-ADH em tampão fosfato de sódio (0,10 mol L⁻¹) pH 8,5 na presença de NAD⁺ em solução e temperatura controlada de 40 °C, a fim de se observar o perfil catalítico da oxidação de etanol utilizando as condições ideais para a ADH. A Figura 23 mostra a voltametria cíclica na faixa de potencial de 0,0 a 0,8 V com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹, na ausência (linha preta) e após a adição 0,25 mol L⁻¹ de etanol à solução eletrolítica (linha vermelha). Observou-se a atividade bioeletrocatalítica da enzima com potencial de *onset* em 0,01 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) e que, portanto, em condições ótimas de pH e temperatura houve um deslocamento dos valores de potencial de *onset*.

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH com NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionado ao eletrólito, na ausência de etanol (linha preta) e após a adição de $600 \mu\text{L}$ de etanol em atmosfera inerte (N_2) (linha vermelha). Concentração final de etanol no eletrólito: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,5. Temperatura: 40°C .

Após verificar que a enzima imobilizada na superfície do eletrodo se encontrava ativa (Figura 23), avaliou-se o comportamento bioeletrocatalítico da ADH com a levedura *S. cerevisiae* presente em suspensão em um sistema mantido sob condições anaeróbias. A finalidade do estudo é observar a catálise de oxidação de etanol pela ADH o qual será produzido a partir da fermentação anaeróbia da levedura, como será apresentado a seguir.

Observa-se nas Figuras 24a e 24b os voltamogramas referentes ao bioeletrodo FFC-ADH na presença de NAD^+ , glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e *S. cerevisiae* ($0,05 \text{ g mL}^{-1}$) em suspensão. Manteve-se o sistema em constante agitação com o auxílio de um agitador magnético e em atmosfera inerte de N_2 , após o borbulhamento desse gás durante 10 minutos na solução. Após o período de estabilização de uma hora, o sistema foi avaliado durante 24 horas de fermentação na presença de levedura na solução eletrolítica, medindo-se o pH antes de cada medida eletroquímica e ajustando-o com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) quando necessário, uma vez que com o passar do tempo o pH do meio é lentamente acidificado pelo processo fermentativo da levedura. Neste caso também se utilizaram as condições ótimas de temperatura e pH, 40°C e 8,5, observadas anteriormente nos estudos feitos somente com a enzima ADH.

Durante a fermentação alcoólica pela levedura, juntamente com o etanol e o dióxido de carbono, o metabolismo anaeróbio permite a formação de subprodutos, como o glicerol, ácidos orgânicos, dentre eles o ácido succínico, acético, láctico, pirúvico, butírico, e ainda, álcoois superiores, como acetaldeído e acetoína, sendo estes produzidos simultaneamente com o crescimento da levedura.¹²⁸ No entanto, a quantidade de produtos secundários não é significativa comparada com a concentração de etanol. E, portanto, os subprodutos não influenciam de maneira negativa na produção de etanol.

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo FFC-ADH em solução de glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) contendo NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) e levedura durante 6 horas (a) e 24 horas de fermentação em atmosfera inerte (N_2) (b). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Temperatura: 40°C . Concentração de levedura: $0,05 \text{ g mL}^{-1}$. Soluções de glicose e NAD^+ em tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,5.

A temperatura é considerada um dos fatores mais importantes na fermentação por microrganismos, podendo afetar diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura. Essa variável tem efeito sobre todos os aspectos do crescimento, bem como viabilidade, metabolismo e fermentação das leveduras. Assim, é importante ressaltar que a temperatura utilizada nesse experimento também é favorável para a levedura considerando a influencia desta na geração de etanol a partir da fermentação. Embora as leveduras alcoólicas sejam microrganismos que crescem em diferentes temperaturas, o processo de fermentação pode ocorrer entre 10°C e 40°C . Dentro deste intervalo, quanto maior a temperatura, maior será a velocidade do processo fermentativo. Em temperaturas superiores a 40°C , as células

começam a se tornar inviáveis. Além disso, com o aumento da temperatura há também maior formação de metabólitos secundários, tais como glicerol, ácido acético e ácido succínico.¹²⁸

A produção industrial de etanol em destilarias ocorre na faixa de 25 °C a 40 °C. A temperatura ótima varia de acordo com a levedura, existindo ainda a classe de leveduras que apresentam temperaturas ótimas de crescimento acima de 40 °C, sendo essas denominadas de leveduras termofílicas.^{129,130} O controle de temperatura é essencial para maximizar a produção de etanol e prever a inativação irreversível das células de leveduras. A utilização de leveduras termotolerantes seria, portanto uma alternativa, já que os processos fermentativos entre 30 °C e 40 °C ou acima desta faixa possuem a vantagem de facilitar a recuperação de etanol com significativa economia relativa dos custos relacionados ao controle de refrigeração em destilarias de produção de etanol, especialmente em países tropicais.¹³¹

O pH também apresenta resposta significativa no processo fermentativo devido a sua importância tanto no controle de contaminação bacteriana quanto no efeito dessa sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos.^{130,132} Em relação a influência do pH durante a produção de etanol, o sistema cooperativo se mostrou eficaz apresentando resultados satisfatórios em meio alcalino (pH 8,5). O pH interno das células de levedura se mantém na faixa de 5,8 a 6,9 seja qual for o valor de pH extracelular, desde que mantido na faixa de 2 a 7, pois as leveduras mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio. Entretanto, sabe-se que a diminuição do pH causa um aumento na concentração de ácido acético e, conseqüentemente, afeta a fermentação alcoólica. Baixos valores de pH tornam o meio mais agressivo, já que exigem das leveduras um maior dispêndio de energia na manutenção do pH interno. Além disso, podem afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática as quais ficam expostas ao meio externo.¹³⁰ Casey e colaboradores, avaliaram o efeito do ácido acético e do pH na produção de etanol. Foi demonstrada uma queda significativa da produtividade de etanol por fermentação, devido à presença de ácido acético, uma vez que este apresentou efeito inibitório no consumo de glicose pelos microrganismos, correspondendo a uma diminuição nas taxas de etanol.¹³³

É possível observar um aumento na densidade de corrente catalítica pela ADH devido à oxidação de etanol, sendo este produzido a partir da fermentação por microrganismos (Fig. 24). Os estudos eletroquímicos demonstraram que o bioeletrodo na presença de enzima e microrganismos opera como um biocatalisador cooperativo durante a oxidação indireta de glicose, na qual o etanol é produzido a partir da fermentação alcoólica e em seguida, é oxidado a acetaldeído pela ADH na superfície do eletrodo. Dessa forma, obteve-se um reator

anódico capaz de oxidar glicose e etanol por microrganismos e enzimas, respectivamente, que posteriormente foi aplicado na construção de uma BFC cooperativa de glicose-etanol/O₂.

A partir dos voltamogramas cíclicos é possível notar que os valores de corrente aumentam durante as primeiras 6 horas de fermentação (Fig. 24a), com valores constantes ao longo das 24 horas (Fig. 24b). Para uma análise mais detalhada desses resultados, demonstrou-se o desempenho bioeletrocatalítico a partir dos valores de densidade de corrente obtidos a 0,600 V durante o período de 24 horas de fermentação. Observa-se a diminuição nos valores de corrente após 6 horas e que esses se mantêm constantes próximo ao observado para o intervalo entre 4 e 5 horas de fermentação, como pode ser visto na Figura 25a.

Figura 25 - (a) Dependência da densidade de corrente de oxidação de etanol pela ADH no potencial de 0,600 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) com o tempo de fermentação pela *S. cerevisiae* em condições anaeróbias. (b) Dependência da concentração de etanol produzido com o tempo de fermentação pela *S. cerevisiae* em condições anaeróbias. (c) Correlação linear entre corrente bioeletrocatalítica e concentração de etanol.

A Figura 25b mostra os valores de concentração de etanol com o tempo de fermentação da levedura em condições anaeróbias. É possível observar um perfil similar entre os valores de densidade de corrente e concentração de etanol obtidos no mesmo intervalo de tempo. Ajustou-se uma curva exponencial (linha vermelha) a partir dos valores de cada gráfico para relacionar e analisar o comportamento de ambas as curvas. Os resultados

demonstraram uma excelente correlação linear entre a concentração de etanol e a corrente gerada (Fig. 25c). Isso indica que a resposta bioeletrocatalítica da ADH é diretamente proporcional à concentração de etanol, sendo este produzido a partir da fermentação da levedura.

Por cromatografia gasosa, foi possível identificar e quantificar o etanol presente no eletrólito. Primeiramente, foram obtidos os cromatogramas da solução padrão de etanol em diferentes concentrações (0,04 a 1,27 mol L⁻¹), como pode ser visto na Figura 26a.

Figura 26 - (a) Cromatogramas CG-FID da solução padrão de etanol em diferentes concentrações (0,04 a 1,27 mol L⁻¹). (b) Curva de calibração obtida a partir dos cromatogramas da solução padrão de etanol em diferentes concentrações. (c) Cromatogramas CG-FID das amostras obtidas a partir da fermentação pela levedura no período de 24 horas. (d) Ampliação do pico de etanol.

O tempo de retenção encontrado para o composto analisado foi em aproximadamente 3,1 minutos. Em seguida, foi possível construir a curva de calibração a partir dos dados obtidos pelos cromatogramas da solução padrão de etanol (Fig. 26b). Enfim, foram recolhidas alíquotas em vários tempos de fermentação, durante o período de 24 horas, sendo estas posteriormente submetidas à análise cromatográfica. A Figura 26c mostra os cromatogramas das amostras de fermentação pela levedura com destaque para o pico de etanol, e na Fig. 26d é mostrada a ampliação do pico de etanol. Relacionando-se, finalmente, a razão entre as áreas obtidas nos cromatogramas, foi possível obter a concentração de etanol nas amostras com o auxílio da curva de calibração.

As reações metabólicas que ocorrem durante a produção de etanol, por meio da fermentação alcoólica, são catalisadas por enzimas específicas, as quais se situam na parede celular e no interior da célula da levedura. Durante essas reações, as concentrações de substrato, produto e células variam com o tempo de fermentação. Essa variação pode ser definida como cinética química do sistema.¹³⁴ O crescimento das leveduras é então, caracterizado por um comportamento característico, sendo esse dividido em várias fases, como mostrado na Figura 27.

Figura 27 - Representação da curva típica de crescimento celular de leveduras com suas respectivas fases de crescimento, fase lag, fase de transição, exponencial, estacionária e a desaceleração do metabolismo microbológico.

Fonte: Adaptação de Pagnoncelli, K. C. (2017) a partir de Morris, E. O., 1958, p. 257.

É possível observar que o perfil da curva de crescimento dos microrganismos também é similar a curva de concentração de etanol produzido com o tempo de fermentação pela *S. cerevisiae* (Fig. 25b). A primeira fase denominada de período de latência, ou ainda, fase “lag”, é geralmente considerada como o período que precede o estágio de crescimento exponencial. Corresponde a uma fase de curta duração caracterizada pela adaptação fisiológica dos microrganismos ao novo meio em que foram introduzidos. Durante essa fase não há reprodução celular, pois o transporte de nutrientes pela membrana ainda é muito lento. O metabolismo das células se encontra ativo, ou seja, irá sintetizar enzimas e coenzimas de modo a favorecer as condições necessárias para que elas possam se dividir.¹³⁵ Em seguida, ocorre o período de transição, ou seja, o início da reprodução dos microrganismos com aumento gradual na velocidade de crescimento. Tem-se ainda a fase logarítmica ou exponencial, em que há um aumento crescente da biomassa. O número de células de levedura aumenta exponencialmente com o tempo, e portanto, a velocidade de crescimento é máxima. Essa fase é ainda seguida por uma linear de crescimento, em que a velocidade de reprodução é constante. O número de células viáveis se mantém constantes, de forma que a quantidade correspondente às células novas produzidas é igual as que morrem.¹³⁵ Posteriormente, ocorre a desaceleração no metabolismo microbiológico devido ao esgotamento de substrato e nutrientes. Este período é caracterizado pelo acúmulo de inibidores, e a velocidade de crescimento diminui até se anular. Nessa fase pode haver a desnaturação de proteínas, colapso da membrana citoplasmática e rompimento celular. Devido a todos esses fatores, em certo momento não há mais um crescimento líquido da população. O número correspondente as células que se dividem torna-se equivalente ao número de células que morrem, até não haver mais produção de novas células.^{36,134}

Os açúcares mais fermentáveis pela levedura são os monossacarídeos glicose e frutose e os dissacarídeos maltose e sacarose. No entanto, vale lembrar que o etanol só é formado pelas leveduras a partir de monossacarídeos, sendo a glicose um dos mais utilizados pelas células para a obtenção de energia. As leveduras produzem duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico) a partir de uma molécula de glicose durante a glicólise, ocorrendo a fosforilação de duas moléculas de ADP (adenosina difosfato) em ATP. Em seguida, o piruvato é transformado em duas moléculas de acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase. O acetaldeído é posteriormente transformado em etanol pela enzima ADH, ocorrendo a regeneração de NAD^+ a partir da oxidação de NADH, de maneira que o NAD^+ possa ser novamente utilizado no processo da glicólise.¹³⁶ Os produtos resultantes da fermentação ficam

com energia armazenada e devido a isso, o saldo da fermentação são duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose. A Figura 28 mostra a produção de etanol pelo processo da glicólise que ocorre no interior das células de *S. cerevisiae*.

Figura 28 - Representação esquemática do processo fermentativo. As leveduras degradam a molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, durante a glicólise, ocorrendo a fosforilação de duas moléculas de ADP em ATP e a redução de NAD^+ a NADH. Cada molécula de piruvato é convertida, via acetaldeído, em uma molécula de etanol e outra de dióxido de carbono, ocorrendo a regeneração de NAD^+ pela oxidação de NADH.

Fonte: Autoria própria.

Como já dito anteriormente, a levedura produz inúmeros componentes secundários, de forma que parte da glicose também é utilizada na formação dessas substâncias, uma vez que mesmo presente em pequenas quantidades, são necessárias para a síntese de material celular e manutenção da levedura.¹³⁰ No entanto, os principais produtos obtidos em proporções equimolares durante a fermentação são o etanol e o dióxido de carbono. A equação a seguir, representa a conversão estequiométrica de glicose a etanol e CO₂ (Eq. de Gay-Lussac).¹³⁷⁻¹³⁹

Sabe-se que o acúmulo de etanol pode se tornar um fator de estresse significativo durante a fermentação de microrganismos como as leveduras, pois pode afetar o metabolismo de nutrientes, a função proteica e a biossíntese, e ainda, o transporte de moléculas pequenas e a estrutura da membrana.¹⁴⁰⁻¹⁴² Embora a maioria dos organismos não consigam tolerar níveis elevados de álcool, certas leveduras, como é o caso da *S. cerevisiae*, são capazes de manter a viabilidade celular na presença de até 15-20% em volume de etanol.¹⁴⁰ Muitos trabalhos na literatura buscam desenvolver estratégias de engenharia genética para melhorar o crescimento celular durante a produção de etanol, bem como a compreensão da toxicidade do etanol sobre o impacto celular e a resposta das células ao estresse causado pela alta concentração do mesmo.¹⁴³⁻¹⁴⁵

4.3 Análise morfológica do bioânodo

Por fim, para avaliar a morfologia das FFC utilizadas como eletrodo de trabalho nos estudos eletroquímicos anteriores, estas foram submetidas à análise de MEV. A Figura 29a mostra imagens das FFC após o tratamento químico com H₂SO₄ e KMnO₄, o qual modifica a superfície das fibras permitindo uma adsorção mais eficiente da enzima. Na Figura 29b observa-se a imagem da fibra após a imobilização da ADH durante 24 horas. A Fig. 29c mostra a presença de microrganismos adsorvidos na superfície do bioeletrodo durante o crescimento destes após 24 horas de fermentação. Já a Figura 29d ilustra uma fibra com alta ampliação e tratamento de cor para uma melhor visualização, indicando dessa forma, o biofilme produzido pela levedura. Pode-se observar claramente a presença e adesão dos microrganismos na superfície do eletrodo.

Figura 29 - (a) Imagens de microscopia eletrônica de varredura das FFC após o tratamento químico com H_2SO_4 e KMnO_4 . (b) Imagens da FFC após o tratamento químico e adsorção da ADH ($8,0 \text{ mg mL}^{-1}$) após 24 horas. (c) Imagens do bioeletrodo na presença de ADH e microrganismos após 24 horas de fermentação. (d) Imagens do bioeletrodo com ampliação e tratamento de cor ilustrando a formação do biofilme produzido pela levedura.

As leveduras produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS) para melhor se aderir à superfície do eletrodo. EPS são substâncias definidas como uma complexa mistura de alto peso molecular composta por polímeros que são excretados por microrganismos. A localização extracelular e a composição das EPS podem ser resultado de diferentes processos, bem como a secreção ativa, lise celular, adsorção a partir do ambiente ao qual está inserida, entre outros. Essas substâncias poliméricas promovem a formação de um biofilme, que é um processo natural em que as células microbianas auto produzem uma matriz polimérica, podendo formar flocos, agregados ou camadas espessas de células.^{146–148} Os compostos predominantes das EPS são hidrato de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e vários heteropolímeros.^{149,150}

Provavelmente os polímeros originam-se da parede celular da levedura, a qual é organizada em camadas e os componentes são interconectados através de ligações covalentes. A parede celular da levedura é formada por um grupo complexo de polímeros de glicose, sendo os principais constituintes os polissacarídeos β -1,3-glucana e β -1,6-glucana, contendo

ainda, glicoproteínas, lipídeos e uma pequena proporção de quitina.^{151–153} Os lipídeos da membrana plasmática se encontram dispostos assimetricamente através da bicamada. Além disso, apresentam característica marcante devido a sua diversidade de tamanho e composição. As principais classes de lipídeos presentes na membrana da levedura são os glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e esteróis.¹⁵⁴ Vale ressaltar que em contraste com os eucariotas superiores, em quais o colesterol é o esterol mais abundante,¹⁵⁵ a membrana plasmática da *S. cerevisiae* contém principalmente ergosterol, estando também presentes alguns intermediários de sua biossíntese, como fecosterol, lanosterol e zimosterol (Fig. 30). E ainda, o folheto interno da membrana plasmática da *S. cerevisiae* é enriquecido em fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina.^{154,156}

Figura 30 - Estrutura química dos esteróis presentes na membrana plasmática da *S. cerevisiae*, ergosterol, fecosterol, lanosterol e zimosterol, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

O crescimento e adsorção de *S. cerevisiae* na superfície do bioeletrodo não prejudica a atividade bioeletrocatalítica da ADH, uma vez que ainda é possível se observar o perfil catalítico da enzima mesmo na presença de levedura adsorvida. Observa-se, também, que os microrganismos não bloqueiam a difusão de etanol ao sítio ativo da enzima. Considera-se, assim, que tanto os microrganismos em suspensão como aqueles aderidos na superfície do eletrodo contribuem para a produção de etanol.

4.4 Estudo da biocélula a combustível cooperativa de glicose-etanol/O₂

Após o estudo dos bioeletrodos separadamente, foi avaliado o funcionamento da BFC combinando o bioânodo cooperativo e o biocátodo de difusão de gás na presença de BOx.

As medidas eletroquímicas foram feitas em uma cela H, conforme descrito na seção experimental (tópico 3.8). Os compartimentos da cela foram mantidos em diferentes condições, otimizadas para a bioeletrocatalise individual de cada sistema. Assim, cada compartimento foi preenchido com a solução de interesse, e manteve-se em condições anaeróbias e aeróbias os compartimentos anódico e catódico, respectivamente. Nesse estudo, optou-se pela não utilização de mediadores de transferência de carga, a fim de avaliar a real contribuição das enzimas sobre a atividade bioeletrocatalítica.

Primeiramente, avaliou-se a bioeletrocatalise usando o bioânodo cooperativo nas condições utilizadas na BFC (pH 7,5 e 40 °C). Após o período de estabilização de 5 horas de fermentação, obteve-se uma curva de polarização em estado estacionário para o bioeletrodo FFC-ADH na presença de levedura (Fig. 31a). Observa-se que o potencial de *onset* teve início a cerca de 0,005 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}) e potencial de circuito aberto de -0,25 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}) avaliado aqui para o bioânodo nas mesmas condições (Fig. 31b). Por esta razão, os valores de potencial medidos dependem, pelo menos parcialmente, da velocidade da reação enzimática, a qual é altamente influenciada não só pela concentração de substrato disponível, mas também sofre influência devido à oxidação de outros produtos formados durante o processo fermentativo.

Figura 31 - (a) Curva de polarização em estado estacionário do bioeletrodo cooperativo em solução de glicose (1,0 mol L⁻¹) contendo NAD⁺ (0,60 mmol L⁻¹) na ausência de levedura (linha preta) e na presença de 0,05 g mL⁻¹ de levedura após 5 horas de fermentação (linha azul). (b) Monitoramento de potencial de circuito aberto obtido com o bioeletrodo cooperativo após 5 horas de fermentação. Soluções de glicose e NAD⁺ em tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹; pH 7,5. Temperatura: 40 °C.

No estudo da BFC, utilizou-se como cátodo o bioeletrodo de difusão de gás com a enzima BOx. Primeiramente, antes das medidas eletroquímicas, avaliou-se a morfologia do eletrodo por MEV, conforme mostrado nas imagens da Figura 32. As Figuras 32a e 32b ilustram o suporte de tecido de carbono e a camada de difusão composta por PTFE e pó de carbono suportados no tecido de carbono, respectivamente. Na Figura 32c podem ser observadas as FFC presentes sobre a superfície da camada de difusão. E ainda, na Figura 32d é mostrado o polímero composto por náfon, glutaraldeído e BOx sobre as FFC suportadas na camada de difusão.

Figura 32 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do suporte de tecido de carbono (a), da camada de difusão sobre o tecido de carbono (b), das FFC na superfície da camada de difusão (c) e biopolímero composto por náfon, glutaraldeído e BOx na superfície das FFC suportadas na camada de difusão (d).

Em seguida, para avaliar a redução bioeletrocatalítica direta de oxigênio molecular pelo biocátodo baseado em BOx, foram obtidos voltamogramas cíclicos com o biocátodo operando em modo de difusão de gás em solução tampão fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,5), como mostrado na Figura 33. É possível observar o potencial de *onset* da reação de redução de O₂ em 0,520 V (vs. Ag/AgCl_{sat}), o qual está em concordância com os valores

obtidos em estudos com biocátodos de difusão de gás com BOx.^{52,157} Além disso, obteve-se uma densidade de corrente de $0,59 \text{ mA cm}^{-2}$ em $0,00 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$).

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do bioeletrodo de difusão de gás baseado em BOx em solução tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) em atmosfera inerte (Ar) (linha preta) e no modo de respiração aérea (linha vermelha). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Temperatura: 40°C .

Devido as limitações que ocorrem com o uso dos cátodos convencionais, como a baixa solubilidade de O_2 em soluções aquosas, aproximadamente $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ a temperatura ambiente e pressão atmosférica, e ainda, a lenta difusão de O_2 no eletrólito aquoso fazendo com que a reação seja limitada pelo transporte de massa dessas espécies até a superfície do eletrodo,¹⁵⁸ os cátodos de difusão de gás vem sendo amplamente utilizados como catalisadores para RRO em BFCs.^{51,52,61,159} Esses eletrodos se mostram como uma alternativa, já que minimiza as perdas de resistência ôhmica e maximiza o suprimento de oxigênio sob condições de “respiração aérea”.⁶² Além disso, como a concentração de O_2 presente no ar atmosférico é muito maior em comparação a presença deste em uma solução saturada, os biocátodos enzimáticos de difusão de gás são capazes de produzir valores de corrente mais elevados do que os biocátodos que fazem uso de oxigênio dissolvido.

Alguns parâmetros devem ser levados em consideração com o intuito de se alcançar um bom funcionamento do cátodo, dentre os quais citam-se a porosidade e a hidrofobicidade do material que constitui o eletrodos, bem como o catalisador que será empregado. Assim, ao

combinar as vantagens que o cátodo de difusão de gás oferece juntamente com um biocatalisador eficiente, no caso do biocátodo enzimático contendo BOx, sendo esta última adequadamente imobilizada na superfície do eletrodo, é possível a obtenção de biocátodos com alto desempenho para aplicação em BFCs.

A partir da Figura 34 é possível observar os valores de OCP para o biocátodo no modo de difusão de gás na presença da enzima BOx (linha preta) e o bioânodo cooperativo (linha vermelha), monitorados durante 14 horas. O experimento para o biocátodo com BOx usando como eletrólito tampão fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5 apresentou valores estáveis próximos a $0,500 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$) avaliado no modo de difusão de gás. Com o bioânodo cooperativo, como já dito anteriormente, obteve-se valores de potencial a $-0,250 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$). Os resultados obtidos indicam que os eletrodos apresentam alta estabilidade. A partir disso, espera-se que uma diferença de potencial no valor de $0,750 \text{ V}$ seja obtida com a BFC em operação.

Figura 34 - Monitoramento de potencial de circuito aberto obtido com o biocátodo operando no modo de difusão de gás (linha preta) e bioânodo cooperativo após 5 horas de fermentação (linha vermelha). Condições: pH 7,5 e 40°C .

Em seguida, avaliou-se o desempenho da BFC com o bioânodo cooperativo em solução de glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) contendo NAD^+ e *S. cerevisiae* no compartimento anódico. A estabilidade da BFC foi avaliada durante horas de funcionamento com constante monitoramento do pH do eletrólito, ajustando sempre que necessário para 7,5. A temperatura

do sistema foi mantida a 40 °C durante todo o funcionamento da mesma, com o auxílio de um banho termostático. As Figuras 35a e 35b mostram a BFC operando na ausência de levedura e na presença de 0,05 g mL⁻¹ de levedura durante a fermentação anaeróbia, respectivamente. O biocátodo contendo BOx no modo de difusão de gás está ilustrado nas Figuras 35c-e. O suporte para o bioeletrodo nesse caso, foi confeccionado de modo que fosse possível manter uma das faces do biocátodo (camada catalítica) em contato com o eletrólito e a outra face (tecido de carbono) em contato com o ar atmosférico. Além disso, pode-se observar a formação de gotículas de água, as quais são produzidas pela reação eletroquímica que ocorre no biocátodo de respiração aérea (Fig. 35e).

Figura 35 - (a) Configuração da BFC combinando o biocátodo de difusão de gás e o bioânodo cooperativo na ausência de levedura e (b) na presença de levedura. (c) Biocátodo no modo de difusão de gás. (d) Biocátodo de difusão de gás com ampliação da imagem ilustrando o suporte de FFC sobre o tecido de carbono usado para manter o contato elétrico. (e) Formação de gotículas de água pela reação eletroquímica no biocátodo.

O desempenho da BFC foi avaliado após o período de estabilização da fermentação pela *S. cerevisiae*. Foi possível observar um aumento nos valores de potencial durante as primeiras 5 horas de fermentação, de 0,550 a 0,720 V, de acordo com a Figura 36a.

Figura 36 - (a) Voltagem da BFC operando durante as 5 horas iniciais de fermentação pela levedura. (b) Curvas de polarização e (c) curvas de potência da BFC operando na ausência de levedura (linha preta) e na presença de levedura após 5 horas de fermentação (linha azul). (d) Voltagem da BFC operando durante 27 horas de fermentação. Compartimento anódico: solução tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5 contendo glicose ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), NAD^+ ($0,60 \text{ mmol L}^{-1}$) e *S. cerevisiae* ($0,05 \text{ g mL}^{-1}$) em atmosfera inerte (N_2). Compartimento catódico: solução tampão fosfato de sódio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,5. Temperatura: 40°C .

A curva de corrente *versus* voltagem é mostrada na Figura 36b. Foi obtida uma corrente de $80,0 \mu\text{A cm}^{-2}$ a $0,700 \text{ V}$. Ressalta-se ainda, que o potencial $0,700 \text{ V}$ está muito próximo a diferença de potencial obtida com os bioeletrodos nos experimentos de meia cela (Fig. 34). A partir do gráfico de densidade de potência *versus* a voltagem da célula (Fig. 36c), é possível observar que a potência máxima obtida para a BFC foi de $7,07 \mu\text{W cm}^{-2}$ a $0,350 \text{ V}$ e os valores de OCP foram obtidos entre $0,700$ e $0,740 \text{ V}$ (Fig. 36d).

O bioânodo cooperativo e o biocátodo de difusão de gás desenvolvidos nesse trabalho são eletrodos compatíveis e podem operar eficientemente, gerando energia por várias horas sem decaimento substancial do desempenho.

Em conclusão, foi demonstrado que o bioânodo cooperativo pode ser aplicado com sucesso em uma BFC. Este é um primeiro dispositivo de uma nova classe de biocélula a combustível cooperativa usando enzima e microrganismo que serve como uma abordagem geral para futuras aplicações. Este estudo permite, em princípio, que uma grande variedade de combustíveis (substrato) possa vir a ser usada em BFCs, visando a bioprodução de etanol pelo processo fermentativo da levedura. Uma das vantagens que o sistema oferece utilizando o bioeletrodo cooperativo com um biocátodo de difusão de gás, é a flexibilidade que tal combinação proporciona juntamente com o *design* da biocélula.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi relatado o desenvolvimento de bioeletrodos com ADH e *S. cerevisiae*, em que enzima e microrganismos foram usados como biocatalisadores cooperativos para bioprodução e oxidação de etanol. Inicialmente, os bioeletrodos foram desenvolvidos na presença de ADH utilizando FFC para avaliar a atividade bioeletrocatalítica da enzima. A metodologia utilizada na imobilização enzimática da ADH na superfície das FCF foi eficaz e a atividade enzimática foi preservada. O bioeletrodo desenvolvido apresenta alta estabilidade e é promissor para diversas aplicações. Além disso, permitiu determinar propriedades termodinâmicas e cinéticas da ADH, como temperatura e pH ótimos. Por fim, demonstrou-se o funcionamento de uma BFC operando com o bioânodo cooperativo e o biocátodo de difusão de gás com BOx, uma vez que o desenvolvimento do dispositivo não requer procedimentos sofisticados. Basicamente, utilizou-se o método de imobilização enzimática para a construção da biocélula, a qual foi avaliada na ausência de mediadores redox.

Assim, torna-se possível ainda, a utilização de diferentes microrganismos e de vários substratos para geração de eletricidade com o consumo de matéria orgânica, que pode ser um carboidrato ou ainda contaminantes presentes no meio ambiente. Dessa forma, o novo dispositivo desenvolvido poderia ser usado para recuperar energia a partir de reservatórios que contêm matéria orgânica menos concentrada, entre eles, sedimentos marinhos, águas residuais e biomassa residual provenientes de muitas indústrias, aumentando assim, a possibilidade de futuras aplicações.

Vale ressaltar a importância de extrair energia usando dispositivos dessa natureza em locais que contêm relativa concentração de matéria orgânica. Pois, estima-se que muitos reservatórios ou até mesmos rios ou lagos contaminados possam conter alto valor de energia armazenada, a qual poderia ser usada para conversão em energia elétrica. Se os compostos orgânicos presentes nos reservatórios não forem oxidados, estes poderão esgotar as reservas de oxigênio dos ecossistemas aquáticos, além de estimular a liberação de metano para a atmosfera. Um desses exemplos são as águas residuais, que tornaram-se uma ameaça para os ecossistemas aquáticos aeróbios. Outro caso, é quando não há aproveitamento suficiente da biomassa gerada através de processos químicos. A biomassa remanescente pode sofrer biodegradação anaeróbia com consequente emissão de gases poluentes.

Além disso, a vantagem em se utilizar um sistema com enzima e levedura é a grande variedade de substratos que pode ser usada no dispositivo quando se tem a *S. cerevisiae* como biocatalisador, não só a glicose, mas diversos açúcares, já que este microrganismo é capaz de fermentar diversos açúcares, até mesmo os dissacarídeos após serem hidrolisados em monossacarídeos. Assim, é gerado um produto que pode ser usado como combustível na reação enzimática sendo necessária apenas uma enzima para realizar o processo catalítico. E ainda, o sistema desenvolvido pode ser aplicado na produção bioenergia, ou seja, extraindo eletricidade de fontes de açúcar presentes em frutas, legumes e alguns tipos de plantas.

6 REFERÊNCIAS

1. CASADO-RIVERA, E. Electrocatalytic activity of ordered intermetallic phases for fuel cell applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 12, p. 4043-4049, 2004.
2. LAMY, C.; LÉGER, J.-M.; SRINIVASAN, S. Direct methanol fuel cells: from a twentieth century electrochemist's dream to a twenty-first century emerging technology. In: BOCKRIS, J. O'M.; CONWAY, B. E.; WHITE, R. E. (Ed.). **Modern aspects of electrochemistry**. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2001. v. 34, p. 53-118.
3. DINCER, I. Renewable energy and sustainable development: a crucial review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, p. 157-175, 2000.
4. AQUINO NETO, S.; FORTI, J. C.; DE ANDRADE, A. R. An overview of enzymatic biofuel cells. **Electrocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 87-94, 2010.
5. JOSÉ, J. G.; DA SILVA, C. A. Materiais cerâmicos para células a combustível de óxido sólido. **Metalurgia e Materiais**, v. 64, n. 594, p. 569-571, 2008.
6. GONZALEZ, E. R.; TICIANELI, E. A. Células a combustível: uma alternativa promissora para a geração de eletricidade. **Química Nova**, v. 12, n. 3, p. 268-272, 1989.
7. COONEY, M. J.; SVOBODA, V.; LAU, C.; MARTIN, G.; MINTEER, S. D. Enzyme catalysed biofuel cells. **Energy and Environmental Science**, v. 1, n. 3, p. 320-337, 2008.
8. LUZ, R. A. S.; PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILO, F. N. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 11, p. 1751-1777, 2014.
9. OLYVEIRA, G. M.; IOST, R. M.; LUZ, R. A. S.; CRESPILO, F. N. Biofuel cells: Bioelectrochemistry applied to the generation of green electricity. In: DE SOUZA, F. L.; LEITE, E. R. (Ed.). **Nanoenergy: nanotechnology applied for energy production**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 101-123.
10. MARTINS, M. V. A.; BONFIM, C.; DA SILVA, W. C.; CRESPILO, F. N. Iron (III) nanocomposites for enzyme-less biomimetic cathode: a promising material for use in biofuel cells. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 11, p. 1509-1512, 2010.

11. HIGGINS, S. R.; LAU, C.; ATANASSOV, P.; MINTEER, S. D.; COONEY, M. J. Hybrid biofuel cell: microbial fuel cell with an enzymatic. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 9, p. 994-997, 2011.
12. WILLNER, I.; ARAD, G.; KATZ, E. A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 44, n. 2, p. 209-214, 1998.
13. 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.
14. LARMINIE, J.; DICKS, A. **Fuel cell systems explained**. Chichester: John Wiley, 2003. 418 p.
15. MINTEER, S. D.; LIAW, B. Y.; COONEY, M. J. Enzyme-based biofuel cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 228-234, 2007.
16. CRACKNELL, J. A.; VINCENT, K. A.; ARMSTRONG, F. A. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2439-2461, 2008.
17. CARRETTE, L.; FRIEDRICH, K. A.; STIMMING, U. Fuel cells: principles, types, fuels, and applications. **ChemPhysChem**, v. 1, n. 4, p. 162-193, 2000.
18. ICZKOWSKI, R. P.; CUTLIP, M. B. Voltage losses in fuel cell cathodes. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 127, n. 7, p. 1433-1440, 1980.
19. GASTEIGER, H. A.; PANELS, J. E.; YAN, S. G. Dependence of PEM fuel cell performance on catalyst loading. **Journal of Power Sources**, v. 127, n. 1-2, p. 162-171, 2004.
20. MENNOLA, T.; MIKKOLA, M.; NOPONEN, M.; HOTTINEN, T.; LUND, P. Measurement of ohmic voltage losses in individual cells of a PEMFC stack. **Journal of Power Sources**, v. 112, n. 1, p. 261-272, 2002.
21. BULLEN, R. A.; ARNOT, T. C.; LAKEMAN, J. B.; WALSH, F. C. Biofuel cells and their development. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 11, p. 2015-2045, 2006.

22. ATANASSOV, P.; APBLETT, C.; BANTA, S.; BROZIK, S.; BARTON, S. C.; COONEY, M.; LIAW, B. Y.; MUKERJEE, S.; MINTEER, S. D. Enzymatic biofuel cells. **Electrochemical Society Interface**, v. 16, n. 2, p. 28-31, 2007.
23. KATZ, E.; ATANASSOV, P. Biofuel cells. **Electroanalysis**, v. 22, p. 723-724, 2010.
24. 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.
25. CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTO, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. **Journal Physical Chemistry B**, v. 110, n. 35, p. 17478-17483, 2006.
26. CRESPILO, F. N.; NART, F. C.; OLIVEIRA, O. N.; BRETT, C. M. A. Oxygen reduction and diffusion in electroactive nanostructured membranes (ENM) using a layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle approach. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 14, p. 4649-4653, 2007.
27. CRESPILO, F. N.; LANFREDI, A. J. C.; LEITE, E. R.; CHIQUITO, A. J. Development of individual semiconductor nanowire for bioelectrochemical device at low overpotential conditions. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 9, p. 1744-1747, 2009.
28. POTTER, M. C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 84, n. 571, p. 260-276, 1911.
29. CHAUDHURI, S. K.; LOVLEY, D. R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1229-1232, 2003.
30. CHA, J.; CHOI, S.; YU, H.; KIM, H.; KIM, C. Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. **Bioelectrochemistry**, v. 78, n. 1, p. 72-79, 2010.
31. HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; DE LOS RÍOS, A. P.; SALAR-GARCÍA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; LOZANO-BLANCO, L. J.; GODÍNEZ, C.; TOMÁS-ALONSO, F.; MEDINA-QUESADA, J. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p. 284-297, 2015.

32. OLIVEIRA, V. B.; SIMÕES, M.; MELO, L. F.; PINTO, A. M. F. R. Overview on the developments of microbial fuel cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 73, n. 15, p. 53-64, 2013.
33. RABAEY, K.; ROZENDAL, R. A. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 706-716, 2010.
34. MINTEER, S. D.; ATANASSOV, P.; LUCKARIFT, H. R.; JOHNSON, G. R. New materials for biological fuel cells. **Materials Today**, v. 15, n. 4, p. 166-173, 2012.
35. LIU, X.-W.; CHEN, J.-J.; HUANG, Y.-X.; SUN, X.-F.; SHENG, G.-P.; LI, D.-B.; XIONG, L.; ZHANG, Y.-Y.; ZHAO, F.; YU, H.-Q. Experimental and theoretical demonstrations for the mechanism behind enhanced microbial electron transfer by CNT network. **Scientific Reports**, v. 4, n. 3732, p. 1-7, 2014.
36. TONIATO, Juliano. **Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2013.
37. DRAPCHO, C. M.; NHUAN, N. P.; WALKER, T. H. **Biofuels engineering process technology**. New York: McGraw-Hill, 2008. 371 p.
38. DARÉ, Raul Marcel. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
39. YAN, Y. M.; BARAVIK, I.; TEL-VERED, R.; WILLNER, I. An ethanol/O₂ biofuel cell based on an electropolymerized bilirubin oxidase/Pt nanoparticle bioelectrocatalytic O₂-reduction cathode. **Advanced Materials**, v. 21, n. 42, p. 4275-4279, 2009.
40. AKERS, N. L.; MOORE, C. M.; MINTEER, S. D. Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 12, p. 2521-2525, 2005.
41. GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546,563-567, 1996.

42. SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 3-41, 2002.
43. DE SMIDT, O.; DU PREEZ, J. C.; ALBERTYN, J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 967-978, 2008.
44. MOORE, C. M.; MINTEER, S. D.; MARTIN, R. S. Microchip-based ethanol/oxygen biofuel cell. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 2, p. 218-225, 2005.
45. FISHILEVICH, S.; AMIR, L.; FRIDMAN, Y.; AHARONI, A.; ALFONTA, L. Surface display of redox enzymes in microbial fuel cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 34, p. 12052-12053, 2009.
46. PAZUR, J. H.; KLEPPE, K. The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, v. 3, n. 4, p. 578-583, 1964.
47. IVNITSKI, D.; BRANCH, B.; ATANASSOV, P.; APBLETT, C. Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. **Electrochemistry Communication**, v. 8, n. 8, p. 1204-1210, 2006.
48. HELLER, A. Miniature biofuel cells. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 2, p. 209-216, 2004.
49. 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.
50. LEECH, D.; KAVANAGH, P.; SCHUHMANN, W. Enzymatic fuel cells: recent progress. **Electrochimica Acta**, v. 84, n. 1, p. 223-234, 2012.
51. GUPTA, G.; LAU, C.; BRANCH, B.; RAJENDRAN, V.; IVNITSKI, D.; ATANASSOV, P. Direct bio-electrocatalysis by multi-copper oxidases: gas-diffusion laccase-catalyzed cathodes for biofuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 28, p. 10767-10771, 2011.
52. GUPTA, G.; LAU, C.; RAJENDRAN, V.; COLON, F.; BRANCH, B.; IVNITSKI, D.; ATANASSOV, P. Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 3, p. 247-249, 2011.

53. IVNITSKI, D.; ATANASSOV, P. Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. **Electroanalysis**, v. 19, n. 22, p. 2307-2313, 2007.
54. IVNITSKI, D. M.; KHRIPIN, C.; LUCKARIFT, H. R.; JOHNSON, G. R.; ATANASSOV, P. Surface characterization and direct bioelectrocatalysis of multicopper oxidases. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 24, p. 7385-7393, 2010.
55. IVNITSKI, D.; ARTYUSHKOVA, K.; ATANASSOV, P. Surface characterization and direct electrochemistry of redox copper centers of bilirubin oxidase from fungi *Myrothecium verrucaria*. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 1, p. 101-110, 2008.
56. SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, 1996.
57. MURAO, S.; TANAKA, N. A new enzyme 'bilirubin oxidase' produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 2383-2384, 1981.
58. DOS SANTOS, L.; CLIMENT, V.; BLANFORD, C. F.; ARMSTRONG, F. A. Mechanistic studies of the 'blue' Cu enzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 42, p. 13962-13974, 2010.
59. CRACKNELL, J. A.; MCNAMARA, T. P.; LOWE, E. D.; BLANFORD, C. F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 25, p. 6668-6675, 2011.
60. FLEXER, V.; DURAND, F.; TSUJIMURA, S.; MANO, N. Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 14, p. 5721-5727, 2011.
61. SANTORO, C.; BABANOVA, S.; ERABLE, B.; SCHULER, A.; ATANASSOV, P. Bilirubin oxidase based enzymatic air-breathing cathode: operation under pristine and contaminated conditions. **Bioelectrochemistry**, v. 108, p. 1-7, 2016.
62. SHLEEV, S.; TKAC, J.; CHRISTENSON, A.; RUZGAS, T.; YAROLOV, A. I.; WHITTAKER, J. W.; GORTON, L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2517-2554, 2005.

63. CHRISTENSON, A.; SHLEEV, S.; MANO, N.; HELLER, A.; GORTON, L. Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 12, p. 1634-1641, 2006.
64. 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.
65. BRÄNDÉN, C.-I.; JÜRNVAL, H.; EKLUND, H.; FURUGREN, B. Alcohol dehydrogenases. In: BOYER, P. D. (Ed.). **The enzymes**. New York: Elsevier, 1975. v. 11, p. 103-190.
66. NEGELEIN, E.; WULFF, H.-J. Diphosphopyridinprotein alcohol, acetaldehyd. **Biochemische Zeitschrift**, v. 293, p. 351-389, 1937.
67. PRESEČKI, A. V.; VASIĆ-RAČKI, D. Modelling of the alcohol dehydrogenase production in baker's yeast. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2781-2791, 2005.
68. LESKOVAC, V.; TRIVIĆ, S.; LATKOVSKA, M. State and accessibility of zinc in yeast alcohol dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 155, n. 1, p. 155-161, 1976.
69. TRIVIĆ, S.; LESKOVAC, V. Structure and function of yeast alcohol dehydrogenase. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 65, n. 4, p. 207-227, 2000.
70. RAJ, S. B.; RAMASWAMY, S.; PLAPP, B. V. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. **Biochemistry**, v. 53, n. 36, p. 5791-5803, 2014.
71. LESKOVAC, V.; TRIVIĆ, S.; PERIČIN, D. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 481-494, 2002.
72. LESKOVAC, V.; TRIVIĆ, S.; PERIČIN, D.; POPOVIĆ, M.; KANDRAČ, J. Binding of coenzymes to yeast alcohol dehydrogenase. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 2, p. 185-194, 2010.
73. DICKINSON, F. M.; MONGER, G. P. A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with a variety of substrates. **Biochemical Journal**, v. 131, n. 2, p. 261-270, 1973.

74. DICKENSON, C. J.; DICKINSON, F. M. A study of the pH- and temperature-dependence of the reactions of yeast alcohol dehydrogenase with ethanol, acetaldehyde and butyraldehyde as substrates. **Biochemical Journal**, v. 147, n. 2, p. 303-311, 1975.
75. YAMADA, T.; YAMATO, M. Interaction of yeast alcohol dehydrogenase with various substrates. I. Binding of coenzymes. **The Journal of Biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 971-984, 1973.
76. KLINMAN, J. P. Probes of mechanism and transition-state structure in the alcohol dehydrogenase reaction. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 39-78, 1981.
77. GANZHORN, A. J.; GREEN, D. W.; HERSHEY, A. D.; GOULD, R. M.; PLAPP, B. V. Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 8, p. 3754-3761, 1987.
78. ABUIN, E.; LISSI, E.; LEÓN, L. Kinetics of ethanol oxidation catalyzed by yeast alcohol dehydrogenase in aqueous solutions of sodium dodecylsulfate. **Protein Journal**, v. 27, n. 4, p. 247-252, 2008.
79. FORTI, J. C.; AQUINO NETO, S.; ZUCOLOTTI, V.; CIANCAGLINI, P.; DE ANDRADE, A. R. Development of novel bioanodes for ethanol biofuel cell using PAMAM dendrimers as matrix for enzyme immobilization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2675-2679, 2011.
80. EYS, J. V.; CIOTTI, M. M.; KAPLAN, N. O. Yeast alcohol dehydrogenase: IV. Coenzyme binding sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 231, p. 571-582, 1958.
81. GAO, F.; VIRY, L.; MAUGEY, M.; POULIN, P.; MANO, N. Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells. **Nature Communications**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2010.
82. ZEBDA, A.; GONDRAN, C.; GOFF, A. L.; HOLZINGER, M.; CINQUIN, P.; COSNIER, S. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. **Nature Communications**, v. 2, n. 370, p. 1-6, 2011.
83. KINOSHITA, K. **Carbon: electrochemical and physicochemical properties**. New York: John Wiley, 1988. 560 p.
84. EDIE, D. D. The effect of processing on the structure and properties of carbon fibers. **Carbon**, v. 36, n. 4, p. 345-362, 1998.

85. DEAN, G. D.; TURNER, P. The elastic properties of carbon fibres and their composites. **Composites**, v. 4, n. 4, p. 174-180, 1973.
86. TRAN, M. Q.; HO, K. K. C.; KALINKA, G.; SHAFFER, M. S. P.; BISMARCK, A. Carbon fibre reinforced poly(vinylidene fluoride): impact of matrix modification on fibre/polymer adhesion. **Composites Science and Technology**, v. 68, n. 7-8, p. 1766-1776, 2008.
87. PITTMAN JR, C. U.; JIANG, W.; YUE, Z. R.; GARDNER, S.; WANG, L.; TOGHIANI, H.; LEON Y LEON, C. A. Surface properties of electrochemically oxidized carbon fibers. **Carbon**, v. 37, n. 11, p. 1797-1807, 1999.
88. DONNET, J. B.; BRENDLE, M.; DHAMI, T. L.; BAHL, O. P. Plasma treatment effect on the surface energy of carbon and carbon fibers. **Carbon**, v. 24, n. 6, p. 757-770, 1986.
89. MOMMA, T.; LIU, X.; OSAKA, T.; USHIO, Y.; SAWADA, Y. Electrochemical modification of active carbon fiber electrode and its application to double-layer capacitor. **Journal of Power Sources**, v. 60, n. 2, p. 249-253, 1996.
90. ZHANG, G.; SUN, S.; YANG, D.; DODELET, J.-P.; SACHER, E. The surface analytical characterization of carbon fibers functionalized by H₂SO₄/HNO₃ treatment. **Carbon**, v. 46, n. 2, p. 196-205, 2008.
91. SZÁZDI, L.; GULYÁS, J.; PUKÁNSZKY, B. Surface characterization of electrochemically oxidized carbon fibers: surface properties and interfacial adhesion. **Composite Interfaces**, n. 9, n. 2, p. 219-232, 2002.
92. YUAN, L. Y.; CHEN, C. S.; SHYU, S. S.; LAI, J. Y. Plasma surface treatment on carbon fibers. Part 1: morphology and surface analysis of plasma etched fibers. **Composites Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 1992.
93. IVANOV, I.; VIDA KOVIĆ-KOCH, T.; SUNDMACHER, K. Recent advances in enzymatic fuel cells: experiments and modeling. **Energies**, v. 3, n. 4, p. 803-846, 2010.
94. OSMAN, M. H.; SHAH, A. A.; WALSH, F. C. Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p. 3087-3102, 2011.

95. MARTINS, M. V. A.; PEREIRA, A. R.; LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Evidence of short-range electron transfer of a redox enzyme on graphene oxide electrodes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 33, p. 17426-17436, 2014.
96. BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.
97. PAGANIN, V. A.; TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. Development and electrochemical studies of gas diffusion electrodes for polymer electrolyte fuel cells. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 26, n. 3, p. 297-304, 1996.
98. MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, 2004.
99. LESKOVAC, V.; TRIVIĆ, S.; PERIČIN, D. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 481-494, 2002.
100. LI, Q.; LUO, G.; FENG, J.; ZHOU, Q.; ZHANG, L.; ZHU, Y. Amperometric detection of glucose with glucose oxidase absorbed on porous nanocrystalline TiO₂ film. **Electroanalysis**, v. 13, n. 5, p. 413-416, 2001.
101. LIU, S.; CAI, C. Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 602, n. 1, p. 103-114, 2007.
102. SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007. 1039 p.
103. COSNIER, S.; SENILLOU, A.; GRÄTZEL, M.; COMTE, P.; VLACHOPOULOS, N.; RENAULT, J.; MARTELET, C. A glucose biosensor based on enzyme entrapment within polypyrrole films electrodeposited on mesoporous titanium dioxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 469, n. 2, p. 176-181, 1999.
104. MARSILI, E.; BARON, D. B.; SHIKHARE, I. D.; COURSOLE, D.; GRALNICK, J. A.; BOND, D. R. Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 10, p. 3968-3973, 2008.

105. CÉNAS, N. K.; POCIUS, A. K.; KULYS, J. J. Electron exchange between flavin-and heme-containing enzymes and electrodes modified by redox polymers. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 11, n. 1, p. 61-73, 1983.
106. KONTANI, A.; MASUDA, M.; MATSUMURA, H.; NAKAMURA, N.; YOHDA, M.; OHNO, H. A bioanode using thermostable alcohol dehydrogenase for an ethanol biofuel cell operating at high temperatures. **Electroanalysis**, v. 26, n. 4, p. 682-686 2014.
107. CAI, C.-X.; XUE, K.-H.; ZHOU, Y.-M.; YANG, H. Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode. **Talanta**, v. 44, n. 3, p. 339–347, 1997.
108. CHOI, H. N.; LYU, Y.-K.; HAN, J.-H.; LEE, W.-Y. Amperometric ethanol biosensor based on carbon nanotubes dispersed in sol-gel-derived titania-nafion composite film. **Electroanalysis**, v. 19, n. 14, p. 1524-1530, 2007.
109. NASRI, Z.; SHAMS, E.; AHMADI, M. Direct modification of a glassy carbon electrode with toluidine blue diazonium salt: application to NADH determination and biosensing of ethanol. **Electroanalysis**, v. 25, n. 8, p. 1917-1925, 2013.
110. SHAN, C.; YANG, H.; HAN, D.; ZHANG, Q.; IVASKA, A.; NIU, L. Electrochemical determination of NADH and ethanol based on ionic liquid-functionalized graphene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 6, p. 1504-1508, 2010.
111. LEE, C.-A.; TSAI, Y.-C. Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 138, n. 2, p. 518-523, 2009.
112. PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; GONÇALVES, A. D.; PAGNONCELLI, K. C.; CRESPILO, F. N. Bioelectrooxidation of ethanol using NAD-dependent alcohol dehydrogenase on oxidized flexible carbon fiber arrays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1698-1707, 2017.
113. TSE, D. C.-S.; KUWANA, T. Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine diphosphate with quinones and modified quinone electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 1315-1318, 1978.
114. CARLSON, B. W.; MILLER, L. L. Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 2, p. 479-485, 1985.

115. CÉNAS, N. K.; KANAPIENIENÉ, J. J.; KULYS, J. J. NADH oxidation by quinone electron acceptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 767, n. 1, p. 108-112, 1984.
116. JAEGFELDT, H.; TORSTENSSON, A. B. C.; GORTON, L. G. O.; JOHANSSON, G. Catalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by graphite electrodes modified with adsorbed aromatics containing catechol functionalities. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 1979-1982, 1981.
117. MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.
118. LI, J.; TAN, S. N.; GE, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 335, n. 1-2, p. 137-145, 1996.
119. 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.
120. LUZ, Roberto Alves de Sousa. **Influência de nanopartículas de ouro na transferência heterogênea de elétrons do citocromo c imobilizado em eletrodos de ouro**. 2014. 84 f. Tese (Doutorado em Ciência & Tecnologia - Química) - Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014.
121. MANSO, J.; MENA, M. L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 11, p. 4007-4012, 2008.
122. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2012. 1340 p.
123. ZANON, J. P.; PERES, M. F. S.; GATTÁS, E. A. L. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 466-470, 2007.
124. AQUINO NETO, S.; FORTI, J. C.; ZUCOLOTTI, V.; CIANCAGLINI, P.; DE ANDRADE, A. R. The kinetic behavior of dehydrogenase enzymes in solution and immobilized onto nanostructured carbon platforms. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2347-2352, 2011.

125. PLAPP, B. V. Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 1, p. 3-12, 2010.
126. CASTAÑÓN, M. J. L.; ORDIERES, A. J. M.; BLANCO, P. T. Amperometric detection of ethanol with poly-(o-phenylenediamine)-modified enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 6, p. 511-520, 1997.
127. WENGER, J. I.; BERNOFSKY, C. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 227, n. 3, p. 479-490, 1971.
128. TORIJA, M. J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2003.
129. WALKER, G. M. Yeast growth. In: WALKER, G. M. (Ed.). **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley, 1998. p. 101-202.
130. SOUZA, Crisla Serra. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
131. LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 6, p. 528-536, 1991.
132. AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. G. **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 93 p.
133. CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N. W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 4, p. 385-393, 2010.
134. HISS, H. Biotecnologia industrial. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Cinética de processos fermentativos**. São Paulo: Edgard Blü, 2001. p. 93-122.
135. MORRIS, E. O. Yeast Growth. In: COOK, A. H. (Ed.). **The chemistry and biology of yeasts**. New York: Academic Press, 1958. p. 251-321.

136. LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L. Cellular energetics: glycolysis, aerobic oxidation, and photosynthesis. In: LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. (Ed.). **Molecular cell biology**. New York: W. H. Freeman, 2000. Chap. 16.

137. MILESKI, João Paulo Fernando. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces***. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

138. CINELLI, Bernardo Alves. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 183 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

139. ILHA, E. C.; BERTOLDI, F. C.; REIS, V. D. A.; SANT'ANNA, E. Rendimento e eficiência da fermentação alcoólica na produção de hidromel. embrapa. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, p. 1-14, 2008.

140. VANEGAS, J. M.; CONTRERAS, M. F.; FALLER, R.; LONGO, M. L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 3, p. 507-516, 2012.

141. JONES, R. P. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 3, p. 130-153, 1989.

142. MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 829-845, 2010.

143. STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13-24, 2010.

144. AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845-864, 1968.

145. NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 1, p. 201-211, 1981.

146. SHENG, G.-P.; YU, H.-Q.; LI, X.-Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882-894, 2010.

147. SALAMA, Y.; CHENNAOUI, M.; SYLLA, A.; MOUNTADAR, M.; RIHANI, M.; ASSOBBHEI, O. Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 35, p. 16220-16237, 2016.

148. NIELSEN, P. H.; JAHN, A. Extraction of EPS. In: WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. (Ed.). **Microbial extracellular polymeric substances**: characterization, structure and function. Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. p. 49-72.

149. CHRISTENSEN, B. E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3-4, p. 181-202, 1989.

150. LAZAROVA, V.; MANEM, J. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 29, n. 10, p. 2227-2245, 1995.

151. KAPTEYN, J. C.; MONTIJN, R. C.; VINK, E.; DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A.; DOUWES, J. E.; SHIMOI, H.; LIPKE, P. N.; KLIS, F. M. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. **Glycobiology**, v. 6, n. 3, p. 337-345, 1996.

152. FLEET, G. H. Cell walls. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**: yeast technology. London: Academic Press, 1991. p. 199-277.

153. KÓLLAR, R.; PETRÁKOVÁ, E.; ASHWELL, G.; ROBBINS, P. W.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall the linkage between chitin and β (1-3)-glucan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 3, p. 1170-1178, 1995.

154. REST, M. E. V. D.; KAMMINGA, A. H.; NAKANO, A.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 59, n. 2, p. 304-322, 1995.

155. ZINSER, E.; SPERKA-GOTTLIEB, C. D.; FASCH, E. V.; KOHLWEIN, S. D.; PALTAUF, F.; DAUM, G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 6, p. 2026-2034, 1991.

156. CHENG, Q.; MICHELS, C. A. MAL11 and MAL61 encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1817-1820, 1991.
157. TSUJIMURA, S.; KANO, K.; IKEDA, T. Bilirubin oxidase in multiple layers catalyzes four-electron reduction of dioxygen to water without redox mediators. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 576, n. 1, p. 113-120, 2005.
158. HORST, A. E. W.; MANGOLD, K.-M.; HOLTSMANN, D. Application of gas diffusion electrodes in bioelectrochemical syntheses and energy conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 260-267, 2016.
159. RINCÓN, R. A.; LAU, C.; LUCKARIFT, H. R.; GARCIA, K. E.; ADKINS, E.; JOHNSON, G. R.; ATANASSOV, P. Enzymatic fuel cells: integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 132-136, 2011.