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

Fernanda Cristina Pena Ferreira Sales

**Desenvolvimento de bioeletrodos miniaturizados para a aplicação em biocélulas a
combustível implantáveis**

São Carlos - SP

2017

Fernanda Cristina Pena Ferreira Sales

**Desenvolvimento de bioeletrodos miniaturizados para a aplicação em biocélulas a
combustível implantáveis**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos,
da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor 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 - SP

2017

Dedico

*Ao meu marido Luís Henrique, que de
uma forma especial e carinhosa, me
incentivou e apoiou nos momentos
difíceis desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me abençoar todos os dias e me dar força, coragem e saúde para poder alcançar meus sonhos.

Ao meu companheiro, Luís Henrique, pelo apoio, carinho e paciência em todos os momentos desta jornada.

Ao meu pai, Carlos, e aos meus avós maternos, Teresa e João, e familiares, que me ensinaram a lutar pelos meus objetivos.

À minha mãe, Célia, e à minha sogra, Sandra, que muitas vezes foram mais que mães, me aconselhando a sempre seguir em frente, independente dos obstáculos que surgiram durante este percurso.

Ao meu professor Frank, que teve paciência em me orientar durante o desenvolvimento desta pesquisa e, também, pelas longas conversas e discussões, as quais proporcionaram o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao técnico Eduardo, pela ajuda no desenvolvimento deste estudo.

Ao professor Carlos Constantino, que disponibilizou seu laboratório para realizar os estudos no micro-Ramam, e à doutoranda Cibele, pela ajuda na utilização desse equipamento.

Aos amigos e colegas do grupo de bioeletroquímica e interfaces, pelas discussões científicas e companheirismo nesses anos.

A todos os meus amigos pelas alegrias e tristezas compartilhadas.

Aos médicos Eduardo Schor, Rita Crestanha, Claudia Curvo, Valter Fausto, Carlos Malagutti, Tatiana Nagliati, Renata Lacerda, Vanessa Goldin e Soraia Jürgensen, que, com suas habilidades e orientações, me ajudaram a superar os momentos mais difíceis deste percurso.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), pela infraestrutura fornecida, à Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) e ao Programa de Pós-Graduação em Química. Aos professores e funcionários, em especial ao técnico Carlos Bento, que colaboraram direta ou indiretamente para minha formação profissional.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida para realização deste trabalho.

“A sabedoria é a coisa principal: adquiere,
pois, a sabedoria; sim, com tudo o que
possuis adquiere o conhecimento”
(Provérbios 4:7).

GLOSSÁRIO

ABTS²⁻ – (do inglês, *2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt*)

BOx – Bilirrubina Oxidase (do inglês, *Bilirubin Oxidase*)

BSA – Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

BFC – Biocélula a Combustível (do inglês, *Biofuel Cell*)

CV – Carbono Vítreo

EDC (do inglês, *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride*)

FAD – Dinucleótido de Flavina e Adenina (do inglês, *Flavin Adenine Dinucleotide*)

FC – Célula a Combustível (do inglês, *Fuel Cell*)

FCF – Fibras Flexíveis de Carbono (do inglês, *Flexible Carbon Fiber*)

FePhenTPy – (do inglês, *5-[2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl]-1,10-phenanthroline iron (III) choride*)

GA – Glutaraldeído (do inglês, *Glutaraldehyde*)

GDh – Glicose Desidrogenase (do inglês, *Glucose Dehydrogenase*)

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

NAD – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NADP⁺ – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NR – Vermelho Neutro (do inglês, *Neutral Red*)

OCP – Potencial de Circuito Aberto (do inglês, *Open Circuit Potential*)

OCV – Tensão de Circuito Aberto (do inglês, *Open Circuit Voltage*)

PAH – Poli(Alilamina Hidroclorada) (do inglês, *Poly(Allylamine Hydrochloride)*)

PNR – Poli(Vermelho Neutro) (do inglês, *Poly(Neutral Red)*)

PLQ – (do inglês, *1,10-phenanthroline-5,6-dione*)

TA – Tratamento Ácido

TO – Tratamento Oxidativo

A – Área geométrica do eletrodo

ΔE – Variação dos potenciais anódicos e catódicos

E – Potencial

E_c – Potencial da reação catódica

E_a – Potencial da reação anódica

E_{pc} – Potencial de pico catódico

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{onset} – Potencial de *onset*

E_{2g} – Modo vibracional do grafite monocristalino

h – altura

I – Corrente

I_{pc} – Corrente de pico catódico

I_{pa} – Corrente de pico anódico

I_D – Intensidade da banda D

I_G – Intensidade da banda G

j – Densidade de corrente

j_{pa} – Densidade de corrente de pico anódico

l – largura

L_a – Tamanho do cristalito

P_{cell} – Potência da BFC

Q – Carga

R_e – Resistência

λ_L – Comprimento de onda do laser

Γ – Quantidade de espécie eletroativa por área do eletrodo

RESUMO

As biocélulas a combustível enzimáticas (BFC) são dispositivos eletroquímicos que convertem energia química em energia elétrica, utilizando enzimas como biocatalisadores. Quando miniaturizada, uma BFC pode ser implantada em animais vertebrados e invertebrados, vislumbrando-se sua utilização na produção de energia elétrica para alimentar microdispositivos biomédicos e microsensores em pequenos insetos. No entanto, ainda é um desafio obter BFC implantáveis e miniaturizadas, com uma potência suficiente (dezenas de microwatts) para alimentar microcircuitos eletrônicos de maneira estável e em longo prazo. Diante do exposto, esta tese de doutorado apresenta um estudo das propriedades eletroquímicas de eletrodos enzimáticos, visando a aplicação em BFC de glicose/O₂ miniaturizadas e implantáveis. Para isso, utilizaram-se fibras flexíveis de carbono (FCFs) modificadas com as enzimas bilirrubina oxidase (BOx) no cátodo e glicose desidrogenase (GDh) NAD-dependente no ânodo, a fim de se obter a redução de O₂ e a oxidação de glicose, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que FCFs previamente submetidas a um tratamento químico de oxidação com permanganato de potássio e com posterior eletrodepolimerização do mediador vermelho neutro produzem bioânodos estáveis e robustos. Estes eletrodos, combinados com biocátodos compostos por FCFs na ausência de mediadores redox, foram utilizados em BFC miniaturizadas, que foram implantadas em formigas da espécie *Atta sexdens rubrapilosa*. A potência máxima da BFC operando *in vivo* foi $13,5 \pm 4 \mu\text{W cm}^{-2}$ em $190 \pm 59 \text{ mV}$, com corrente máxima de $143 \pm 40 \mu\text{A cm}^{-2}$ e a tensão de circuito aberto de $260 \pm 100 \text{ mV}$. Acredita-se que estes valores ainda possam ser otimizados e este trabalho contribui para mostrar que a flexibilidade das FCF, a presença de um mediador de elétrons polimérico no ânodo, o uso do tratamento químico de oxidação com permanganato de potássio das fibras e a miniaturização dos eletrodos são elementos importantes, e que podem ser considerados no desenvolvimento de biocélulas a combustível implantáveis.

Palavras-chave: glicose desidrogenase, bilirrubina oxidase, biocélula a combustível implantável.

ABSTRACT

Enzymatic biofuel cells (BFC) are electrochemical devices that convert chemical energy into electrical energy using enzymes as biocatalysts. When miniaturized, BFC can be implanted in vertebrate and invertebrate animals and, their use to produce electrical energy to feed biomedical microdevices and micro-sensors in small insects can be observed. However, it is still challenging to obtain implantable and miniaturized BFC, with sufficient power (tens of microwatts) to power electronic microcircuits in a stable and long-term manner. In view of the above, this PhD thesis presents a study of the electrochemical properties of enzymatic electrodes, aiming to use them in miniaturized and implantable glucose/O₂ BFC. In order to obtain a reduction in O₂ and oxidation of glucose, flexible carbon fibers (FCFs) modified with bilirubin oxidase (BOx) enzymes in the cathode and glucose dehydrogenase (GDh) at the anode, respectively, were used. The results show that FCFs previously submitted to a chemical treatment of oxidation with potassium permanganate and, subsequently, electropolymerization of the neutral red mediator produce stable and robust bioanodes. These electrodes, combined with biocathodes consisting of FCFs in the absence of redox mediators, were used in miniaturized BFC, which were implanted in *Atta sexdens rubropilosa* ant species. The BFC maximum power source, operating in vivo, was $13.5 \pm 4 \mu\text{W cm}^{-2}$ at $190 \pm 59 \text{ mV}$, with a maximum current of $143 \pm 40 \mu\text{A cm}^{-2}$ and the open circuit voltage was $260 \pm 100 \text{ mV}$. Although these values can be optimized, this research shows that the flexibility of the FCF, the presence of a polymer electron mediator on the anode, using the chemical treatment of oxidation with potassium permanganate of the fibers and electrode miniaturization are important elements, which can be considered in the development of implantable biofuel cells.

Keywords: glucose dehydrogenase, bilirubin oxidase, implantable biofuel cell.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de uma biocélula a combustível operando na presença de sangue (figura idealizada pela revista fapesp).....	18
Figura 2 – Fórmula química estrutural (PDB: 1GCO) e reação no grupo nicotinamida da coenzima NAD ⁺	21
Figura 3 – a) Representação cristalográfica da enzima GDh (PDB: 1GCO); b) fórmula química estrutural da coenzima NAD ⁺ localizada no interior da estrutura proteica da enzima e c) interação da coenzima com os resíduos de aminoácidos.....	21
Figura 4 – Representação esquemática da reação química que ocorre no interior da enzima BOx (PDB: 2XLL).....	22
Figura 5 – a) Representação cristalográfica da enzima BOx (PDB: 2XLL); b) localização do cofator Cu ⁺ no interior da estrutura da proteína e c) Representação esquemática da transferência eletrônica entre o cofator enzimático da bilirrubina oxidase e o eletrodo de FCF.....	23
Figura 6 – Fluxograma das etapas para preparar os eletrodos.....	26
Figura 7 – Representação esquemática das etapas para a preparação dos biocátodos referentes aos métodos 2 ou 3; (14 mg mL ⁻¹ de BOx; 2,5% de glutaraldeído (GA); 2,5% de Náíon®; 3,5 mg mL ⁻¹ de uma suspensão de carbono; 2,4 mg mL ⁻¹ de ABTS ²⁻ ; solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4) (PB).....	30
Figura 8 – Imagem da cela eletroquímica desenvolvida para o estudo de meia-cela. a) cela eletroquímica composta por um borbulhador de gás, um saturador, um contra-eletrodo (CE), um eletrodo de referência (ER) e um eletrodo de trabalho (ET); b) zoom da região da cela com os três eletrodos e c) eletrodo de FCF dentro de um capilar de vidro.....	31
Figura 9 – Representação esquemática do implante da BFC de glicose/O ₂ inserida na cabeça da formiga, utilizando dois capilares de vidro contendo um biânodo e um biocátodo.....	32
Figura 10 – Imagens de FEG-SEM e voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s ⁻¹ das FCF antes do tratamento químico (linha azul) e após o tratamento ácido (linha preta) e o tratamento oxidativo (linha vermelha) na presença de 5,0 mmol L ⁻¹ de Fe(CN) ₆ ⁴⁻ /Fe(CN) ₆ ³⁻ . Eletrólito: KCl 0,5 mol L ⁻¹ ; temperatura ambiente.....	36
Figura 11 – Espectros de Raman das fibras flexíveis de carbono. a) sem tratamento (FCF) e com tratamento químico (FCF-TO e FCF-TA); b) <i>fitting</i> de FCF; c) <i>fitting</i> de FCF-TO; d) <i>fitting</i> de FCF-TA. Laser = 514 nm, range = 100 – 4000 cm ⁻¹ e 10 acumulações.....	38
Figura 12 – Eletropolimerização do NR nas FCFs: 1,0 mmol L ⁻¹ de monômero em 25 mmol L ⁻¹ de solução tampão fosfato de potássio e 100 mmol L ⁻¹ KNO ₃ . Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ ; 15 ciclos voltamétricos; a) PNR nas FCF-TO; b) PNR nas FCF-TA.....	40

- Figura 13** – Eletropolimerização do NR nas FCFs. **a-c)** Voltamogramas cíclicos de polimerização do NR em 3 eletrodos FCF-TO; **d)** Estatística do pico 1 de formação do PNR das densidades de corrente em função de o número de ciclos voltamétricos desses eletrodos com PNR. Eletrólito: 1,0 mmol L⁻¹ do monômero em 25 mmol L⁻¹ de solução tampão fosfato de potássio e 100 mmol L⁻¹ KNO₃; velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹; temperatura ambiente.....42
- Figura 14** – Comparação dos voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ dos eletrodos FCF-TO (linha preta), FCF-TO-PNR15 (linha vermelha) e FCF-TO-PNR100 (linha azul). Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4 e 0,1 mol L⁻¹); temperatura ambiente.....43
- Figura 15** – Voltamogramas cíclicos a 50 mV s⁻¹ dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100 em diferentes concentrações de NADH. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....44
- Figura 16** – Comparação das densidades de corrente em 800 mV dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100 em diferentes concentrações de NADH.....45
- Figura 17** – Oxidação do NADH. Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ na presença (em azul) e ausência (em vermelho) de NADH dos eletrodos **a)** FCF-TO-PNR15, **b)** FCF-TO-PNR100 e **c)** FCF-TO; **d)** comparação da eletro-oxidação do NADH nos eletrodos FCF-TO (em preto), FCF-TO-PNR15 (em vermelho) e FCF-TO-PNR100 (em azul). Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), concentração de NADH = 10 mmol L⁻¹, temperatura ambiente.....46
- Figura 18** – **a)** Curvas de polarização obtidas com os eletrodos FCF-TO, FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100 na presença e na ausência de NADH; **b)** “zoom” da região indicada no gráfico a. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) na presença de NADH (10 mmol L⁻¹), temperatura ambiente.....48
- Figura 19** – Fórmula estrutural **a)** do glutaraldeído e **b)** da lisina.....48
- Figura 20** – Representação cristalográfica dos resíduos de aminoácidos presentes **a)** na enzima GDh (PDB: 1GCO) e **b)** no BSA (PDB: 3V03). Destaque dos grupos lisina (em azul), **c)** da GDh e **d)** do BSA.....49
- Figura 21** – Representação esquemática da transferência de elétrons entre a coenzima reduzida NADH o eletrodo de FCF modificado com PNR utilizando a enzima GDh NAD-dependente (PDB: 1GCO) para catalisar a reação de oxidação da β-D-glicose.....50
- Figura 22** – Voltamogramas lineares a 5,0 mV s⁻¹ dos bioânodos **a)** FCF-TO-PNR15/GDh e **b)** FCF-TA-PNR15/GDh, na ausência (em preto) e com adições sucessivas de glicose. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,4); Concentração de NAD⁺ = 10 mmol L⁻¹; Temperatura ambiente. Gráficos da densidade de corrente em 400 mV em função de concentração de glicose. **c)** FCF-TO-PNR15/GDh e **d)** FCF-TA-PNR15/GDh.....51
- Figura 23** – Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ dos bioânodos **a)** FCF-TO-PNR15/GDh, **b)** FCF-TO-PNR100/GDh, **a)** FCF-TA-PNR15/GDh e **b)** FCF-TA-PNR100/GDh, na ausência (em preto) e com adições sucessivas de glicose. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4); temperatura ambiente.....53

Figura 24 – Curva de polarização dos bioânodos em diferentes concentrações de glicose. **a)** FCF-TO-PNR15/GDh, **b)** FCF-TO-PNR100/GDh, **c)** FCF-TA-PNR15/GDh e **d)** FCF-TA-PNR100/GDh. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....54

Figura 25 – Comparação da variação das densidades de corrente de oxidação dos bioânodos (FCF-TO-PNR15/GDh, FCF-TA-PNR15/GDh, FCF-TO-PNR100/GDh e FCF-TA-PNR100/GDh) em diferentes concentrações de glicose. **a)** em 0,0 V e **b)** em 400 mV.....56

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ das FCFs na ausência (linha vermelha) e na presença (linha preta) de 0,5 mmol L⁻¹ de ABTS²⁻. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....58

Figura 27 - Representação esquemática da protonação e desprotonação do ABTS²⁻/ABTS⁻/ABTS.....59

Figura 28 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ dos eletrodos FCF-TO e CV para a redução de oxigênio na ausência (linha preta) e na presença de 0,5 mmol L⁻¹ do mediador ABTS²⁻ (linha vermelha) e 0,11 μmol L⁻¹ de BOx com o ABTS²⁻ (linha azul). **a)** eletrodo FCF-TO e **b)** eletrodo CV. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....59

Figura 29 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ dos eletrodos FCF-TO e CV para a redução de oxigênio. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) na presença de 0,5 mmol L⁻¹ do mediador ABTS²⁻ e 0,11 μmol L⁻¹ da enzima BOx, temperatura ambiente.....61

Figura 30 – Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ dos eletrodos FCF-TO-ABTS²⁻ e FCF-TO-ABTS²⁻/BOx na presença de O₂. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....62

Figura 31 – Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ do eletrodo FCF-TO-ABTS²⁻/BOx durante 3 ciclos voltamétricos na presença de O₂. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....62

Figura 32 – **a)** Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ e **b)** curva de polarização dos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-ABTS²⁻/BOx, submetidos ao método de imobilização 3.5.2, na presença de O₂ e de argônio. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹); temperatura ambiente.....63

Figura 33 – **a)** Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ e **b)** curva de polarização dos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-BOx, submetidos ao método de imobilização 3.5.3, na presença de argônio e de oxigênio. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....65

Figura 34 – Vantagens e desvantagens dos métodos utilizados para a imobilização da enzima e do mediador na superfície dos eletrodos.....66

- Figura 35** – a) OCP dos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-BOx, na presença de oxigênio de argônio e b) cronoamperograma do biocátodo FCF-TO-BOx na presença simultânea desses gases. Potencial aplicado: 0,0 V. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.....66
- Figura 36** – Diagrama eletroquímico genérico das semi-reações, utilizando o bioânodo FCF-TO-PNR15-GDh (linha vermelha) e do biocátodo FCF-TO-BOx (linha azul).....69
- Figura 37** – Curva de potência e corrente em função de tensão da BFC *in vitro*. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), concentração de glicose: 50 mmol L⁻¹ e temperatura ambiente.....69
- Figura 38** – Imagens dos bioeletrodos de fibras flexíveis de carbono inseridos em capilares de vidro, que foram utilizados no desenvolvimento das BFC implantáveis.....71
- Figura 39** – Imagem do suporte desenvolvido para fixar o inseto e conectar a BFC implantável ao potenciostato. a) BFC implantada na cabeça da formiga e conectada ao potenciostato para a realização dos estudos *in vivo* e b) *zoom* do suporte onde foi fixada a formiga.....71
- Figura 40** – Imagens da formiga viva com a BFC operando em sua cabeça. a) Vista lateral, b) Vista superior, b) Vista frontal e d) *zoom* da formiga com o bioânodo e o biocátodo inseridos em capilares de vidro e implantados em sua cabeça.....72
- Figura 41** – Curvas de potência e corrente em função de tensão da BFC *in vivo*. a) desempenho da BFC *in vivo* na formiga 1; b) desempenho da BFC *in vivo* na formiga 2; c) desempenho da BFC *in vivo* na formiga 1 e d) Comparação dos parâmetros eletroquímicos das BFC *in vivo*.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos em BFC implantáveis.....	19
Tabela 2 – Parâmetros eletroquímicos dos voltamogramas de varredura cíclica referentes aos eletrodos FCF, FCF-TO e FCF-TA.....	36
Tabela 3 – Análises Raman – relação I_D/I_G , tamanho do cristalito e contribuição das bandas de segunda ordem (G', D'', 2D') das fibras sem e com tratamento.....	39
Tabela 4 – Parâmetros obtidos a partir da integração dos processos faradaico referente ao processo de oxidação em potenciais negativos dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100.....	42
Tabela 5 – Parâmetros eletroquímicos das BFC <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Biocélulas a combustível enzimáticas	17
1.2 Biocélulas a combustível implantáveis.....	18
1.3 Enzimas oxirredutases	20
2 OBJETIVOS	24
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
3.1 Materiais e reagentes	26
3.2 Tratamento químico das FCFs.....	27
3.2.1 Tratamento oxidativo – $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	27
3.2.2 Tratamento ácido – $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$	27
3.3 Eletropolimerização do NR	28
3.4 Preparação do bioânodo.....	28
3.5 Preparação do biocátodo.....	29
3.5.1 Imobilização enzimática – método 1	29
3.5.2 Imobilização enzimática – método 2	29
3.5.3 Imobilização enzimática – método 3	29
3.6 Desenvolvimento da cela eletroquímica para estudo do biocátodo.....	30
3.7 Desenvolvimento da BFC implantável: Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	31
3.7.1 Estudo <i>in vitro</i>	31
3.7.2 Estudo <i>in vivo</i>	31
4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	33
4.1 Microscopia eletrônica de varredura	33
4.2 Voltametria cíclica e linear.....	33
4.3 Cronoamperimetria e curvas de polarização	33
4.4 Espectrofotometria de micro-Raman.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Tratamentos químicos na superfície das fibras flexíveis de carbono	35
5.2 Desenvolvimento de bioânodos para a oxidação de glicose	39
5.2.1 Eletropolimerização do NR	39
5.2.2 Oxidação de NADH.....	43
5.2.3 Oxidação de glicose.....	48

5.2.3.1 Preparação dos bioânodos implantáveis	51
5.3 Desenvolvimento de biocátodos para a redução de O ₂	57
5.3.1 Caracterização do ABTS ²⁻ e da BOx em solução	57
5.3.2 Biocátodos com ABTS ²⁻ e BOx imobilizados.....	61
5.3.3 Biocátodos com a BOx imobilizada na ausência de ABTS ²⁻	64
5.4 BFC <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	67
5.4.1 BFC <i>in vitro</i>	67
5.4.2 BFC <i>in vivo</i>	70
6 CONCLUSÃO.....	75
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	76
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO	77
Participação e apresentação de trabalhos em reuniões científicas.....	77
Premiação	78
Artigos	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocélulas a combustível enzimáticas

A célula a combustível é conhecida desde 1839, quando Grove e Schoenbein demonstraram o conceito de conversão de energia química em energia elétrica^{1, 2}. A reação eletroquímica ocorre em dois eletrodos, o ânodo e o cátodo, que são responsáveis pela oxidação do combustível e pela redução do oxidante, respectivamente. No entanto, podem ocorrer limitações no desempenho das células a combustível. Quando isso acontece, os eletrodos geralmente são revestidos com eletrocatalisadores como platina, óxidos metálicos e ligas metálicas para acelerar as reações eletroquímicas³. A biocélula a combustível enzimática (BFC, do inglês, *Biofuel Cell*) opera de maneira similar à célula a combustível, porém, utiliza-se enzimas^{3, 4} como eletrocatalisadores. Uma BFC possui dois eletrodos bioeletrocatalíticos, um para a oxidação dos compostos orgânicos⁵⁻⁹ e outro para redução de O₂¹⁰⁻¹⁶, ou outro oxidante, como peróxido de hidrogênio¹⁷⁻¹⁹. No caso de BFC, as enzimas imobilizadas na superfície dos eletrodos são responsáveis por acelerar a reação eletroquímica. Sabe-se que enzimas são conhecidas por sua específica atividade biocatalítica, que as qualifica como interessantes para desenvolver biodispositivos. Por sua vez, os biodispositivos baseados em enzimas como BFC e biossensores, encontram-se na aplicação em aparelhos implantáveis (Figura 1), servindo tanto para utilização na medicina²⁰, como também no monitoramento ambiental, resguardadas as especificações.

As BFC vêm sendo relatadas desde 1960²¹, com estudos que englobam: os mecanismos das reações catalisadas por enzimas^{22, 23}, desenvolvimento de novos biomateriais²⁴⁻²⁸, modificação enzimática²⁹⁻³³, métodos de imobilização³³⁻⁴⁰ e estrutura de eletrodos⁴¹. Também, ao longo das últimas décadas, vários trabalhos abordaram^{3, 9, 42, 43} a importância da interface do eletrodo condutor/biocatalisador, principalmente aqueles relacionados à transferência eletrônica entre eletrodos e enzimas, onde é abordada a transferência direta ou mediada. No entanto, aplicações práticas ainda requerem atenção considerável em relação aos problemas das BFC, como operação em longo prazo, miniaturização e eficiência na conversão energética^{9, 40, 44}.

Dentre os combustíveis aplicáveis em BFC, a glicose foi explorada⁴⁵, pois apresenta a vantagem de estar presente nos fluidos biológicos de organismos vivos.

Figura 1 – Esquema de uma biocélula a combustível operando na presença de sangue (figura idealizada pela revista fapesp).

Fonte: Revista Pesquisa FAPESP, 2013, p. 74 e 75 (com autorização).

1.2 Biocélulas a combustível implantáveis

As principais características em uma BFC implantável são o tamanho e a eficiência biocatalítica. Uma questão associada à complexidade das BFC implantáveis é o próprio processo de implante em si, que envolve procedimentos cirúrgicos com intuito de alojar o biodispositivo em determinada região do organismo. Os implantes biônicos^{46, 47}, tais como biosensores e bioeletrônicos implantáveis, requerem energia, e as biocélulas a combustível enzimáticas podem ser usadas para esse propósito. A miniaturização de BFC tem sido reportada desde 2001^{48, 49} e diversos dispositivos bioeletrônicos têm sido propostos, tais como implantes em lagosta⁵⁰, barata⁵¹, laranja⁵², caracol⁵³, moluscos⁵⁴, plantas⁵⁵ e mamíferos⁵⁶⁻⁵⁹. Como um exemplo de aplicação, uma BFC implantável em sua configuração micrométrica pode ser integrada a um organismo vivo para o monitoramento ambiental. Também, o desenvolvimento de circuitos biônicos, que opera em baixa potência⁴⁹, poderia ser bem empregado com as características das BFC, que são fontes de energia tipicamente de baixa potência. O desenvolvimento de dispositivos eficientes miniaturizados é um desafio. Para isso, o uso de carbono como material para preparação de eletrodos é importante neste contexto.

Para uma BFC implantável, bioeletrodos flexíveis são interessantes porque eles podem ser manipulados e implantados dentro de organismos vivos⁶⁰⁻⁶². Como os eletrodos de

carbono podem ser miniaturizados, aqueles que são baseados em fibras flexíveis de carbono são promissores para operações em sistemas vivos pequenos.

A Tabela 1 apresenta os trabalhos na literatura em BFC implantáveis por diferentes grupos de pesquisa em ordem cronológica, destacando sua potência.

Tabela 1 – Estudos em BFC implantáveis.

Ano	Grupo	Local do Implante	Potência
2010	Cosnier ⁵⁷	retoperitoneal do Rato	2 μW
2011	Nishizawa ⁶²	Veia do ouvido do rato	115 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2012	Katz ⁵³	Caramujo	30 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2012	Scherson ⁵¹	Barata	55 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2012	Katz ⁵⁴	Molusco	40 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2013	Crespilho ⁵⁹	Veia do Rato	95 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2013	Cosnier ⁵⁸	Abdômen do Rato	193 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2013	Shleev ⁶³	Cérebro do Rato	2 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2013	Katz ⁵⁶	Tecido cremaster do rato	70 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2013	Katz ⁵⁰	Lagosta	640 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2016	Morishima ⁶⁴	Barata	285 $\mu\text{W cm}^{-2}$
2016	Yu ⁶⁵	Soro humano	16 $\mu\text{W cm}^{-2}$

Fonte: Autoria própria.

Embora o aumento da potência das BFC seja uma das principais buscas dos pesquisadores, a miniaturização⁴⁸ e os procedimentos de implantes cirúrgicos^{43,44} têm sido abordados na literatura. Heller e coautores⁴⁸ foram os pioneiros no conceito de BFC de glicose/O₂ miniaturizada, com densidade de potência máxima de 137 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em 400 mV. O grupo de Cosnier⁵⁷, por sua vez, demonstrou uma BFC implantada na região retoperitoneal de um rato vivo, operando a 2 μW . No ano de 2012, uma BFC foi implantada dentro de um inseto (barata), gerando uma densidade de potência máxima de 55 $\mu\text{W mm}^{-2}$ ⁵¹. Crespilho e colaboradores⁵⁹, por sua vez, implantaram pioneiramente uma BFC no interior da veia jugular de um rato da espécie *Rattus norvegicus*, e seus resultados mostraram que uma BFC implantável pode apresentar, *a priori*, um potencial de circuito aberto de 1000 mV, além de prever, também, que a BFC poderia atingir 650 mV quando operando em potência máxima. No entanto, a tensão de circuito aberto (OCV, do inglês, *Open Circuit Voltage*), da BFC *in vitro* e *in vivo* foram de 400 mV e 125 mV, respectivamente. Com relação às densidades de

potência máximas, obtiveram-se $240 \mu\text{W cm}^{-2}$ em 220 mV para a BFC operando *in vitro* e $95 \mu\text{W cm}^{-2}$ em 80 mV quando operando *in vivo*. Essas quedas (de potência e de OCV) podem ser atribuídas a várias causas, como queda ôhmica por polarização e concentração, resistividade do meio eletrolítico e envenenamento parcial do eletrodo.

1.3 Enzimas oxirredutases

As enzimas oxirredutases catalisam as reações de transferência de elétrons, por meio de seus sítios catalíticos presentes na estrutura protéica, sendo esses grupos prostéticos, íons e metalorgânicos^{66, 67}. Para o desenvolvimento de bioânodos em BFC podem ser utilizados diferentes tipos de enzimas, como glicose oxidase, glicose desidrogenase, dentre outras. Essas enzimas apresentam coenzimas com potencial de oxidação negativo em relação às coenzimas empregadas ao biocátodo, como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP^+), o que as tornam atraentes para essa finalidade⁶⁸⁻⁷⁰.

Em bioânodos, uma enzima empregada é a glicose desidrogenase (GDh (do inglês, *Glucose Dehydrogenase*) a partir do *Bacillus megaterium*, EC 1.1.1.47). A GDh é responsável por catalisar a oxidação da glicose para gluconolactona na presença da coenzima NAD^+ . Nesse caso, as moléculas de glicose se ligam à coenzima reduzindo NAD^+ a NADH e essa reação redox ocorre no grupo nicotinamida, conforme mostra a Figura 2.

A GDh (Figura 3) é tetramérica com quatro subunidades estruturalmente idênticas e cada uma possui aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos⁷¹, sendo que sua massa molecular é de 30 kDa. Além disso, a coenzima é ligada à enzima numa conformação estendida nas extremidades C-terminais das folhas β paralelas (Figura 3b), estabilizadas por ligações de hidrogênio e resíduos da sequência de aminoácidos (Asn 196, Glu 189, Ile 191, Thr 193, Lys 162, Asn 92, Tyr158, Thr 193, Leu 19, Thr 17, Gly 94)⁷¹ e as interações entre NAD^+ /proteína (Figura 3c) ocorrem em cada subunidade. No geral, a conformação do NAD^+ e seu modo de ligação ao dobramento de Rossmann são similares à curta cadeia redutase/desidrogenase, com o anel da adenina em conformação *anti* e o anel da nicotinamida em conformação *syn*. Outra característica é a inatividade em soluções alcalinas devido à dissociação do tetrâmero em monômeros inativos⁷¹.

Figura 2 – Fórmula química estrutural (PDB: 1GCO) e reação no grupo nicotinamida da coenzima NAD^+ .

Fonte: Adaptação Sales, F. C. P. F. (2015), a partir de SCHMIDT, H. L., 1999, p. 553.

Figura 3 – a) Representação cristalográfica da enzima GDh (PDB: 1GCO); b) fórmula química estrutural da coenzima NAD^+ localizada no interior da estrutura proteica da enzima e c) interação da coenzima com os resíduos de aminoácidos.

Fonte: Autoria própria (software: Jmol).

As enzimas da família multi-cobre são amplamente relatadas na literatura na preparação dos biocátodos em BFC⁷²⁻⁸⁰. A bilirrubina oxidase (BOx (do inglês, *Bilirubin*

Oxidase) a partir de *Myrothecium verrucaria*, E.C. 1.3.3.5) possui uma estrutura monomérica com massa molecular de 64 kDa^{74, 76, 77} e é responsável por catalisar a reação de oxidação da bilirrubina para biliverdina (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática da reação química que ocorre no interior da enzima BOx (PDB: 2XLL).

Fonte: Autoria própria.

Estruturalmente, a BOx apresenta quatro átomos de cobre, que são classificados em três tipos: T1, T2 e T3^{72, 74}. O centro T1 é o primeiro sítio em que ocorre a transferência eletrônica para oxidar o substrato^{75, 80}. Isso se deve à sua localização, que está próxima à superfície da estrutura da proteína e, conseqüentemente, da superfície do eletrodo. A BOx é responsável por acelerar a redução de O₂ a H₂O em um processo de reação de 4 elétrons^{81, 82}, de acordo com a equação 1, em que o cofator de cobre está ativo para a biocatálise⁸³ em baixo sobrepotencial. A partir disso, os elétrons são transferidos para Cu T2/T3, e o O₂ é reduzido a H₂O, conforme esquema apresentado na Figura 5. Além disso, a BOx mantém sua atividade mesmo na presença de vários componentes presentes nos fluídos biológicos, tais como os íons cloretos^{73, 84}.

Figura 5 – a) Representação cristalográfica da enzima BOx (PDB: 2XLL); b) localização do cofator Cu^+ no interior da estrutura da proteína e c) Representação esquemática da transferência eletrônica entre o cofator enzimático da bilirrubina oxidase e o eletrodo de FCF.

Fonte: Autoria própria (software: Jmol).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi explorar novas configurações de eletrodos miniaturizados com vistas a desenvolver BFC de glicose/ O_2 implantáveis utilizando fibras flexíveis de carbono, de modo que possam ser implantados em animais pequenos, como a formiga. Para que seja alcançada tal proposição, pretende-se, como objetivos específicos, desenvolver um bioânodo utilizando a enzima glicose desidrogenase para catalisar a reação de oxidação da glicose e um biocátodo com a enzima bilirrubina oxidase para a redução de O_2 .

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

De uma maneira geral, o procedimento experimental pode ser dividido em 7 partes. Primeiramente, apresenta-se o processo de limpeza das vidrarias e os materiais e reagentes utilizados neste estudo. Em seguida, será descrito o procedimento de preparação dos eletrodos utilizando fibras flexíveis de carbono (FCF, do inglês, *Flexible Carbon Fiber*), que foram extraídas a partir do tecido flexível de carbono (CCS 200). Com o intuito de melhorar a interação entre as enzimas e a superfície do eletrodo, avaliaram-se dois tipos de tratamentos químicos na superfície das fibras, sendo estes um oxidativo e um ácido, processos que serão apresentados no tópico 3.2. Para a preparação do bioânodo utilizou-se o método de eletropolimerização do vermelho neutro sobre a superfície eletródica, variando-se o número de ciclos voltamétricos no processo de polimerização e, posteriormente, a enzima glicose desidrogenase e a coenzima NAD^+ foram imobilizadas. Na preparação do biocátodo serão apresentados, inicialmente, três metodologias para a imobilização da enzima BOx na superfície das fibras submetidas ao tratamento oxidativo. Além disso, verificou-se a atividade bioeletrocatalítica da enzima BOx e do mediador ABTS^{2-} (do inglês, *2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt*) para a redução de oxigênio nas FCFs e no carbono vítreo (CV), com a finalidade de comparar a eficiência das FCFs com o eletrodo de CV, que é bastante utilizado para redução de oxigênio. Para isso, desenvolveu-se uma cela eletroquímica para o estudo do biocátodo. Ao final, será descrito o desenvolvimento da BFC de glicose/ O_2 composta por um bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh e um biocátodo FCF-TO-BOx. Para esta BFC, realizaram-se os estudos *in vitro*, a partir de solução tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), e *in vivo*, no qual foi implantada a BFC em formigas vivas. A Figura 6 mostra o fluxograma das etapas de preparação dos eletrodos e desenvolvimento da BFC para ser implantada em insetos vivos.

Figura 6 – Fluxograma das etapas para preparar os eletrodos.

Fonte: Autoria própria.

3.1 Materiais e reagentes

As soluções foram preparadas com água ultrapura Mili-Q® e toda a vidraria utilizada na preparação das soluções passou previamente por um processo minucioso de limpeza com solução de permanganato de potássio (KMnO_4) e solução piranha ($\text{H}_2\text{O}_2\text{:HCl:H}_2\text{O}$). Os reagentes HNO_3 (98%), NaH_2PO_4 (98%), HCl , Na_2HPO_4 (98%), NaNO_3 , KMnO_4 (99%) e H_2O_2 P.A. (29%) foram obtidos da empresa Synth. O agente de ligação cruzada glutaraldeído (GA) (25%), albumina de soro bovino (BSA, do inglês, *Bovine Serum Albumine*, $\geq 96,0\%$), Nafion®, ABTS^{2-} , polieletrólito poli(alilamina hidrocloreada) (PAH), o mediador redox vermelho neutro (NR, do inglês, *Neutral Red*) (50-60%) e o carbono (*nanopowder*, *mesoporous*, <500 nm (DLS)) foram obtidos da empresa Sigma Aldrich. Já as enzimas glicose desidrogenase GDh [EC 1.1.1.47] e bilirrubina oxidase BOx [EC 1.3.3.5] (*Myrothecium verrucaria*, $2,25 \text{ mg mL}^{-1}$) vieram da empresa Amano.

3.2 Tratamento químico das FCF

Recentes estudos mostram que o tratamento químico das fibras utilizando ácido ou agente oxidante melhora a interação entre a enzima e a superfície do eletrodo¹⁰⁰. Dependendo do tipo de tratamento, é possível promover um aumento de defeitos na sua superfície. Com a finalidade de melhorar essa interação enzima/eletrodo, empregaram-se dois métodos de tratamento químico: um oxidativo e um ácido, como descritos nos tópicos a seguir.

3.2.1 Tratamento oxidativo – $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$

A escolha do tratamento oxidativo utilizado nas FCF fundamentou-se em trabalhos reportados na literatura para formação de óxido de grafeno na superfície do eletrodo⁸⁵⁻⁸⁷. Há evidência experimental e teórica de que, quando a enzima está imobilizada sobre o eletrodo, a presença de óxido de grafeno na sua interface pode diminuir a energia de ativação por meio da diminuição da distância entre o cofator enzimático e a superfície do eletrodo⁸⁷.

Dessa forma, o tratamento oxidativo consiste em imergir 0,5 g de FCF em 120 mL de uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$, contendo 464 mg de KMnO_4 e H_2SO_4 à $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. As FCFs foram mantidas em ultrassom por 3 horas e, após esse período, lavou-se abundantemente com água deionizada. Depois da lavagem, as fibras foram imersas em uma solução de HCl concentrado e o sistema foi mantido por mais 10 min no ultrassom, com o intuito de remover o MnO_2 formado. Em seguida, lavou-se a FCF abundantemente com água deionizada e secas em temperatura ambiente. A configuração do eletrodo após esse tratamento foi denominada FCF-TO.

3.2.2 Tratamento ácido – $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$

O tratamento ácido baseou-se na decomposição de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, que resulta na formação do íon nitrônio (NO_2^+), um forte agente oxidante⁸⁸. A reação envolve a oxidação do carbono, a formação de grupos orgânicos como aldeído (COH), cetona (C=O), fenóis, quinonas e ácidos carboxílicos (COOH).

Dessa forma, extraiu-se 1,0 g de FCF do tecido de carbono e imerso em 150 mL de uma solução contendo os ácidos H_2SO_4 e HNO_3 (3:1). A mistura ficou em repouso durante 1 hora. Após esse período, aqueceu-se por 3 horas a 70°C com o auxílio de uma chapa de

aquecimento com controle de temperatura, e, em seguida, elevou-se a temperatura da mistura para 80 °C por 1 hora. As FCF foram retiradas da solução, lavadas abundantemente com água deionizada, secas e armazenadas em temperatura ambiente. Após esse tratamento, observou-se sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) FEI Magellan 400L. Com relação à nomeação acerca da configuração do eletrodo presente neste procedimento, denominou-se FCF-TA.

3.3 Eletropolimerização do NR

O polímero de vermelho neutro (PNR, do inglês *Poly (Neutral Red)*) foi utilizado na preparação de eletrodos para oxidar a coenzima NADH e para mediar a transferência de elétrons das reações catalisadas pelas enzimas desidrogenases NAD-dependente^{109, 130}. Esse polímero apresenta potencial de oxidação negativo, o que o torna bastante interessante para aplicação em bioânodos. Por isso, o método de polimerização do NR foi utilizado para mediar a transferência eletrônica.

A eletropolimerização do monômero NR⁸⁹ foi realizada após os tratamentos químicos nas FCFs, citados no tópico 3.2. Primeiramente, foi preparada uma solução tampão de fosfato de potássio em pH 6,0 na concentração 25 mmol L⁻¹ com 100 mmol L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃), contendo 1,0 mmol L⁻¹ de monômero de NR. Posteriormente, os eletrodos de FCFs foram submetidos a 15 ciclos voltamétricos nos potenciais entre -1000 e +1000 mV em função de Ag/AgCl_{sat} em velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

3.4 Preparação do bioânodo

Após os tratamentos e a eletropolimerização do NR na superfície eletródica, as FCFs foram utilizadas para a preparação dos bioânodos. Nesse processo, uma suspensão contendo 5,0 mg mL⁻¹ da enzima GDh, 10 mmol L⁻¹ de NADH, 1,0 mg mL⁻¹ de BSA, 2,5% de GA e 1,0 mg mL⁻¹ do polieletrólito PAH (agente estabilizante) em NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,4 foi previamente preparada. O GA é um agente químico bifuncional que reage com os resíduos de aminoácido presentes na estrutura proteica das enzimas. Por meio desse procedimento, ocorre o estabelecimento de uma ligação cruzada entre os grupos (-NH₂) desses resíduos de aminoácido, presentes nas enzimas com o GA, a fim de favorecer a imobilização enzimática⁷⁴ nas FCF. Após o preparo das soluções, elas foram imersas nas suspensões com as enzimas por

36 horas e secas a vácuo por uma hora. Após esse período, os eletrodos FCF-TO-PNR15/GDh, FCF-TO-PNR100/GDh, FCF-TA-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR100/GDh foram imersos em uma solução tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) contendo 2,5% de Nafion® e, em seguida, estes foram secos a vácuo por uma hora.

3.5 Preparação do biocátodo

3.5.1 Imobilização enzimática – método 1

Para imobilização enzimática do biocátodo empregaram-se três métodos. A primeira metodologia utilizada foi a imobilização da enzima BOx e do mediador ABTS²⁻ na superfície das fibras submetidas ao tratamento oxidativo. Para isso, preparou-se uma solução tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) contendo 14 mg mL^{-1} da enzima BOx, $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ do mediador ABTS²⁻ e 25 mg mL^{-1} de PAH. As fibras foram imersas na solução por 36 horas. Posteriormente $20 \text{ }\mu\text{L}$ de Nafion® (2,5%) foi adicionado na superfície do biocátodo e o eletrodo foi seco a vácuo por 1 hora.

3.5.2 Imobilização enzimática – método 2

Para segunda metodologia, preparou-se uma suspensão de carbono (*nanopowder mesoporous* < 500 nm) em isopropanol com concentração de $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Adicionou-se $20 \text{ }\mu\text{L}$ dessa suspensão na superfície das fibras, e elas foram secas a temperatura ambiente por 3 horas. Concomitantemente, preparou-se uma solução tamponada contendo 14 mg mL^{-1} da enzima BOx, $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ do mediador ABTS²⁻, 2,5% de Nafion® e 2,5% de GA. Após 3 horas, formou-se um gel, momento em que foi adicionados $20 \text{ }\mu\text{L}$ na superfície das fibras com o pó de carbono. O biocátodo foi seco a vácuo por 1 hora.

3.5.3 Imobilização enzimática – método 3

A terceira metodologia assemelha-se à segunda, porém, não foi utilizado o mediador ABTS²⁻, que foi substituído, na mesma proporção por solução tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH =7,4). A Figura 7 mostra a representação esquemática de preparação do biocátodo, de acordo com as metodologias apresentadas nos tópicos 3.5.2 e 3.5.3.

Figura 7 – Representação esquemática das etapas para a preparação dos biocátodos referentes aos métodos 2 ou 3; (14 mg mL^{-1} de BOx; 2,5% de glutaraldeído (GA); 2,5% de Náfon®; $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de uma suspensão de carbono; $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$ de ABTS^{2-} ; solução tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4) (PB).

Fonte: Autoria própria.

3.6 Desenvolvimento da cela eletroquímica para estudo do biocátodo

Empregaram-se os eletrodos de FCF como eletrodos de trabalho. Um dos experimentos feitos no biocátodo foi empregando gases. No entanto, ao borbulhar o gás diretamente na cela, as fibras ficaram instáveis, devido à sua flexibilidade. Para evitar essa perturbação no sistema em estudo desenvolveu-se uma cela eletroquímica utilizada no estudo do biocátodo (Figura 8a-b), em que as fibras (eletrodo de trabalho) foram inseridas em um capilar de vidro com uma abertura na extremidade inferior que permitia a entrada do eletrólito e evitava a movimentação das fibras, conforme ilustra a Figura 8c. Essa cela continha um eletrodo de referência, um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo, um borbulhador e um saturador de gás. Além disso, a cela possuía uma entrada e uma saída para conectar a mesma em um circulador termostático para o controle de temperatura.

Figura 8 – Imagem da cela eletroquímica desenvolvida para o estudo de meia-cela. **a)** cela eletroquímica composta por um borbulhador de gás, um saturador, um contra-eletródo (CE), um eletródo de referência (ER) e um eletródo de trabalho (ET); **b)** zoom da região da cela com os três eletrodos e **c)** eletródo de FCF dentro de um capilar de vidro.

Fonte: Autoria própria.

3.7 Desenvolvimento da BFC implantável: Estudos *in vitro* e *in vivo*

3.7.1 Estudo *in vitro*

Após o estudo de meia cela do bioânodo e do biocátodo, cada eletródo foi inserido individualmente em um capilar de vidro milimétrico. Uma das extremidades do eletródo ficou exposta e a outra foi isolada com resina epóxi para delimitar a área do eletródo. Para o experimento *in vitro*, os dois eletrodos (bioânodo e biocátodo) foram imersos em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. O bioânodo foi conectado ao eletródo de trabalho e o biocátodo aos eletrodos de referência e contra-eletródo. Inseriram-se os bioeletrodos com diâmetro de $110 \text{ }\mu\text{m}$ em dois capilares de vidro, com diâmetro interno e externo de 300 e $500 \text{ }\mu\text{m}$, respectivamente.

3.7.2 Estudo *in vivo*

Para os experimentos *in vivo*, primeiramente, determinou-se a quantidade de glicose presente na hemolinfa das formigas. Este estudo foi feito pelo técnico Eduardo Marques Moreira, em que, coletaram-se 155 formigas em um formigueiro no campus do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) com o auxílio de uma pinça. Essas formigas foram armazenadas em um frasco de vidro com algodão embebido em clorofórmio. Em seguida,

separaram-se as formigas em grupos de 10, 20, 30, 40 e 50 formigas (*Atta sexdens rubrapilosa*) e armazenadas em uma geladeira. Para determinar a quantidade de glicose presente nesses insetos, maceraram-se por 5 minutos os insetos para os grupos contendo 10 e 20 formigas com 5,0 mL de água deionizada e os grupos com 30, 40 e 50 formigas com 10 mL de água deionizada. A maceração foi realizada com a ajuda de um almofariz e um pistilo de porcelana, e os níveis de glicose foram determinados por um glicosímetro (Roche Accu-Check). A quantidade de glicose presente nas formigas é de aproximadamente $0,50 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$ de formiga. Além disso, foi verificada a quantidade de glicose na cabeça e no abdômen das formigas. Para isso, empregaram-se 5 formigas, com as cabeças e abdômen separados e em no momento foi possível verificar que a cabeça da formiga apresenta 30% mais glicose que seu abdômen.

De acordo com esses estudos, a BFC foi implantada na cabeça da formiga viva. Antes de implantar o biodipositivo no inseto, foi necessário desenvolver um suporte para fixar o animal. Para o implante, três formigas foram utilizadas, que foram fixas em uma placa de vidro com resina epóxi e a BFC implantadas na cabeça de cada uma das formigas. A Figura 9 mostra a representação esquemática da BFC implantada na cabeça da formiga, destacando a configuração dos bioeletrodos e a reação bioeletroquímica. Empregaram-se os capilares para passar pelo exoesqueleto, e, juntamente com os bioeletrodos, eles foram posicionados na cabeça da formiga. As áreas das BFC em contato com a hemolinfa presente em cada inseto foram $0,25$, $0,21$ e $0,32 \text{ mm}^2$, para as formigas 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 9 – Representação esquemática do implante da BFC de glicose/ O_2 inserida na cabeça da formiga utilizando dois capilares de vidro contendo um biânodo e um biocátodo.

Fonte: Autoria própria.

4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Com o objetivo de avaliar a mudança morfológica das FCF, empregou-se um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para caracterização da morfologia antes e após os tratamentos químicos utilizados para a modificação da superfície dos eletrodos. Trata-se de um equipamento ZEISS LEO 440 com detector OXFORD (modelo 7060) e feixe de elétrons de 15 kV da Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP).

4.2 Voltametria cíclica e linear

A escolha dos métodos voltamétricos serviu para avaliar os processos bioeletrocatalíticos utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N, pertencente ao grupo de bioeletroquímica e Interface. No caso dos eletrodos de trabalho de FCF, a área superficial é um fator crucial. Logo, usou-se um paquímetro digital para obtenção das medidas de comprimento e espessura. Calculou-se a área de cada eletrodo de FCF de acordo com a equação ($2lh$), onde l é a largura das fibras do eletrodo e h é o comprimento. Para o controle da temperatura durante os experimentos foi utilizado o circulador termostático de alta resolução ($\pm 0,1$ °C) proveniente da GE Healthcare Life Science® (Multi Temp IV Thermostatic Circulator).

4.3 Cronoamperimetria e curvas de polarização

A cronoamperimetria é empregada para mensurar variações de corrente em um sistema eletroquímico a partir de um potencial aplicado constante no tempo. Também, empregou-se esta técnica para construir as curvas de polarização dos eletrodos, aplicando diferentes potenciais durante 10 min.

4.4 Espectrofotometria de micro-Raman

Para avaliar a morfologia da superfície das fibras antes e após os tratamentos químicos, utilizou-se o Espectrofotômetro de micro-Raman (RENISHAW *Raman Microscope*, modelo *inVia*) pertencente ao laboratório de Filmes Nanoestruturados e Espectroscopia do Departamento de Física, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da UNESP (DF/FCT/Unesp), localizado em Presidente Prudente. O laser de argônio 514 nm foi utilizado com 100% de potência e o intervalo do espectro foi 100 a 4000 cm^{-1} com 10 acumulações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamentos químicos na superfície das fibras flexíveis de carbono

A utilização de eletrodos flexíveis de carbono para aplicação em biocélulas a combustível implantáveis oferece características bastante interessantes, como a estabilidade eletroquímica, baixo custo e flexibilidade. As características da superfície desses eletrodos influenciam a cinética de transferência de carga na interface eletrodo/eletrólito e fatores como a presença de microestruturas de material de carbono^{92, 93}, a ausência de contaminantes da superfície de carbono⁹⁴⁻⁹⁶ e grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo determinam sua reatividade. O tratamento nas fibras permite a formação de uma interfase no material que, por sua vez, promove alterações na interface solução-eletrodo, o que pode causar mudanças na adsorção, na transferência heterogênea de carga e na estabilidade da superfície eletródica. Também, dependendo do tipo de tratamento, aumentam-se os defeitos na superfície das fibras e isto pode melhorar a interação da enzima e da superfície do eletrodo.

Dessa maneira, foram utilizados dois tipos de tratamentos químicos para modificar a superfície das FCFs, conforme mencionado no tópico 3.2. Após os tratamentos químicos, avaliaram-se as propriedades eletroquímicas do eletrodo sem o tratamento químico (FCF) e dos eletrodos submetidos ao tratamento oxidativo (FCF-TO) e ao tratamento ácido (FCF-TA). Para isso, foram obtidos os voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ destes eletrodos em uma solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, conforme apresentados na Figura 10. A Tabela 2 mostra os valores dos parâmetros eletroquímicos obtidos nesses voltamogramas.

De acordo com os resultados apresentados nos voltamogramas cíclicos na Figura 10 e na Tabela 2, é possível observar a variação entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE) e a relação entre as correntes de pico anódica e catódica ($I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$) dos eletrodos FCF, FCF-TO e FCF-TA. Sabendo que, para caracterizar um processo reversível de um sistema eletroquímico por voltametria cíclica, os parâmetros ΔE e $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$ devem apresentar as seguintes condições: $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}} = 1,0$ e $\Delta E = 0,059 \text{ V}$ (para $n = 1$). Mediante as condições experimentais mencionadas acima, a reversibilidade do processo redox obtidos nos voltamogramas dos eletrodos é $\text{FCF-TO} > \text{FCF-TA} > \text{FCF}$. Além disso, os valores de $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$ e ΔE para o eletrodo FCF-TO são muito próximas às condições de sistemas reversíveis. É importante ressaltar que as reações eletroquímicas dependem da natureza do material do

eletrodo de carbono, assim como da preparação de sua superfície, sendo que o real mecanismo de transferência de elétrons está sob discussão^{87, 97-99}. Também, após o tratamento ácido, a formação de algumas vesículas (denominadas *nanoblisters*) foi observada nas FCFs. Tal mudança na morfologia ocasionada pelo tratamento ácido pode promover um aumento na corrente capacitiva do eletrodo, como observado no voltamograma apresentado na Figura 10. Esse fenômeno não é observado nas FCFs tratadas com $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, como mostra o voltamograma em vermelho.

Tabela 2 – Parâmetros eletroquímicos dos voltamogramas de varredura cíclica referentes aos eletrodos FCF, FCF-TO e FCF-TA.

	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	I_{pa} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	I_{pc} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	I_{pa}/I_{pc}	ΔE (mV)
FCF	220	347	3652	2787	1,31	127
FCF-TO	249	313	4661	4483	1,04	66,4
FCF-TA	202	319	5880	5307	1,11	117

Fonte: Autoria própria.

Figura 10 – Imagens de FEG-SEM e voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ das FCF antes do tratamento químico (linha azul) e após o tratamento ácido (linha preta) e o tratamento oxidativo (linha vermelha) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Eletrólito: $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, temperatura ambiente.

Fonte: Adaptação de SALES, F. C. P. F. (2015), a partir de PEREIRA, A. R., 2016, p. 398.

Para avaliar a estrutura dos átomos de carbono nas fibras tratadas, espectros de micro-Raman foram obtidos, de acordo com as condições descritas no tópico 4.4.

O carbono grafite e outros materiais de carbono amorfo com ligações sp^2 apresentam um espalhamento Raman, apesar da sua intensa absorção óptica. Instrumentos que permitem o microfoco em pequenas regiões da amostra fornecem informações úteis sobre as fases e mudanças estruturais que ocorrem no material^{101, 102}.

Cumprе ressaltar que a espectroscopia Raman permite distinguir zonas com baixa, média e alta organização estrutural em matérias de carbono. As bandas D e D' fornecem informação de desordem devido ao efeito de distorção na rede cristalina e, também, podem estar relacionadas à existência de vibrações específicas do plano edge e/ou ao tamanho do cristalito (L_a)¹³⁹, apresentando um caráter turbostrático. Além disso, a largura da banda D pode indicar a presença de heteroátomos, que podem influenciar essa desordem dentro das lamelas do grafite. Já a banda G, por sua vez, apresenta a ordem na sua estrutura cristalina atribuída ao modo vibracional E_{2g} do grafite monocristalino¹⁰⁴. Também, as bandas entre 2690 e 3419 cm^{-1} são uma contribuição de segunda ordem das bandas G' (2700 cm^{-1}), que está relacionada à grafitização das fibras, atribuída à harmônica da banda D. De igual modo ocorre com a banda D'' (2950 cm^{-1}), referente à combinação dos modos D e G, e 2D' (3248 cm^{-1}), presente em material de carbono turbostrático¹⁰⁴.

Outro ponto importante se refere à relação entre as intensidades das bandas D e G (I_D/I_G), que mostra a contribuição dos defeitos na estrutura dos materiais de carbono e está associada à formação da sua estrutura amorfa, que indica uma descontinuidade do plano grafitico¹⁰².

Dessa forma, a técnica de espectroscopia micro-Raman foi utilizada para avaliar a morfologia da superfície das fibras antes e após os tratamentos químicos, no qual foram obtidos os espectros de Raman (Figura 11). O range do espectro foi entre 100 e 4000 cm^{-1} , com 10 acumulações. A intensidade do raio entre as bandas D (1360 cm^{-1}) e G (1580 cm^{-1}) foi obtida para avaliar a relação I_D/I_G e o L_a na superfície das FCFs.

A banda em 1580 cm^{-1} (banda G) não depende da energia do laser, enquanto que a frequência do pico da banda D em torno de 1360 cm^{-1} aumenta com a elevação da energia do laser. Esse fato leva a uma interpretação errada da equação de Kinight, $L_a = C(I_D/I_G)^{-1}$, onde $C = 44 \text{ Å}$, esta equação é aplicada para calcular o tamanho do cristalito, porém, esse fator C só é aplicável próximo ao $\lambda_L = 514 \text{ nm}$ ^{103, 139}.

Figura 11 – Espectros de Raman das fibras flexíveis de carbono. **a)** sem tratamento (FCF) e com tratamento químico (FCF-TO e FCF-TA); **b)** *fitting* de FCF; **c)** *fitting* de FCF-TO; **d)** *fitting* de FCF-TA. Laser = 514 nm, range = 100 – 4000 cm^{-1} e 10 acumulações.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 3 apresenta a relação I_D/I_G , o tamanho do cristalito e a contribuição das bandas G', D'' e 2D' dos espectros dos eletrodos FCF, FCF-TO e FCF-TA. Os valores da relação da intensidade das bandas D e G, o tamanho do cristalito e a contribuição das bandas de segunda ordem foram obtidos a partir dos espectros de Raman, usando a função Laurenciana¹⁰².

Tabela 3 – Análises Raman – relação I_D/I_G , tamanho do cristalito e contribuição das bandas de segunda ordem (G' , D'' , $2D'$) das fibras sem e com tratamento.

Amostra	I_D/I_G	L_a (Å)	G' , D'' , $2D'$
FCF	1,08	41	66
FCF-TO	1,06	42	132
FCF-TA	0,95	46	285

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os espectros e os parâmetros morfológicos apresentados na Figura 11 e na Tabela 3, observa-se que a relação I_D/I_G é maior para as FCFs sem tratamento químico. Dessa forma, tem-se que, quanto menor o valor dessa relação, maior é o tamanho do cristalito, evidente nos resultados obtidos para o eletrodo FCF-TA. O tamanho do cristalito para os eletrodos FCF, FCF-TO e FCF-TA é 4,1, 4,2 e 4,6 nm, respectivamente. Estes valores estão relacionados à variação na estrutura gráfica das fibras e a dimensão do cristal. Portanto, para o eletrodo FCF-TA, a desordem na sua estrutura, devido à presença desses cristalinos, é menor em relação aos outros eletrodos. Também, o valor referente à contribuição de segunda ordem das bandas G' , D'' e $2D'$ é consideravelmente maior para o eletrodo FCF-TA, indicando que a desordem em sua estrutura cristalina é menor quando comparada aos eletrodos FCF-TO e FCF, além de apresentar em sua morfologia, um caráter mais turbostrático. Essa desordem também pode estar associada aos defeitos estruturais, devido à presença de heteroátomos na estrutura gráfica corroborando os resultados de XPS referentes à caracterização das fibras com esses tipos de tratamento, realizados em nosso grupo¹³³.

5.2 Desenvolvimento de bioânodos para a oxidação de glicose

5.2.1 Eletropolimerização do vermelho neutro (NR)

A Figura 12 mostra os voltamogramas cíclicos do PNR nos eletrodos de FCFs tratadas. A eletropolimerização do NR na superfície dos eletrodos foi realizada aplicando 15 ciclos voltamétricos em potenciais entre -1000 e +1000 mV a 50 mV s⁻¹, sendo utilizada, como eletrólito uma solução tampão fosfato de potássio (pH 6,0; 25 mmol L⁻¹) com 100 mmol L⁻¹ de KNO₃ e 1 mmol L⁻¹ do monômero NR. A Figura 12a apresenta os típicos voltamogramas cíclicos consecutivos da formação do PNR¹⁴⁰ no eletrodo modificado pelo

tratamento oxidativo, ao passo que na Figura 12b, visualizam-se os voltamogramas cíclicos consecutivos da formação de PNR no eletrodo modificado com o tratamento ácido.

Em ambos os gráficos, é possível observar um aumento gradativo da densidade de corrente dos picos anódicos e catódicos, com exceção do processo em torno de +1000 mV, referente à oxidação irreversível do monômero NR¹⁴⁰. Os picos referentes ao par redox em -311 e -621 mV caracterizam a redução e oxidação do monômero/polímero. O par redox em +55 e +228 mV é devido ao *doping/dedoping* do filme polimérico^{89, 105}, que aumenta lentamente em relação ao par redox em potenciais negativos, observado em ambos gráficos, mas de forma linear ao longo do tempo de polimerização.

Figura 12 – Eletropolimerização do NR nas FCFs: 1,0 mmol L⁻¹ de monômero em 25 mmol L⁻¹ de solução tampão fosfato de potássio e 100 mmol L⁻¹ KNO₃. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹; 15 ciclos voltamétricos; **a)** PNR nas FCF-TO; **b)** PNR nas FCF-TA.

Fonte: Autoria Própria.

Polímeros eletroativos expostos à solução eletrolítica podem apresentar condutividade eletrônica e iônica. Além disso, geralmente, materiais eletropolimerizados possuem algumas propriedades específicas que seus monômeros correspondentes não apresentam, como baixa solubilidade¹⁰⁶. O PNR pertence à família das azinas que são compostos químicos amplamente utilizados como mediadores redox, tanto os monômeros como os polimerizados. A literatura apresenta que os eletrodos de carbono modificados com esses grupos podem ser usados para a oxidação eletrocatalítica do NADH¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. A eletropolimerização das azinas ocorre por meio da ligação de monômeros sem a destruição de sua estrutura¹⁰⁶.

O monômero desses compostos (como o NR) contém o grupamento de amina primária, bem como substituintes do anel aromático que podem liberar prótons por oxidação, dando origem a um radical catiônico carregado isoladamente, que é responsável pela polimerização eletroquímica do monômero, conseqüentemente, formando um filme de polímero semiconductor⁸⁹.

Foram feitos a variação do número de ciclos voltamétricos para a formação de PNR (15, 30, 50, 100, 150, 200, 300 ciclos), nas mesmas condições experimentais citadas anteriormente. Nessa investigação, utilizaram-se os eletrodos submetidos ao tratamento oxidativo. O objetivo desta etapa experimental é saber qual a quantidade máxima de PNR que pode ser depositada nos eletrodos. Também, se essa quantidade interfere na oxidação do NADH, como será relatado no tópico 5.2.2. A Figura 13 mostra a reprodutibilidade dos voltamogramas cíclicos da formação de PNR em três eletrodos de FCF-TO distintos. A Figura 13d correlaciona o valor de densidade de corrente de pico 1 em função ao número de ciclos voltamétricos para a formação de PNR e o erro foi calculado utilizando o método *t-student*. Então, é possível observar um aumento gradativo da densidade de corrente nos primeiros 100 ciclos voltamétricos. No entanto, a partir do centésimo ciclo não ocorre um aumento significativo nas densidades de corrente.

Com base nesses resultados, os perfis eletroquímicos foram comparados em solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4; 0,1 mol L⁻¹), em estado quase estacionário (5,0 mV s⁻¹), antes e após a eletropolimerização do NR nos eletrodos FCF-TO, FCF-TO-PNR15 (referente ao eletrodo submetido a 15 ciclos voltamétricos) e no FCF-TO-PNR100 (referente ao eletrodo submetido a 100 ciclos voltamétricos), conforme apresentado na Figura 14. Observa-se que há um aumento considerável nas correntes faradaicas para os picos 1 e 4, que estão relacionados à redução e à oxidação do monômero/polímero. A massa de PNR na superfície do eletrodo foi calculada a partir do processo de oxidação do monômero/polímero (Tabela 4). Para isso, a área do pico de oxidação referente ao monômero/polímero foi calculada pela integração desse processo, dividindo o valor obtido pela velocidade de varredura para obter a carga (Q) em coulomb. Em seguida, foi verificada a quantidade de espécies por área do eletrodo (Γ) em mol cm⁻². Por fim, obteve-se a massa de NR polimerizado na superfície dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-PNR100.

Figura 13 – Eletropolimerização do NR nas FCFs. **a-c)** Voltamogramas cíclicos de polimerização do NR em 3 eletrodos FCF-TO; **d)** Estatística do pico 1 de formação do PNR das densidades de corrente em função de o número de ciclos voltamétricos desses eletrodos com PNR. Eletrólito: 1,0 mmol L⁻¹ do monômero em 25 mmol L⁻¹ de solução tampão fosfato de potássio e 100 mmol L⁻¹ KNO₃; velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹; temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Parâmetros obtidos a partir da integração dos processos faradaico referente ao processo de oxidação em potenciais negativos dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100.

Eletrodos	Q (C)	Γ (mol cm ⁻²)	m _{NR} polimerizado (µg cm ⁻²)
FCF-TO-PNR15	1,03x10 ⁻³	6,67x10 ⁻⁷	19,25
FCF-TO-PNR100	3,14x10 ⁻³	20,3 x10 ⁻⁷	58,76

Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ dos eletrodos FCF-TO (linha preta), FCF-TO-PNR15 (linha vermelha) e FCF-TO-PNR100 (linha azul). Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio ($\text{pH} = 7,4$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, o eletrodo FCF-TO-PNR15 possui $19,25 \mu\text{g cm}^{-2}$ de PNR na sua superfície, enquanto que, para o eletrodo FCF-TO-PNR100, esse valor é de $58,79 \mu\text{g cm}^{-2}$. Isso indica que a quantidade de PNR na superfície das FCF foi três vezes maior para o eletrodo FCF-TO-PNR100 em relação ao FCF-TO-PNR15. Segundo a literatura, a quantidade de PNR depositado depende do tipo do eletrodo e do número de ciclos voltamétricos na polimerização do NR¹⁴⁰. Por exemplo, Pauliukaite e Brett (2008) observaram a deposição de $2,0$ a $3,0 \text{ nmol cm}^{-2}$ de PNR em carbono vítreo após 10 ciclos voltamétricos e de $4,0$ a $8,0 \text{ nmol cm}^{-2}$ com 20 ciclos voltamétricos. Já em eletrodo de ouro, a quantidade de PNR na sua superfície varia entre $22,0 \text{ fmol cm}^{-2}$ a $32,0 \text{ nmol cm}^{-2}$ dependendo do número de ciclos voltamétricos e da janela de potencial da eletropolimerização¹⁴⁰. As fibras apresentaram quantidades maiores de PNR eletropolimerizado. Após 15 e 100 ciclos voltamétricos têm $0,67$ e $2,03 \mu\text{mol cm}^{-2}$, respectivamente.

5.2.2 Oxidação de NADH

A glicose desidrogenase catalisa a reação de oxidação da glicose e é dependente da coenzima NAD^+ . Essa dependência significa que, ao mesmo tempo em que ocorre a oxidação da glicose, a proteína tem o *turnover* redox dessa coenzima como reação redox acoplada¹⁰⁹.

Assim, ocorre a formação de NADH. A regeneração do NAD^+ é conduzida via oxidação do NADH⁶⁷. Essa regeneração é extremamente importante, tanto no ponto de vista fundamental quanto no ponto de vista prático, permitindo desenvolver os bioeletrodos para aplicação em BFC. No entanto, a oxidação do NADH utilizando eletrodos de platina e carbono ocorre em altos sobrepotenciais¹³⁰. Para o par redox NAD^+/NADH , o potencial formal em pH 7,4 é -488 mV em função de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$.

O PNR é reportado na literatura como um bom electrocatalisador para oxidação de NADH¹³², pois potencial formal do PNR em pH 7,4 é -498 mV em função de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. Como o potencial formal do PNR é próximo ao potencial formal do NADH, o uso deste polímero torna-se interessante para essa finalidade. Dessa maneira, este tópico apresenta o estudo da oxidação do NADH nos eletrodos FCF-TO, FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100.

A Figura 15 apresenta os voltamogramas cíclicos a 50 mV s^{-1} entre os potenciais de -800 a +800 mV, dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100, em diferentes concentrações de NADH (1, 2, 4, 6, 8 e 10 mmol L^{-1}) em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos a 50 mV s^{-1} dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100 em diferentes concentrações de NADH. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado em ambos os voltamogramas (Figura 15a e 15b), há um aumento gradativo nas densidades de corrente de oxidação ao variar a concentração de NADH

no eletrólito. No entanto, a Figura (15a) apresenta nitidamente um aumento na densidade de corrente de oxidação do NADH e um potencial de *onset* em +27,6 mV. Compararam-se as correntes de ambos os eletrodos em potencial de +800 mV. Para isso, foi realizada a diferença da corrente de oxidação em relação ao branco (Figura 16). Assim, verifica-se que, em concentrações entre 1,0 e 4,0 mmol L⁻¹ de NADH, essa diferença é maior no eletrodo FCF-TO-PNR15, ao passo em que, em concentrações maiores, não há uma diferença significativa em ambos os eletrodos.

Figura 16 – Comparação das densidades de corrente de oxidação, em 800 mV, dos eletrodos FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100, em diferentes concentrações de NADH.

Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, verificou-se a oxidação do NADH na ausência e presença de 10,0 mmol L⁻¹ dessa coenzima em ambos os eletrodos. O estudo foi realizado por voltametria cíclica a 5,0 mV s⁻¹ entre os potenciais -800 mV e +800 mV, de acordo com a Figura 17.

De acordo com os dados apresentados nos voltamogramas da Figura 17, é possível observar que após a adição de NADH há um aumento na densidade corrente de oxidação, conforme os voltamogramas (linha azul) em relação ao branco (linha vermelha), nos gráficos 17a-c. Para os eletrodos FCF-TO, FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100, os potenciais de *onset* são +115, -33 e -26 mV, respectivamente. Dessa forma, de acordo com esses resultados, o eletrodo FCF-TO-PNR15 apresenta um potencial de *onset* para a oxidação NADH mais próximo do potencial termodinâmico em relação aos outros eletrodos aqui apresentados.

Figura 17 –Oxidação do NADH. Voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ na presença (em azul) e na ausência (em vermelho) do NADH dos eletrodos **a)** FCF-TO-PNR15; **b)** FCF-TO-PNR100 e **c)** FCF-TO; **d)** comparação da eletro-oxidação do NADH nos eletrodos FCF-TO (em preto), FCF-TO-PNR15 (em vermelho) e FCF-TO-PNR100 (em azul). Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), concentração de NADH = 10 mmol L^{-1} , temperatura ambiente.

Fonte: Autoria Própria.

A Figura 17d mostra os voltamogramas dos eletrodos FCF-TO, FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100, na presença de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NADH. Para o eletrodo FCF-TO, o voltamograma apresenta um potencial de pico anódico (E_{pa}) em 587 mV e uma corrente de pico anódico (j_{pa}) de $2974 \mu\text{A cm}^{-2}$. Já no eletrodo FCF-TO-PNR15 é possível notar três processos de oxidação. O voltamograma desse eletrodo mostra que no primeiro processo o $E_{\text{pa}} = -463 \text{ mV}$ e $j_{\text{pa}} = 97 \mu\text{A cm}^{-2}$. No segundo, o $E_{\text{pa}} = 186 \text{ mV}$ e $j_{\text{pa}} = 571 \mu\text{A cm}^{-2}$ e no terceiro

o $E_{pa} = 606 \text{ mV}$ e $j_{pa} = 835 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$. Entretanto, no voltamograma do eletrodo FCF-TO-PNR100 observam-se dois processos de oxidação, em que no primeiro, o $E_{pa} = -485 \text{ mV}$ e a $j_{pa} = 409 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ e, no segundo, o $E_{pa} = 181 \text{ mV}$ e a $j_{pa} = 576 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$.

Estudos realizados no nosso grupo¹³³ sugerem que no tratamento oxidativo pode ocorrer à formação de orto-quinonas na superfície das FCFs, que são mais ativas para a oxidação do NADH. É possível observar que, no voltamograma do eletrodo FCF-TO, há um processo de oxidação do NADH. Além disso, no voltamograma do eletrodo FCF-TO-PNR15 são observados três processos de oxidação, enquanto que, no eletrodo FCF-TO-PNR100 apenas dois. Como a quantidade de NR eletropolimerizado na superfície do eletrodo FCF-TO-PNR100 é superior, isso indica que no eletrodo FCF-TO-PNR15 não há um recobrimento total na sua superfície, além de que o processo de oxidação do NADH em $+606 \text{ mV}$ pode ser proveniente das quinonas - que podem estar presentes na superfície dessas fibras -, enquanto que, no eletrodo FCF-TO-PNR100 pode ter ocorrido o recobrimento total da superfície das fibras.

A partir disso, obtiveram-se as curvas de polarização para a oxidação do NADH, utilizando três eletrodos. De acordo com as curvas apresentadas na Figura 18, é possível verificar que nos três tipos de eletrodos (FCF-TO, FCF-TO-PNR100 e FCF-TO-PNR15) há um aumento da densidade de corrente de oxidação na presença de 10 mmol L^{-1} de NADH. As densidades de corrente em 150 mV é $135 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ para o eletrodo FCF-TO-PNR15 e no eletrodo FCF-TO-PNR100 é de $114 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, ou seja, a corrente é 15% menor no eletrodo FCF-TO-PNR100 em relação ao FCF-TO-PNR15.

Assim, de acordo com a curva de polarização do eletrodo FCF-TO-PNR15, o início da corrente de oxidação do NADH é em -138 mV . Já do eletrodo FCF-TO-PNR100 e FCF-TO esses potenciais são em -94 e -75 mV , respectivamente. Logo, o eletrodo FCF-TO-PNR15 apresenta um sobrepotencial menor em relação aos outros eletrodos aqui apresentados.

Figura 18 – a) Curvas de polarização obtidas com os eletrodos FCF-TO, FCF-TO-PNR15 e FCF-TO-PNR100 na presença e na ausência de NADH; b) “zoom” da região indicada no gráfico a. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) na presença de NADH (10 mmol L⁻¹), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Oxidação de glicose

Após os tratamentos oxidativo e ácido realizados nas FCFs e a eletropolimerização do NR, foi verificado o comportamento bioeletrocatalítico dos eletrodos com configuração FCF-TO-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR15/GDh na presença de glicose. Para a imobilização enzimática, foi realizado o entrecruzamento usando o glutaraldeído (GA). O GA é uma molécula bifuncional (Figura 19a) que apresenta dois grupos do tipo aldeído em suas extremidades e que, em pH neutro, possui elevada reatividade com os grupos amina¹¹¹. O BSA foi utilizado na imobilização devido aos grupos lisina (Figura 19b) presentes em sua estrutura, que aceleram o processo de entrecruzamento¹¹², além de manterem a atividade biocatalítica da enzima quando comparada ao entrecruzamento direto com a enzima^{112, 113, 134}.

Figura 19 – Fórmula estrutural a) do glutaraldeído e b) da lisina.

Fonte: Autoria própria, com base no programa ChemSketch.

As Figuras 20a e 20b mostram as estruturas da enzima GDh e do BSA e seus aminoácidos. Já as Figuras 20c e 20d destacam os grupos lisina (em azul) presentes em ambas as estruturas citadas acima. Foi evidenciado em trabalhos anteriores^{113, 134} que os sítios catalíticos da enzima ficam mais acessíveis às reações redox quando na presença de BSA. Com a finalidade de otimizar a imobilização da enzima, utilizou-se o polieletrólito PAH (agente estabilizante). A eletropolimerização do PNR na superfície do eletrodo pode atuar como mediador de elétrons para facilitar a transferência de carga entre a coenzima NAD^+ e a superfície do eletrodo. Como a GDh utilizada nesta pesquisa é dependente do NAD^+ , adicionou-se 10 mmol L^{-1} desse composto no eletrólito suporte.

Figura 20 – Representação cristalográfica dos resíduos de aminoácidos presentes. **a)** na enzima GDh (PDB: 1GCO) e **b)** no BSA (PDB: 3V03). Destaque dos grupos lisina (em azul) **c)** da GDh e **d)** do BSA.

Fonte: Autoria própria (software: Jmol).

O desenvolvimento dos bioânodos torna-se interessante quando a comunicação entre a enzima/eletrodo é eficiente. A Figura 21 ilustra uma representação esquemática de transferência de elétrons entre a coenzima da GDh e eletrodo modificado com PNR, na reação de oxidação da β -D-glicose.

Figura 21 – Representação esquemática da transferência de elétrons entre a coenzima reduzida NADH o eletrodo de FCF modificado com PNR, utilizando a enzima GDh NAD-dependente (PDB: 1GCO) para catalisar a reação de oxidação da β -D-glicose.

Fonte: Autoria própria.

As Figuras 22a-b apresentam os voltamogramas lineares a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ da oxidação de glicose utilizando os bioânodos FCF-TO-PNR15/GDh (Figura 22a) e FCF-TA-PNR15/GDh (Figura 22b) em diferentes concentrações de glicose, na presença de 10 mmol L^{-1} de NAD^+ e, as Figuras 22c e 22d mostram os gráficos da densidade de corrente em 400 mV em função de a concentração de glicose, de ambos eletrodos.

A oxidação de glicose catalisada pela GDh é seguida pela redução de NAD^+ a NADH, que é regenerada pelo eletrodo FCF modificado com o filme de PNR. Como dito anteriormente, para a reação do NAD^+/NADH , o potencial formal em pH 7,4 é -488 mV em função de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ à 25°C . Geralmente, é necessário um alto sobrepotencial para observar essa reação¹¹⁴, principalmente quando se utiliza eletrodos de carbono ou platina¹³⁴. Assim, como o potencial formal do PNR é -498 mV em função de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ em pH 7,4 a 25°C , a utilização deste polímero torna-se interessante.

A oxidação da glicose catalisada pela GDh e a oxidação do NADH nos bioânodos foi avaliada por voltametria linear a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ entre os potenciais -400 a $+400 \text{ mV}$. Para o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh, a corrente de oxidação se inicia em -200 mV , e para o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh em -400 mV em função de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$.

A variação na densidade de corrente de oxidação em relação ao branco para o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh é de $544 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 400 mV , e o seu potencial de *onset* é de -66 mV na presença de 487 mmol L^{-1} de glicose. Já para o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh, essa variação de corrente de oxidação é de $2493 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 400 mV , e seu potencial de *onset* é de -208 mV em 310 mmol L^{-1} de glicose. De acordo com esses resultados, o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh apresenta uma variação na densidade de corrente de oxidação maior em concentração menor de glicose quando comparado ao bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh.

Figura 22 – Voltamogramas lineares a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ dos bioânodos **a)** FCF-TO-PNR15/GDh e **b)** FCF-TA-PNR15/GDh, na ausência (em preto) e com adições sucessivas de glicose. Eletrólito: tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$); Concentração de $\text{NAD}^+ = 10 \text{ mmol L}^{-1}$; Temperatura ambiente. Gráficos da densidade de corrente em 400 mV em função de concentração de glicose. **c)** FCF-TO-PNR15/GDh e **d)** FCF-TA-PNR15/GDh.

Fonte: Autoria própria.

5.2.3.1 Preparação dos bioânodos implantáveis

Antes do desenvolvimento da BFC implantável, as propriedades bioeletroquímicas dos bioeletrodos foram primeiramente avaliadas por meio de experimentos de meia-cela em

solução tampão de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4. Também, a coenzima NADH foi imobilizada na superfície do eletrodo. Para isso, foi adicionado 10 mmol L^{-1} de NADH na solução contendo a enzima GDh e as outras substâncias, descritas no tópico 3.4. Assim, essa coenzima também ficou imobilizada na superfície do bioeletrodo implantável.

Dessa forma, é possível verificar a atividade bioeletrocatalítica dos bioânodos, FCF-TO-PNR15/GDh (Figura 23a), FCF-TO-PNR100/GDh (Figura 23b), FCF-TA-PNR15/GDh (Figura 23c) e FCF-TA-PNR100/GDh (Figura 23d), por voltametria cíclica a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ em diferentes concentrações de glicose. Para o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh, observa-se que nos voltamogramas cíclicos há um aumento na densidade de corrente de oxidação ao adicionar no eletrólito diferentes concentrações de glicose. Em 310 mmol L^{-1} de glicose, observa-se dois processos de oxidação nos potenciais de -402 e $+198 \text{ mV}$, sendo que as correntes nestes potenciais são de $89,5$ e $263 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente. Em $+400 \text{ mV}$, a corrente de oxidação é $511 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$. No bioânodo FCF-TO-PNR100/GDh as correntes de oxidação são 200 , 251 e $317 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ para os potenciais em -402 , $+198$ e $+400 \text{ mV}$, nessa ordem. Nestes mesmos potenciais, o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh as correntes de oxidação são 423 , 875 e $797 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente. No entanto, no bioânodo FCF-TO-PNR100/GDh não há um aumento significativo na corrente de oxidação após adicionar diferentes concentrações de glicose.

De acordo com esses resultados, alguns pontos podem ser destacados: primeiro, as densidades de corrente de oxidação em -402 mV e $+198 \text{ mV}$ são maiores para o eletrodo FCF-TA-PNR15/GDh. No entanto, com o tratamento ácido, os bioânodos apresentam corrente capacitiva bem maior que os bioânodos submetidos ao tratamento oxidativo. Segundo, a densidade de corrente em $+198 \text{ mV}$ é maior para o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh do que para o bioânodo FCF-TO-PNR100/GDh. No entanto, em -402 mV , essa corrente é superior para o FCF-TO-PNR100/GDh em relação ao FCF-TO-PNR15/GDh. Terceiro, a variação de corrente de oxidação em $+400 \text{ mV}$ é maior para o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh.

A partir desses resultados, verificou-se a atividade bioeletrocatalítica desses bioânodos em estado estacionário. Para isso, utilizando-se cronoamperometria, foram aplicados diferentes potenciais entre -400 e 400 mV durante 600 s em cada potencial. As curvas de polarização dos bioânodos FCF-TO-PNR15/GDh (Figura 24a), FCF-TO-PNR100/GDh (Figura 24b), FCF-TA-PNR15/GDh (Figura 24c) e FCF-TA-PNR100/GDh (Figura 24d)

mostram o desempenho de cada eletrodo nas mesmas concentrações de glicose (5,0, 50, 150, 310 mmol L⁻¹).

Figura 23 – Voltamogramas cíclicos a 5,0 mV s⁻¹ dos bioânodos **a)** FCF-TO-PNR15/GDh, **b)** FCF-TO-PNR100/GDh, **a)** FCF-TA-PNR15/GDh e **b)** FCF-TA-PNR100/GDh, na ausência (em preto) e com adições sucessivas de glicose. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24 – Curva de polarização dos bioânodos em diferentes concentrações de glicose. **a)** FCF-TO-PNR15/GDh, **b)** FCF-TO-PNR100/GDh, **c)** FCF-TA-PNR15/GDh e **d)** FCF-TA-PNR100/GDh. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

As curvas de polarização dos bioânodos mostram a bioeletrocatalise da reação de oxidação da glicose. A Figura 24a apresenta a curva de polarização do bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh, onde é possível observar que a densidade de corrente de oxidação, na presença de 310 mmol L⁻¹ de glicose, inicia-se em -185 mV. Para os bioânodos FCF-TO-PNR100/GDh, FCF-TA-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR100/GDh esse potencial são de -319, de

-325 e de -243 mV, respectivamente. Em +400 mV, a densidade de corrente de oxidação para os bioânodos FCF-TO-PNR15/GDh, FCF-TO-PNR100/GDh, FCF-TA-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR100/GDh são 306, 102, de 214 e de 67,3 $\mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente. Assim, o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh apresenta uma corrente de oxidação maior em relação aos outros bioânodos. Em 0,0 V, as densidades de correntes de oxidação para os bioânodos FCF-TO-PNR15/GDh, FCF-TO-PNR100/GDh, FCF-TA-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR100/GDh são de 24,7, de 18,5, 53,8 e de 36,5 $\mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente. Assim, neste potencial o eletrodo FCF-TA-PNR15/GDh apresenta corrente de oxidação maior comparando aos outros bioânodos.

Com o intuito de comparar a variação nas densidades de correntes de oxidação de cada bioânodo aqui apresentado, foram verificados esses valores em potenciais 0,0 e +400 mV, em diferentes concentrações de glicose, conforme mostra a Figura 25.

É possível notar que, na oxidação de glicose nesses dois potenciais mencionados na Figura 25, a variação na densidade de corrente de oxidação é maior para os bioânodos FCF-TO-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR15/GDh em relação aos FCF-TO-PNR100/GDh e FCF-TA-PNR100/GDh. Uma vez que as variações das correntes de oxidação são superiores para os bioeletrodos FCF-TO-PNR15/GDh e FCF-TA-PNR15/GDh, essas variações são contrapostas tanto em baixa quanto em alta concentração de glicose. Em baixa concentração de glicose (5,0 mmol L⁻¹), as variações nas densidades de oxidação para o bioeletrodo FCF-TO-PNR15/GDh são de 13,9 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V e de 58,0 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em +400 mV. Contudo, para o bioeletrodo FCF-TA-PNR15/GDh esses valores são de 8,5 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V e de 16,4 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em +400 V. Já em alta concentração (310 mmol L⁻¹), o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh apresenta variações de 23,2 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V e 296 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em 400 mV. Todavia, para o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh, essas variações são de 32,2 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V e 131 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em +400 mV.

Dessa forma, esses resultados apontam que, em baixa concentração de glicose (5,0 mmol L⁻¹), a variação de corrente de oxidação do bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh é 39% mais eficiente que o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh em zero volt e, 72% em +400 mV. Ainda assim, em alta concentração de glicose (310 mmol L⁻¹), o bioânodo FCF-TA-PNR15/GDh é 6,7% mais eficaz que o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh em 0,0 V, mas, em +400 mV esse bioânodo é 58% menos eficiente.

Figura 25 – Comparação da variação das densidades de corrente de oxidação dos bioânodos (FCF-TO-PNR15/GDH, FCF-TA-PNR15/GDH, FCF-TO-PNR100/GDH e FCF-TA-PNR100/GDH) em diferentes concentrações de glicose. a) em 0,0 V e b) em 400 mV.

Fonte: Autoria própria.

A literatura apresenta alguns trabalhos¹³⁵⁻¹³⁷ relacionados à oxidação da glicose utilizando a GDH. O trabalho apresentado por Shim¹³⁵ e colaboradores mostrou a utilização de eletrodos impressos de carbono contendo óxido de grafeno, FePhenTPy (do inglês, *5-[2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl]-1,10-phenanthroline iron (III) chloride*), e NAD-GDH imobilizados sobre a superfície do eletrodo. Nesse trabalho a corrente máxima foi de 95,7 $\mu\text{A cm}^{-2}$, porém, essa corrente de oxidação não foi obtida em estado estacionário e sim a 100 mV s^{-1} . Em outro trabalho apresentado na literatura¹³⁶, os autores mostraram a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com um compósito a base de carbono e borracha, EDC (do inglês, *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride*) e NAD-GDH. Para esse eletrodo a corrente de oxidação máxima foi 800 $\mu\text{A cm}^{-2}$ em estado quase-estacionário (1,0 mV s^{-1}). Recentemente, o grupo do Cosnier¹³⁷ apresentou um trabalho em que um bioânodo foi desenvolvido utilizando *buckypaper* (superfície fina de nanotubos de carbono) com PLQ (do inglês, *1,10-phenanthroline-5,6-dione*) e FAD-GDH e a corrente de oxidação máxima foi 5,38 mA cm^{-2} .

5.3 Desenvolvimento de biocátodos para a redução de O₂

Nesta etapa será descrito o desenvolvimento do biocátodo para a redução de oxigênio molecular. Inicialmente, será apresentada a caracterização do mediador ABTS²⁻ e da enzima BOx em solução, momento em que foi comparada a atividade bioeletrocatalítica nos eletrodos de FCFs e de carbono vítreo. Em seguida, serão apresentadas três metodologias para imobilização tanto da enzima como do mediador. De igual modo, serão abordadas as vantagens e desvantagens de cada método. Por fim, será apresentada a caracterização desses biocátodos.

5.3.1 Caracterização do ABTS²⁻ e da BOx em solução

A bilirrubina oxidase pode ser usada na preparação de biocátodo para aplicação em BFC de glicose/O₂. Ela possui quatro átomos de cobre II, que são responsáveis pela catálise da oxidação de alguns componentes orgânicos e, principalmente, pela redução de O₂ a H₂O⁸¹.

O ABTS²⁻ tem sido proposto para mediar a transferência de elétrons da reação catalisada pela enzima BOx e a superfície do eletrodo, pois ele pode ser rapidamente oxidado à ABTS⁻ pela enzima e, consequentemente, reduzido à ABTS²⁻ em potencial formal de +700 mV em função de Ag/AgCl_{sat}¹³⁸.

Embora a BOx seja conhecida por catalisar a oxidação de bilirrubina para biliverdina concomitantemente à redução de gás oxigênio em água em seu meio natural, essa enzima também pode catalisar a oxidação do ABTS²⁻ e reduzir oxigênio. A relação estequiométrica entre o ABTS²⁻ e o O₂ na presença dessa enzima é dada pela equação 2. Entretanto, quando a concentração de O₂ diminui lentamente, pode ocorrer a regeneração do ABTS²⁻ pela desprotonação do ABTS⁻, conforme a equação 3¹¹⁵. A respeito desse cenário, tem-se que a reação final entre o ABTS²⁻ e o O₂ catalisada pela BOx seja via 4e⁻, dada pela equação 4.

Como o ABTS^{2-} é muito utilizado como mediador de elétrons na reação de redução de oxigênio, estudou-se o comportamento desse mediador e verificou-se a viabilidade da sua utilização em bioeletrodos implantáveis.

A Figura 26 mostra o comportamento eletroquímico do ABTS^{2-} utilizando o eletrodo de FCF-TO. O voltamograma (linha preta) apresenta as densidades de corrente de oxidação de $431 \mu\text{A cm}^{-2}$ em $+600 \text{ mV}$ e $1432 \mu\text{A cm}^{-2}$ em $+910 \text{ mV}$, que têm sido atribuídas às reações de oxidação referente aos pares redox $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ e $\text{ABTS}^{\cdot-}/\text{ABTS}$, respectivamente (Figura 27) ¹¹⁵.

Com o intuito de avaliar a atividade electrocatalítica para a redução de oxigênio, propõe-se a comparação da eficiência dos eletrodos em FCFs submetidas ao tratamento oxidativo e em carbono vítreo (CV), visto que o eletrodo de carbono vítreo é bastante utilizado nos estudos de redução de oxigênio. Dessa forma, foi possível verificar o comportamento da enzima B Ox na presença do ABTS^{2-} e O_2 saturado. A Figura 28a mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos de FCF modificados com o tratamento oxidativo e a Figura 28b para o eletrodo de CV, ambos em eletrólito suporte, na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ do mediador ABTS^{2-} (linha vermelha) e $0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ de B Ox com o ABTS^{2-} (linha azul).

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ da FCF na ausência (linha vermelha) e na presença (linha preta) de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ABTS^{2-} . Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio ($\text{pH } 7,4$; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Representação esquemática da protonação e desprotonação do $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^-/\text{ABTS}$.

Fonte: Adaptação de SALES, F. C. P. F. (2015) a partir de TSUJIMURA, S., 2001, p.71.

Figura 28 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ dos eletrodos FCF-TO e CV para a redução de oxigênio, na ausência (linha preta) e na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ do mediador ABTS^{2-} (linha vermelha) e $0,11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BOf com o ABTS^{2-} (linha azul). **a)** eletrodo FCF-TO e **b)** eletrodo CV. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que a atividade eletrocatalítica do eletrodo FCF-TO é maior quando comparado ao eletrodo de CV. Na presença do ABTS^{2-} , os voltamogramas de ambos os eletrodos mostram um processo quase reversível entre os potenciais +250 e +760 mV, referente ao par redox ABTS^{2-} e $\text{ABTS}^{\cdot-}$. Para o eletrodo FCF-TO, as densidades de corrente de oxidação e redução são de $271 \mu\text{A cm}^{-2}$ em +547 mV e de $-185 \mu\text{A cm}^{-2}$ em +470 mV, nessa ordem. Já para o eletrodo de CV, esses valores de densidade de corrente de pico catódico e anódico são de $13 \mu\text{A cm}^{-2}$ em +603 mV e de $-4,0 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 503 mV, respectivamente. É possível notar que a densidade de corrente de pico catódico do eletrodo FCF-TO é 95% maior que o eletrodo de CV e que há um deslocamento do potencial do pico catódico de 56 mV.

De acordo com os voltamogramas cíclicos obtidos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ apresentados na Figura 28, o potencial de *onset* é de +550 mV e a densidade de corrente de redução é de $-281 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V, para o eletrodo FCF-TO. Para eletrodo de CV, o voltamograma cíclico apresenta o potencial de *onset* de +534 mV e a densidade de corrente de redução é de $-0,9 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V. Em condições experimentais muito próximas, Ikeda et al.¹¹⁵ publicaram um trabalho em que foi verificada a redução de oxigênio utilizando eletrodo de carbono pirolítico (*edge*) e o eletrólito continha $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$ de BOx e $0,25 \text{ mmol}$ de ABTS^{2-} , o voltamogramas cíclico foi obtido a 10 mV s^{-1} . A densidade de corrente máxima apresentada nesse trabalho foi de $42,9 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 200 mV e o potencial de meia onda foi de +490 mV. Diante desses resultados, foram comparadas as densidades de corrente de redução dos voltamogramas referentes aos eletrodos FCF-TO e CV na presença do mediador ABTS^{2-} e da enzima BOx, conforme apresentado na figura 29.

Os resultados revelam que o eletrodo FCF-TO tem um sobrepotencial de 21 mV e o eletrodo CV de 36 mV com relação ao potencial termodinâmico de redução de O_2 em pH 7,4, ou seja, o sobrepotencial do biocátodo CV é 15 mV menor que o FCF-TO. Além disso, as densidades de corrente de redução são -281 e $-0,9 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V, para os biocátodos FCF-TO e CV, respectivamente. Estes estudos mostraram que o eletrodo FCF-TO é mais eficiente que o CV na conversão de oxigênio molecular à água.

Figura 29 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ dos eletrodos FCF-TO e CV para a redução de oxigênio. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ do mediador ABTS^{2-} e $0,11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ da enzima BOf, temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Biocátodos com ABTS^{2-} e BOf imobilizados

Após verificar o desempenho dos eletrodos FCF-TO e CV na reação de redução de oxigênio na presença de BOf e ABTS^{2-} em solução, a enzima e o mediador na superfície do eletrodo FCF-TO foram imobilizados. No entanto, alguns problemas foram observados no desenvolvimento desses biocátodos, como serão relatados a seguir.

Após a preparação do biocátodo, obtiveram-se os voltamogramas cíclicos em estado quase estacionário ($5,0 \text{ mV s}^{-1}$) dos eletrodos de FCF-TO- ABTS^{2-} na ausência (linha azul) e na presença (linha vermelha) da enzima BOf, conforme mostra a Figura 30. Os resultados mostram um processo redox entre os potenciais $+400$ e $+450 \text{ mV}$ para o biocátodo FCF-TO- ABTS^{2-} /BOf. Com relação às densidades correntes de redução, observa-se um processo faradaico em $+413 \text{ mV}$ e a j_{pa} é de $-103 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$.

Outro fato notado nesse estudo é que, após alguns ciclos voltamétricos, a densidade de corrente em $+413 \text{ mV}$ diminuiu significativamente, para o eletrodo FCF-TO- ABTS^{2-} /BOf, conforme apresenta a Figura 31. No segundo e terceiro ciclos voltamétricos, esses valores são de -35 e $-26 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente. Isso mostra que as densidades de corrente diminuíram em 66% e 75% no segundo e terceiro ciclo, nessa ordem. Observou-se, também, a lixiviação de parte do mediador imobilizado nos eletrodos, devido à coloração esverdeada do eletrólito. Conclui-se que esse eletrodo FCF-TO- ABTS^{2-} /BOf, preparado pela metodologia descrita no

tópico 3.5.1, não é estável, o que inviabiliza sua utilização como biocátodo para redução de oxigênio para aplicação em BFC implantáveis.

Figura 30 – Voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ dos eletrodos FCF-TO-ABTS²⁻ e FCF-TO-ABTS²⁻/BOx na presença de O₂. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31 – Voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ do eletrodo FCF-TO-ABTS²⁻/BOx durante 3 ciclos voltamétricos na presença de O₂. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Como o eletrodo FCF-TO-ABTS²⁻/BOx preparado com a metodologia anteriormente citada não é estável, outra metodologia foi utilizada, descrita no item 3.5.2. Por voltametria

cíclica a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$, verificou-se o comportamento bioeletrocatalítico do eletrodo FCF-TO-ABTS²⁻/BOx. Além disso, as curvas de polarização foram obtidas entre os potenciais 0,0 e 850 mV em solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na presença dos gases argônio e oxigênio (Figura 32).

Figura 32 – a) Voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ e b) curva de polarização dos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-ABTS²⁻/BOx, submetidos ao método de imobilização 3.5.2, na presença de O₂ e de argônio. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$); temperatura ambiente.

a)

b)

Fonte: Autoria própria.

A Figura 32 mostra os voltamogramas cíclicos e as curvas de polarização dos eletrodos FCF-TO (linha preta) e FCF-TO-ABTS²⁻/BOx na presença de argônio (linha vermelha) e oxigênio (linha azul). Nessa configuração, o eletrodo apresenta um potencial de

onset de 571 mV e a densidade de corrente de redução máxima (em 0,0 V) é de $-188 \mu\text{A cm}^{-2}$. Após borbulhar gás argônio por 40 min, a corrente de redução, nesse mesmo potencial, é de $-62 \mu\text{A cm}^{-2}$. Para o eletrodo FCF-TO esse valor é de $-31 \mu\text{A cm}^{-2}$, em estado quase estacionário. Porém, em estado estacionário, o potencial de *onset* é observado em +600 mV e a corrente máxima de redução na presença de gás oxigênio é de $-58,7 \mu\text{A cm}^{-2}$. Na presença de gás argônio é de $-5,2 \mu\text{A cm}^{-2}$. Além disso, o biocátodo FCF-TO-ABTS²⁻/BOx apresenta um processo de redução faradaico em +350 mV, conforme mostra a Figura 32. Embora, os parâmetros eletroquímicos desse eletrodo sejam relevantes do ponto de vista bioeletrocatalítico, foi possível notar, também, a lixiviação do mediador ABTS²⁻ da superfície do eletrodo, fato observado com a coloração esverdeada do eletrólito. Dessa forma, esse bioeletrodo não é interessante na aplicação de biocátodo implantável devido à lixiviação do seu mediador.

5.3.3 Biocátodos com a BOx imobilizada na ausência de ABTS²⁻

Diante desses resultados, um estudo para verificar o desempenho bioeletrocatalítico do biocátodo FCF-TO-BOx foi realizado na ausência do mediador ABTS²⁻, utilizando a metodologia citada no item 3.5.3. A Figura 33 mostra os voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ e as curvas de polarização dos eletrodos de FCF-TO e FCF-TO-BOx na presença dos gases argônio e oxigênio.

Na Figura 33a observa-se a atividade bioeletrocatalítica do biocátodo FCF-TO-BOx, em que o potencial de *onset* é +520 mV em função de Ag/AgCl_{sat} e a corrente máxima de redução de oxigênio é $-98,7 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V. Na ausência da enzima, a corrente é de $-46,1 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V.

Este comportamento bioeletrocatalítico foi verificado em estado estacionário, no qual os eletrodos FCF-TO e FCF-TO-BOx foram submetidos à cronoamperometria por 10 min, em diferentes potenciais, variando de 0 a 850 mV na presença de gás argônio e de oxigênio. Assim, a Figura 33b apresenta a curva de polarização desses eletrodos. Na presença de oxigênio, o biocátodo FCF-TO-BOx apresenta um potencial de *onset* em +500 mV e uma corrente máxima de redução de $-27,2 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V, como podem ser observados, na curva azul. Na presença de argônio, a corrente de redução é $-4,54 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V.

Figura 33 – a) Voltamogramas cíclicos a $5,0 \text{ mV s}^{-1}$ e b) curva de polarização dos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-BOx, submetidos ao método de imobilização 3.5.3, na presença de argônio e de oxigênio. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

Comparando os valores de corrente máxima de redução dos biocátodos FCF-TO-ABTS²⁻/BOx e FCF-TO-BOx na presença de gás oxigênio. O primeiro apresenta uma corrente bioeletrocatalítica superior em relação ao segundo. Apesar disso, ocorreu a lixiviação do mediador presente no biocátodo. Portanto, o bioeletrodo FCF-TO-BOx é o mais viável para aplicação em biocélulas a combustível implantáveis.

Para uma melhor visualização, a Figura 34 apresenta uma súmula das vantagens e desvantagens de cada uma das três metodologias utilizadas no desenvolvimento desses biocátodos.

Assim, verificou-se a estabilidade do biocátodo FCF-TO-BOx por cronopotenciometria, onde o potencial de circuito aberto (OCP) foi analisado durante uma hora nos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-BOx, na presença dos gases argônio e oxigênio, conforme apresentado na Figura 35a. Para o eletrodo FCF-TO, em argônio, o OCP após uma hora de estabilização é de -219 mV, como pode ser observado na linha vermelha. No eletrodo FCF-TO-BOx, o potencial de circuito aberto é de -89,0 mV, conforme mostra a Figura 35a (linha rosa). Na presença de oxigênio, o OCP para o eletrodo FCF-TO (linha preta) é de -43,7 mV e para o biocátodo FCF-TO-BOx (linha azul), de +473 mV. Cumpre salientar que o potencial termodinâmico para a reação de redução de oxigênio via $4e^-$ é +1229 mV em função de SHE e que esse potencial em pH 7,4 é de +595 mV em função de $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. Dessa forma,

o sobrepotencial para o eletrodo FCF-TO é de 639 mV e para o biocátodo FCF-TO-BOx é de 122 mV.

Figura 34 – Vantagens e desvantagens dos métodos utilizados para a imobilização da enzima e do mediador na superfície dos eletrodos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 35 – a) OCP dos eletrodos FCF-TO e FCF-TO-BOx, na presença de oxigênio e de argônio e b) cronoamperograma do biocátodo FCF-TO-BOx na presença simultânea desses gases. Potencial aplicado: 0,0 V. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹); temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

A estabilidade da corrente máxima de redução do biocátodo FCF-TO-BOx na presença dos gases argônio e oxigênio, alternadamente, foi estudada em um período de 3,6 horas. Para isso, utilizou-se a técnica de cronoamperometria aplicando o potencial de 0,0 V, como pode ser observado na Figura 35b. Nos primeiros minutos, na presença de oxigênio, a densidade de corrente de redução é de, aproximadamente, $-25,0 \mu\text{A cm}^{-2}$. Após três horas e meia, a corrente de redução ocorre em torno de $-20 \mu\text{A cm}^{-2}$, mostrando que sua corrente bioeletrocatalítica diminui 20%.

Comparando os valores de potenciais obtidos na redução de O_2 na transferência direta de elétrons para esse biocátodo FCF-TO-BOx com a literatura, as fibras apresentam um sobrepotencial menor. O potencial do biocátodo de nanotubos de carbono desenvolvido pelo grupo do Atanassov⁸⁰ foi de +460 mV em função de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ em pH 7 a 20 mV s^{-1} , ou seja, um sobrepotencial de 159 mV. Já o potencial do biocátodo de grafite espectrográfico do grupo do Lo Gorton⁷⁴ em pH 7,4 a 10 mV s^{-1} foi de +700 mV em função de NHE, isto é, um sobrepotencial de 92 mV. Além disso, a corrente de redução nesse biocátodo foi menor que $-20 \mu\text{A cm}^{-2}$, nas condições apresentadas desse trabalho⁷⁴. Sendo assim, o biocátodo FCF-TO-BOx apresenta um sobrepotencial menor em relação às esses trabalhos e corrente de redução maior, quando comparado com o eletrodo de grafite espectrográfico, o que o torna bastante interessante para aplicação em biocátodos implantáveis.

5.4 BFC *in vitro* e *in vivo*

Neste tópico será abordado o desenvolvimento das BFC *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente será mostrado o desempenho da BFC *in vitro*. Em seguida, será apresentada a etapa de preparação da BFC e o processo de implante na cabeça da formiga. Por fim, o desempenho das BFC *in vivo* será demonstrado.

5.4.1 BFC *in vitro*

Para o desenvolvimento da BFC implantável foram utilizados o bioânodo FCF-TO-PNR15-GDh e o biocátodo FCF-TO-BOx. Os parâmetros eletroquímicos de uma BFC são determinados a partir das reações de oxidação do combustível no bioânodo e da redução do oxidante no biocátodo. Em tese, os potenciais das semi-reações, anódica e catódica são obtidos à tensão de uma BFC (U_{cell}), que pode ser obtida a partir da equação 5:

$$U_{cell} = E_c - E_a - \sum IR_e \quad (5)$$

Em que, E_c e E_a são os potenciais do biocátodo e do bioânodo, respectivamente, e $\sum IR_e$ é a somatória da perda interna (de origem ôhmica) do sistema. Neste estudo, desconsideraram-se possíveis efeitos de queda ôhmica⁹⁰. Um dos parâmetros fundamentais da BFC é a OCV, quando não há fluxo de elétrons. O valor ideal para BFC implantável pode ser estabelecido pela diferença entre os potenciais termodinâmicos do par redox NADH/NAD⁺ e do O₂/H₂O. Todavia, na prática esse valor pode ser menor ao esperado. Os principais fatores para essa diminuição estão relacionados aos parâmetros cinéticos (ou ativação), transporte de massa e queda ôhmica¹¹⁶. Outro parâmetro a ser considerado no desempenho da BFC é a potência (P_{cell}), determinada pela equação 6:

$$P_{cell} = U_{cell} I \quad (6)$$

Em que, I refere-se à corrente. Em BFC implantáveis, o tamanho do dispositivo deve ser considerado. Para isso, sua potência deve estar relacionada com a área geométrica do bioeletrodo (A), de acordo com a equação 7.

$$densidade\ de\ potência = \frac{P_{cell}}{A} \quad (7)$$

Teoricamente, os parâmetros *OCV* e U para potência máxima podem ser determinados a partir dos resultados obtidos, em meia-cela, do bioânodo FCF-TO-PNR15-GDh e do biocátodo FCF-TO-BOx, conforme o diagrama eletroquímico apresentado na Figura 36.

Antes de implantar os bioeletrodos aqui apresentados, foi verificado o desempenho da BFC *in vitro*, ou seja, em condições fisiológicas. Para isso, os parâmetros eletroquímicos da BFC foram obtidos por voltametria de varredura linear a 5,0 mV s⁻¹, em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹) na presença de 50 mmol L⁻¹ de glicose. A Figura 37 apresenta as curvas de tensão em função de corrente e potência. Os parâmetros eletroquímicos como tensão de circuito aberto (U), a potência máxima ($P_{máx}$) e corrente máxima ($j_{máx}$) são de +520 mV, de 70 µW cm⁻² em +287 mV e de 467 µA cm⁻², respectivamente, possibilitando a utilização dessa BFC, como dispositivos implantáveis.

Figura 36 – a) Diagrama eletroquímico genérico das semi-reações, utilizando o bioânodo FCF-TO-PNR15-GDh (linha vermelha) e do biocátodo FCF-TO-BOx (linha azul).

Fonte: Autoria própria.

Figura 37 – Curva de potência e corrente em função de tensão da BFC *in vitro*. Eletrólito: tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹); concentração de glicose: 50 mmol L⁻¹; temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria.

5.4.2 BFC *in vivo*

Antes de apresentar os resultados das BFC *in vivo*, algumas considerações devem ser apresentadas referentes às características do organismo da formiga e do seu fluido biológico (hemolinfa). As formigas são responsáveis pelo crescimento simbiótico dos fungos^{120, 121}, que serão usados como alimento para a colônia. Sabe-se que os polissacarídeos das plantas não compõem a dieta básica das formigas^{122, 123}, mas que os fungos são responsáveis pela decomposição desses polissacarídeos, permitindo assim o seu uso indireto. Alguns estudos relatam que o amido e o xilano são os principais polissacarídeos envolvidos na nutrição das formigas¹²⁴. Outros estudos também mostraram que a glicose presente na hemolinfa¹²⁵ desempenha um papel importante na dieta das formigas, bem como na síntese da quitina¹²⁶. Com relação à presença de um agente oxidante, que corresponde ao compartimento catódico da BFC devido à respiração das formigas (que ocorre por meio das cavidades (espiráculos) em seu esqueleto externo e na rede de pequenos tubos), o oxigênio molecular é dissolvido na hemolinfa¹²⁷. O processo é controlado por uma bomba de ar: o oxigênio entra no sistema respiratório dos insetos por meio de aberturas externas (espiráculos) e essa rede de traqueias transversais e longitudinais equaliza a pressão em todo o sistema do inseto. Essas características da formiga representam condições ideais para testar BFC de glicose/O₂ implantáveis. Uma motivação para este estudo é a possibilidade projetar uma BFC em microescala para implantar em insetos pequenos, contribuindo para o desenvolvimento de dispositivos de monitoramento ambiental e monitoramento em geral.

Após verificar o desempenho da BFC *in vitro*, os bioeletrodos foram inseridos no capilar de vidro para fazer o implante na cabeça da formiga (Figura 38). Para o processo de implante foi necessário desenvolver um suporte para fixar o inseto e conectar os eletrodos ao potenciostato. O inseto foi fixo em uma placa de vidro com resina. Em seguida, aguardou-se um período de 10 min até que a resina estivesse seca para iniciar o processo de implante da BFC na cabeça do inseto, conforme mostra a Figura 39.

Figura 38 – Imagens dos bioeletrodos de fibras flexíveis de carbono inseridos em capilares de vidro, que foram utilizados no desenvolvimento das BFC implantáveis.

Fonte: Acervo pessoal. .

Figura 39 – Imagens do suporte desenvolvido para fixar o inseto e conectar a BFC implantável ao potenciostato. **a)** BFC implantada na cabeça da formiga e conectada ao potenciostato para a realização dos estudos *in vivo* e **b)** *zoom* do suporte onde foi fixada a formiga.

Fonte: Acervo pessoal.

As Figuras 40a-c mostram as imagens da BFC implantada na cabeça das formigas nas três vistas, lateral superior e frontal. Como a formiga possui uma cabeça bilobada, o bioânodo foi implantado do lado direito e o biocátodo do lado esquerdo, de acordo com a Figura 40d.

Após o implante da BFC, verificou-se seu desempenho *in vivo* em três formigas vivas. As Figuras 41a-c apresentam as curvas tensão em função de corrente e potência de cada formiga. Os parâmetros eletroquímicos de cada BFC *in vivo* estão apresentados

na Tabela 5. Os eletrodos FCF-TO-PNR/GDh e FCF-TO-BOx foram inseridos em cada lado da cabeça da formiga por meio de capilares passando através do seu exoesqueleto.

Figura 40 – Imagens da formiga viva com a BFC operando em sua cabeça. **a)** Vista lateral, **b)** Vista superior, **c)** Vista frontal e **d)** zoom da formiga com o bioânodo e biocátodo dentro de capilares de vidro, implantados em sua cabeça.

Fonte: Acervo pessoal.

Os valores de tensão de circuito aberto obtidos pelas BFC implantadas nas formigas 1, 2 e 3 são de 378, 180 e 260 mV, nessa sequência. A potência máxima para formiga 1 é de 13,5 em 206 mV, para a formiga 2 é de 11,1 em 97 mV e para formiga 3 é de 18,6 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em 190 mV. A corrente máxima para cada inseto são 128, 204 e 143 $\mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente, conforme mostra a Figura 41. Estes valores foram obtidos após uma hora da implantação da BFC na cabeça da formiga. Comparando os resultados das BFC *in vitro* e *in vivo*, observa-se claramente uma diminuição nos parâmetros eletroquímicos das BFC *in vivo* (Tabela 5).

Figura 41 – Curvas de potência e densidade de corrente em função de tensão da BFC *in vivo*. **a)** desempenho da BFC *in vivo* na formiga 1; **b)** desempenho da BFC *in vivo* na formiga 2; **c)** desempenho da BFC *in vivo* na formiga 1 e **d)** Comparação dos parâmetros eletroquímicos das BFC *in vivo*.

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 5 – Parâmetros eletroquímicos das BFC *in vitro* e *in vivo*.

BFC	$P_{\text{máx}}$ ($\mu\text{W cm}^{-2}$ / mV)	$j_{\text{máx}}$ ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	OCV (mV)
<i>in vitro</i>	70 em 278	467	520
<i>in vivo</i> 1	13,5 em 206	128	378
<i>in vivo</i> 2	11,1 em 97	204	180
<i>in vivo</i> 3	18,6 em 190	143	260

Fonte: Autoria Própria.

Para justificar a diminuição dos valores de potência máxima em BFC, a literatura relata alguns agentes oxidantes como espécies que afetam seu desempenho e processos

catalíticos não enzimáticos ocorrendo como resultado na formação de interferentes eletroativos na superfície dos eletrodos^{128, 129}. Em um estudo anterior⁵⁹, o grupo de pesquisa identificou uma interferência ocasionada pelo oxigênio, quando foi verificada a atividade bioeletrocatalítica do bioânodo contendo a enzima glicose oxidase. No entanto, neste estudo, a presença de oxigênio molecular dissolvido no eletrólito não pode ser o fator limitante dos bioânodos aqui desenvolvidos, uma vez que a biocatálise pela enzima GDh não é influenciada pela presença de O₂.

Comparando os valores de potência das BFC implantadas na cabeça da formiga com a literatura que cita a utilização de fluido biológico (a hemolinfa) contendo combustível (açúcar), esses valores de potência máxima são menores^{50, 51, 53, 54, 64}, como se observa na Tabela 1. Todavia, este trabalho contribui para mostrar que a flexibilidade das FFC, a presença de um mediador de elétrons polimérico, o uso do tratamento químico de oxidação com permanganato de potássio das fibras e a miniaturização dos eletrodos são tópicos a serem considerados no desenvolvimento de biocélulas a combustível implantáveis.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram que os tipos de tratamentos (oxidativo e ácido) feitos nas FCFs influenciam as propriedades bioeletrocatalíticas dos bioânodos. O número de ciclos voltamétricos de PNR na superfície das fibras também afeta o desempenho dos bioeletrodos. Quanto maior o número de ciclos voltamétricos de PNR (100 ciclos), mais capacitivo o eletrodo fica, fato não observado nas curvas de polarização de oxidação do NADH. Também, o bioânodo FCF-TO-PNR15/GDh apresenta densidade de corrente máxima de oxidação maior quando comparado aos outros bioânodos, na reação de oxidação de glicose.

Com o biocátodo, as FCFs mostraram desempenho superior quando comparadas ao eletrodo de carbono vítreo. Em testes executados com a BOx e o mediador ABTS²⁻ em solução, o voltamograma, referente ao eletrodo FCF-TO, apresentou um potencial de *onset* de 550 mV, ou seja, um sobrepotencial de 21 mV com relação ao potencial termodinâmico de redução de oxigênio molecular em pH 7,4. Além disso, a densidade de corrente de redução desse eletrodo foi $-281 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V. A enzima BOx nos eletrodos FCF-TO foi imobilizada na presença e ausência do mediador ABTS²⁻. Comparando os valores obtidos nesses dois biocátodos, a corrente de redução em 0,0 V foi duas vezes maior no biocátodo FCF-TO-ABTS²⁻/BOx em relação ao biocátodo FCF-TO-BOx. Entretanto, parte do mediador se desprende da superfície do eletrodo, fato observado pela coloração esverdeada do eletrólito tamponado. Portanto, ficou evidente que o biocátodo FCF-TO-BOx foi mais viável para a aplicação em BFC implantáveis.

Conclui-se que é possível a obtenção de energia em fluidos biológicos (hemolinfa) da formiga pelo implante da BFC de glicose/O₂ miniaturizada. A potência da BFC implantável foi de $13,5 \mu\text{W cm}^{-2}$ em 206 mV e a tensão de circuito aberto foi de 378 mV. Um dos objetivos dessa pesquisa foi desenvolver um *setup* experimental usando bioeletrodos modificados inseridos em capilares de vidro para a implantação do biodispositivo na cabeça da formiga.

Por fim, acredita-se que a utilização das fibras para o desenvolvimento de bioeletrodos miniaturizados operando em sistemas vivos pequenos proporciona caminhos interessantes para a conversão de energia.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

É possível miniaturizar e implantar BFC em insetos pequenos, a fim de produzir energia com fluidos biológicos. No entanto, desenvolver BFC implantáveis de alta eficiência ainda é um desafio na produção de energia, principalmente, quando miniaturizadas. Para isso, é necessário estudar alguns outros parâmetros que possam afetar o desempenho das BFC, como as possíveis causas da diminuição dos valores dos parâmetros eletroquímicos das BFC, além de também verificar sua estabilidade em longo prazo.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

Participação e apresentação de trabalhos em reuniões científicas

Sales, F. C. P. F.; Moreira, E. M.; Crespilho, F. N. *Glucose dehydrogenase on flexible carbon fibers arrays for biofuel cells implanted in small insects*. **24th International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society (BES)**. Lyon – França, 2017. (Modalidade Oral).

Sales, F. C. P. F.; Crespilho, F. N. *Miniaturização de bioeletrodos implantáveis baseados em fibras de carbono para biocélula a combustível de glicose/O₂*. **VI Workshop em Microfluídica**. Campinas, SP – Brasil, 2016. (Modalidade Oral e Pôster).

Sales, F. C. P. F.; Moreira, E. M.; Iost, R. M.; Crespilho, F. N. *Implantable glucose/dioxygen micro biofuel cell operating in the ant head*. **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Goiânia, GO-Brasil, 2016. (Modalidade Oral e Pôster).

Sales, F. C. P. F.; Moreira, E. M.; Crespilho, F. N. *Implanted biofuel cell operating in ant*. **XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE)**. Uberlândia, MG – Brasil, 2015. (Modalidade Oral).

Sales, F. C. P. F.; Crespilho, F. N. *Avaliação das propriedades eletroquímicas da biocélula a combustível de glicose/O₂ implantável*. **38ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, SP – Brasil, 2015. (Modalidade Pôster).

Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Electrochemical performance evaluation of an implantable glucose/dioxygen biofuel cell*. **247th American Chemical Society National Meeting**. ACS, Dallas, TX – USA, 2014. (Modalidade Pôster).

Premiação

Sales, F. C. P. F.; Moreira, E. M.; Iost, R. M.; Crespilho, F. N. *Implantable glucose/dioxygen micro biofuel cell operating in the ant head*. **Melhor pôster na seção de Eletroquímica e Eletroanalítica**. 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Goiânia, GO-Brasil, 2016.

Artigos

Pereira, A. R.; Souza, J. C. P.; Iost, R. M.; Sales, F. C. P. F.; Crespilho, F. N. “*Application of Carbon Fibers to Flexible Enzyme Electrodes*”. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 780, p. 396-406, 2016.

Iost, R. M.; Sales, F. C. P. F.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. “*Glucose Biochip Based on Flexible Carbon Fiber electrodes: In Vivo Diabetes Evaluation in Rats*”, **Chemelectrochem**, v. 2, n. 4, p. 518-521, 2015.

Luz, R. A. S.; Pereira, A. R.; Souza, J. C. P.; Sales, F. C. P. F.; Crespilho, F. N. “*Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics, and Challenges in Applicability*”. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 11, p. 1751-1777, 2014.

Souza, J. C. P.; Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Crespilho, F. N. “*Flexible Biosupercapacitor based on Carbon-Nanoblistered Bioanode*”, (submetido).

Sales, F. C. P. F.; Moreira, E. M.; Iost, R. M.; Crespilho, F. N. “*Implantable Biofuel Cell operating in the Ant*”. (submetido).

REFERÊNCIAS

1. SCHÖNBEIN, C. F. On the voltaic polarization of certain solid and fluid substances: **Philosophical Magazine**, v. 14, p. 43-45, 1839.

2. GROVE, W. R. On voltaic series and the combination of gases by platinum. **Philosophical Magazine**, v. 14, p. 127-130, 1839.

3. 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.

4. IOST, R. M.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; NANTES, I. L.; CASELI, L.; CRESPILO, F. N. Strategies of nano-manipulation for application in electrochemical biosensors. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, n. 7, p. 2965-2997, 2011.

5. TASCA, F.; GORTON, L.; HARREITHER, W.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; NOLL, G. Direct electron transfer at cellobiose dehydrogenase modified anodes for biofuel cells. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 26, p. 9956-9961, 2008.

6. TASCA, F.; GORTON, L.; HARREITHER, W.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; NOLL, G. Highly efficient and versatile anodes for biofuel cells based on cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 35, p. 13668-13673, 2008.

7. KUWAHARA, T.; OSHIMA, K.; SHIMOMURA, M.; MIYAUCHI, S. Properties of the enzyme electrode fabricated with a film of polythiophene derivative and its application to a glucose fuel cell. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 5, p. 2947-2953, 2007.

8. SATO, F.; TOGO, M.; ISLAM, M. K.; MATSUE, T.; KOSUGE, J.; FUKASAKU, N.; KUROSAWA, S.; NISHIZAWA, M. Enzyme-based glucose fuel cell using vitamin K-3-immobilized polymer as an electron mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 7, p. 643-647, 2005.

9. AMIR, L.; TAM, T. K.; PITA, M.; MEIJLER, M. M.; ALFONTA, L.; KATZ, E. Biofuel cell controlled by enzyme logic systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 826-832, 2009.

11. GALLAWAY, J.; WHEELDON, L.; RINCON, R.; ATANASSOV, P.; BANTA, S.; BARTON, S. C. Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor*. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 8, p. 1229-1235, 2008.
12. NOGALA, W.; ROZNIECKA, E.; ZAWISZA, I.; ROGALSKI, J., OPALLO, M. Immobilization of ABTS - laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 12, p. 1850-1854, 2006.
13. MANO, N.; SOUKHAREV, V.; HELLER, A. A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O₂ electroreduction. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 23, p. 11180-11187, 2006.
14. FARNETH, W. E.; DINER, B. A.; GIERKE, T. D.; D'AMORE, M. B. Current densities from electrocatalytic oxygen reduction in laccase/ABTS solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 581, n. 2, p. 190-196, 2005.
15. 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.
16. PALMORE, G. T. R.; KIM, H. H. Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 464, n. 1, p. 110-117, 1999.
17. WILLNER, I.; ARAD, G.; KATZ, E. A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-1 monolayer-functionalized electrodes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 44, n. 2, p. 209-214, 1998.
18. WILLNER, I.; KATZ, E.; PATOLSKY, F.; BUCKMANN, A. F. Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, n. 8, p. 1817-1822, 1998.
19. KATZ, E.; FILANOVSKY, B.; WILLNER, I. A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. **New Journal of Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 481-487, 1999.
20. YU, E. H.; SCOTT, K. Enzymatic biofuel cells-fabrication of enzyme electrodes. **Energies**, v. 3, n. 1, p. 23-42, 2010.

21. YAHIRO, A. T.; LEE, S. M.; KIMBLE, D. O. Bioelectrochemistry .I. enzyme utilizing bio-fuel cell studies. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 88, n. 2, p. 375, 1964.
22. RUSLING, J. F.; ITO, K. Voltammetric determination of electron-transfer rate between an enzyme and a mediator. **Analytica Chimica Acta**, v. 252, n. 1-2, p. 23-27, 1991.
23. GALLAWAY, J. W.; BARTON, S. A. C. Kinetics of redox polymer-mediated enzyme electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 26, p. 8527-8536, 2008.
24. KATZ, E.; LIOUBASHEVSKY, O.; WILLNER, I. Electromechanics of a redox-active rotaxane in a monolayer assembly on an electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 47, p. 15520-15532, 2004.
25. ISHIHARA, K.; OSHIDA, H.; ENDO, Y.; UEDA, T.; WATANABE, A.; NAKABAYASHI, N. Hemocompatibility of human whole-blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 26, n. 12, p. 1543-1552, 1992.
26. ISHIHARA, K.; IWASAKI, Y.; NAKABAYASHI, N. Novel biomedical polymers for regulating serious biological reactions. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 6, n. 4, p. 253-259, 1998.
27. KONNO, T.; WATANABE, J.; ISHIHARA, K. Conjugation of enzymes on polymer nanoparticles covered with phosphorylcholine groups. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 342-347, 2004.
28. NISHIZAWA, K.; KONNO, T.; TAKAI, M.; ISHIHARA, K. Bioconjugated phospholipid polymer biointerface for enzyme-linked immunosorbent assay. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p. 403-407, 2008.
29. YU, E. H.; SUNDMACHER, K. Enzyme electrodes for glucose oxidation prepared by electropolymerization of pyrrole. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 85, n. B5, p. 489-493, 2007.
30. WILLNER, I.; BLONDER, R.; KATZ, E.; STOCKER, A.; BUCKMANN, A. F. Reconstitution of apo-glucose oxidase with a nitrospiropyran-modified FAD cofactor yields a photoswitchable biocatalyst for amperometric transduction of recorded optical signals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 22, p. 5310-5311, 1996.

31. XIAO, Y.; PATOLSKY, F.; KATZ, E.; HAINFELD, F. F.; WILLNER, I. "Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. **Science**, v. 299, n. 5614, p. 1877-1881, 2003.
32. DEGANI, Y.; HELLER, A. Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal-electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose-oxidase and D-amino-acid oxidase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 8, p. 2615-2620, 1988.
33. CHEN, Q.; DELUMLEYWOODYEAR, T.; KENAUSIS, G.; SCHMIDTKE, D.; HELLER, A. Developments in "wired" enzyme sensors. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 213, p. 183, 1997.
34. ZHU, Z. W.; MOMEU, C.; ZAKHARTSEV, M.; SCHWANEBERG, U. Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 11, p. 2046-2051, 2006.
35. GOODING, J. J.; MEARNS, F.; YANG, W. R.; LIU, J. Q. Self-assembled monolayers into the 21(st) century: Recent advances and applications. **Electroanalysis**, v. 15, n. 2, p. 81-96, 2003.
36. KUDO, H.; YAGI, T.; CHU, M. X.; SAITO, H.; MORIMOTO, N.; IWASAKI, Y.; AKIYOSHI, K.; MITSUBAYASHI, K. Glucose sensor using a phospholipid polymer-based enzyme immobilization method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1269-1274, 2008.
37. RAITMAN, O. A.; KATZ, E.; BUCKMANN, A. F.; WILLNER, I. Integration of polyaniline/poly(acrylic acid) films and redox enzymes on electrode supports: An in situ electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 22, p. 6487-6496, 2002.
38. ZHANG, S. X.; YANG, W. W.; NIU, Y. M.; SUN, C. Q. Multilayered construction of glucose oxidase on gold electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, n. 2, p. 209-217, 2004.
39. GOODING, J. J.; EROKHIN, P.; LOSIC, D.; YANG, W. R.; POLICARPIO, V.; LIU, J. Q.; HO, F. M.; SITUMORANG, M.; HIBBERT, D. B.; SHAPTER, J. G. Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols. **Analytical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 3-9, 2001.

40. MOEHLENBROCK, M. J.; MINTEER, S. D. Extended lifetime biofuel cells. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 6, p. 1188-1196, 2008.
41. COONEY, M. J.; SVOBODA, V.; LAU, C.; MARTIN, G.; MINTEER, S. D. Enzyme catalysed biofuel cells. **Energy & Environmental Science**, v. 1, n. 3, p. 320-337, 2008.
42. LOGAN, B. E.; HAMELERS, B.; ROZENDAL, R. A.; SCHRORDER, U.; KELLER, J.; FREGUIA, S.; AELTERMAN, P.; VERSTRAETE, W.; RABAEY, K. Microbial fuel cells: Methodology and technology. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 17, p. 5181-5192, 2006.
43. 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.
44. ZEBDA, A.; GONDRAN, C.; LE GOFF, A.; HOLZINGER, M.; CINQUIN, P.; COSNIER, S. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. **Nature Communications**, v. 2, p. 1-6, 2011.
45. 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.
46. DE SOUZA, F. V. L.; LEITE, E. R. **Nanoenergy: nanotechnology applied for energy production**. New York: Springer, 2013. 200 p.
47. KATZ, E. **Implantable bioelectronics**. New York: Wiley, 2014. 472 p.
48. HELLER, A. Miniature biofuel cells. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 2, p. 209-216, 2004.
49. CHEN, T.; BARTON, S. C.; BINYAMIN, G.; GAO, Z. Q.; ZHANG, Y. C.; KIM, H. H.; HELLER, A. A miniature biofuel cell. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 35, p. 8630-8631, 2001.
50. MACVITTIE, K.; HALAMEK, J.; HALAMKOVA, L.; SOUTHCOTT, M.; JEMISSON, W. D.; LOBELD, R.; KATZ, E. From "cyborg" lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells. **Energy & Environmental Science**, v. 6, n. 1, p. 81-86, 2013.

51. RASMUSSEN, M.; RITZMANN, R. E.; LEE, L.; POLLACK, A. J.; SCHERSON, D. An implantable biofuel cell for a live insect. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1458-1460, 2012.

52. MACVITTIE, K.; CONLON, T.; KATZ, E. A wireless transmission system powered by an enzyme biofuel cell implanted in an orange. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 28-33, 2015.

53. HALÁMKOVÁ, L.; HALAMEK, J.; BOCHAROVA, V.; SZCZUPAK, A.; ALFONTA, L.; KATZ, E. Implanted biofuel cell operating in a living snail. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 11, p. 5040-5043, 2012.

54. SZCZUPAK, A.; HALAMEK, J.; HALAMKOVA, L.; BOCHAROVA, V.; ALFONTA, L.; KATZ, E. Living battery - biofuel cells operating in vivo in clams. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 10, p. 8891-8895, 2012.

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

56. CASTORENA-GONZALEZ, J. A.; FOOTE, C.; MACVITTIE, K.; HALAMEK, J.; HALAMKOVA, L.; MARTINEZ-LEMUS, L. A.; KATZ, E. Biofuel cell operating in vivo in rat. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1579-1584, 2013.

57. CINQUIN, P.; GONDRAN, C.; GIROUD, F.; MAZABRARD, S.; PELLISSIER, A.; BOUCHER, F.; ALCARAZ, J. P.; GORGY, K.; LENOUVEL, F.; MATHE, S.; PORCU, P.; COSNIER, S. A Glucose bioFuel cell implanted in rats. **Plos One**, v. 5, n. 5, p. 1-6, 2010.

58. ZEBDA, A.; COSNIER, S.; ALCARAZ, J. P.; HOLZINGER, M.; LE GOFF, A.; GONDRAN, C.; BOUCHER, F.; GIROUD, F.; GORGY, K.; LAMRAOUI, H.; CINQUIN, P. Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013.

59. SALES, F. C. P. F.; IOST, R. M.; MARTINS, M. V. A.; ALMEIDA, M. C.; CRESPILO, F. N. An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 13, p. 468-474, 2013.

60. LUZ, R. A. S.; PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; IOST, R. M.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILO, F. N. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **Chemelectrochem**, v. 1, p. 1751-1777, 2014.

61. COSNIER, S.; LE GOFF, A.; HOLZINGER, M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. **Electrochemistry Communications**, v. 38, p. 19-23, 2014.

62. MIYAKE, T.; HANEDA, K.; NAGAI, N.; YATAGAWA, Y.; ONAMI, H.; YOSHINO, S.; ABE, T.; NISHIZAWA, M. Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 12, p. 5008-5012, 2011.

63. ANDORALOV, V.; FALK, M.; SUYATIN, D. B.; GRANMO, M.; SOTRES, J.; LUDWIG, R.; POPOV, V. O.; SCHOUENBORG, J.; BLUM, Z. SHLEEV, S. Biofuel cell based on microscale nanostructured electrodes with inductive coupling to rat brain neurons. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-11, 2013.

64. SHOJI, K.; AKIYAMA, Y.; SUZUKI, M.; NAKAMURA, N.; OHNO, H.; MORISHIMA, A. K. Biofuel cell backpacked insect and its application to wireless sensing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 78, p. 390-395, 2016.

65. GÜVEN, G.; SAHIN, S.; GÜVEN, A.; YU, E. H. Power Harvesting from human serum in buckypaper – based enzymatic biofuel cell. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, n. 4, p. 1-7, 2016.

66. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

67. VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1616 p.

68. ZHANG, N.; GU, W.; YU, H. J.; LIU, W. Application of coordinated SOFC and SMES robust control for stabilizing tie-line power. **Energies**, v. 6, n. 4, p. 1902-1917, 2013.

69. WILLNER, I. Biofuel cells: harnessing biomass or body fluids for the generation of electrical power. **Fuel Cells**, v. 9, n. 1, p. 5-5, 2009.

70. WILLNER, I.; YAN, Y.M.; WILLNER, B.; TEL-VERED, R. Integrated enzyme-based biofuel cells - a review. **Fuel Cells**, v. 9, n. 1, p. 7-24, 2009.

71. YAMAMOTO, K.; KURISU, G.; KUSUNOKI, M.; TABATA, S.; URABE, I.; OSAKI, S. Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 angstrom resolution. **Journal of Biochemistry**, v. 129, n. 2, p. 303-312, 2001.

72. LI, D. A.; OKAJIMA, T.; MAO, L. Q.; OHSAKA, T. Bioelectrocatalytic oxygen reduction reaction by bilirubin oxidase adsorbed on glassy carbon and edge-plane pyrolytic graphite electrodes: effect of redox mediators. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 3, p. 1390-1398, 2014.
73. 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.
74. SHLEEV, S.; EL KASMI, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 9, p. 934-939, 2004.
75. KANG, C.; SHIN, H.; HELLER, A. On the stability of the "wired" bilirubin oxidase oxygen cathode in serum. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 1, p. 22-26, 2006.
76. CHRISTENSON, A.; SHLEEV, S.; MANO, N.; HELLER, A.; GORTON, L. Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1757, n. 12, p. 1634-1641, 2006.
77. MANO, N.; KIM, H. H.; HELLER, A. On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O₂ cathodes based on their "wiring". **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 34, p. 8842-8848, 2002.
78. XU, F.; SHIN, W. S.; BROWN, S. H.; WAHLEITHNER, J. A.; SUNDARAM, U. M.; SOLOMON, E. L. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 2, p. 303-311, 1996.
79. DRONOV, R.; KURTH, D. G.; MOEHWALD, H.; SCHELLER, F. W.; LISDAT, F. Communication in a protein stack: Electron transfer between cytochrome c and bilirubin oxidase within a polyelectrolyte multilayer. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 16, p. 3000-3003, 2008.
80. 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.

81. SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2605, 1996.
82. MANO, N.; FERNANDEZ, J. L.; KIM, Y.; SHIN, W.; BARD, A. J.; HELLER, A. Oxygen is electroreduced to water on a “wired” enzyme electrode at a lesser overpotential than on platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 15290-15291, 2003.
83. SOLOMON, E. I.; CHEN, P.; METZ, M.; LEE, S. K.; PALMER, A. E. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 24, p. 4570-4590, 2001.
84. MANO, N. Features and applications of bilirubin oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 301-307, 2012.
85. STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; PINER, R. D.; KOHLHAAS, K. A.; KLEINHAMMES, A.; JIA, Y.; WU, Y.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1558-1565, 2007.
86. KOVTYUKHOVA, N. I.; OLLIVIER, P. J.; MARTIN, B. R.; MALLOUK, T. E.; CHIZHIK, S. A.; BUZANEVA, E. V.; GORCHINSKIY, A. D. Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations. **Chemistry of Materials**, v. 11, n. 3, p. 771-778, 1999.
87. 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, p. 17426-17436, 2014.
88. 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.
89. CAROLINA TORRES, A.; EMILIA GHICA, M.; BRETT, C. M. A. Poly(neutral red)/cholesterol oxidase modified carbon film electrode for cholesterol biosensing. **Electroanalysis**, v. 24, n. 7, p. 1547-1553, 2012.
90. BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods and applications**. Coimbra: Almedina, 1993. 427 p.

91. BARD, A. J. FAULKNER, R. L. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New Jersey: Wiley, 1980. 833 p.
92. BOWLING, R. J.; MCCREERY, R. L.; PHARR, C. M.; ENGSTROM, R. C. Observation of kinetic heterogeneity highly ordered pyrolytic-graphite using electrogenerated chemiluminescence. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 2763-2766, 1989.
93. HU, I. F.; KUWANA, T. Oxidative mechanism of ascorbic-acid at glassy-carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 3235-3239, 1986.
94. FAGAN, D. T.; HU, I. F.; KUWANA, T. Vacuum heat-treatment for activation of glassy-carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2759-2763, 1985.
95. ENGSTROM, R. C.; STRASSER, V. A. Characterization of electrochemically pretreated glassy-carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 136-141, 1984.
96. CABANISS, G. E.; DIAMANTIS, A. A.; MURPHY, W. R.; LINTON, R. W.; MEYER, T. J. Electrocatalysis of proton-coupled electron-transfer reactions at glassy-carbon electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 7, p. 1845-1853, 1985.
97. MCCREERY, R. L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2646-2687, 2008.
98. DAVIES, T. J.; HYDE, M. E.; COMPTON, R. G. Nanotrench arrays reveal insight into graphite electrochemistry. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 32, p. 5121-5126, 2005.
99. ZHANG, G.; CUHARUC, A. S.; GUELL, A. G.; UNWIN, P. R. Electrochemistry at highly oriented pyrolytic graphite (HOPG): lower limit for the kinetics of outer-sphere redox processes and general implications for electron transfer models. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 17, p. 11827-11838, 2015.
100. PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; IOST, R. M.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILO, F. N. Application of carbon fibers to flexible enzyme electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 780, p. 396-406, 2016.
101. DRESSELHAUS, M. S.; JORIO, A.; SAITO, R. Characterizing graphene, graphite, and carbon nanotubes by Raman spectroscopy. **Annual Review of Condensed Matter Physics**, v. 1, p. 89-108, 2010.

102. NOHARA, L. B.; PETRAÇONI FILHO, G.; NOHARA, E. L.; KLEINKE, M. U.; REZENDE, M. C. Evaluation of carbon fiber surface treated by chemical and cold plasma processes. **Materials Research**, v. 8, n. 3, p. 281-286, 2005.
103. MATTHEWS, M. J.; PIMENTA, M. A.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S.; ENDO, M. Origin of dispersive effects of the Raman D band in carbon materials. **Physical Review B**, v. 59, n. 10, p. 6585-6588, 1999.
104. MELANITIS, N.; TETLOW, P. L.; GALIOTIS, C. Characterization of PAN-based carbon fibres with laser Raman spectroscopy. Part I Effect of processing variables on Raman band profiles. **Journal of Materials Science**, v. 31, p. 851-860, 1996.
105. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRASAN, M.; BRETT, C. M. A. Characterisation of poly(neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 11, n. 7, p. 899-908, 2007.
106. GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. Application to natural samples. **Electroanalysis**, v. 18, n. 8, p. 748-756, 2006.
107. GHICA, M. E.; PAULIUKAITE, R.; MARCHAND, N.; DEVIC, E.; BRETT, C. M. A. An improved biosensor for acetaldehyde determination using a bienzymatic strategy at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, n. 1, p. 80-86, 2007.
108. MAZEIKIENE, R.; BALSUS, K.; EICHER-LORKA, O.; NIAURA, G.; MESKYS, R.; MALINAUSKAS, A. Raman spectroelectrochemical study of electrode processes at neutral red and poly(neutral red) modified electrodes. **Vibrational Spectroscopy**, v. 51, p. 238-247, 2009.
109. ARECHEDERA, M. N.; ADDO, P. K.; MINTEER, S. D. Poly(neutral red) as a NAD⁺ reduction catalyst and a NADH oxidation catalyst: Towards the development of a rechargeable biobattery. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 1585-1590, 2011.
110. CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O. N.; NART, F. C. Electrochemistry of layer-by-layer films: a review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 1, n. 5, p. 194-214, 2006.
111. 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, 2004.

112. ALENCAR, W. S.; CRESPILO, F. N.; MARTINS, M. V. A.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA, O. N.; SILVA, W. C.; Synergistic interaction between gold nanoparticles and nickel phthalocyanine in layer-by-layer (LbL) films: evidence of constitutional dynamic chemistry (CDC). **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 25, p. 5086-5091, 2009.
113. CRESPILO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA, O. N.; BRETT, C. M. A. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 10, p. 1665-1670, 2006.
114. NASSEF, H. M.; RADI, A. E.; O'SULLIVAN, C. K. Electrocatalytic sensing of NADH on a glassy carbon electrode modified with electrografted o-aminophenol film. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 11, p. 1719-1725, 2006.
115. TSUJIMURA, S.; TATSIMI, B.; OGAWA, J.; SHIMIZU, S.; KANO, K.; IKEDA, T. Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 496, n. 1-2, p. 69-75, 2001.
116. BARD, A. J.; FAULKNER, R. L. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York: John Wiley, 2001. 864 p.
117. BULLEN, R. A.; ARNOT, T. C.; LAKEMAN, J. B.; WALSH, F. C. Biofuel cells and their development. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, p. 2015-2045, 2006.
118. FERRI, S.; KOJIMA, K.; SODE, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 5, n. 5, p. 1068-1076, 2011.
119. YEHEZKELI, O.; TEL-VERED, R.; RAICHLIN, S.; WILLNER, I. Nano-engineered flavin-dependent glucose dehydrogenase/gold nanoparticle – modified electrodes for glucose sensing and biofuel cell applications. **ACS Nano**, v. 5, p. 2385-2391, 2011.
120. WEBER, N. A. Pure cultures of fungi produced by ants. **Science**, v. 121, p. 109, 1955.
121. CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus – growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, p. 1691-1694, 1994.

122. SILVA, A.; BACCI, M.; DE SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 307-313, 2003.
123. SILVA, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf – cutting ants. **Microbiological Research**, v. 161, p. 299-303, 2006.
124. SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharies by *leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.
125. WYATT, G. R.; LOUGHHEED, T. C.; WYATT, S. S. The chemistry of insect hemolymph, organic components of the hemolymph of the silkworm, *bombyx mori*, and two other species. **Journal of General Physiology**, v. 39, n. 6, p. 853-868, 1956.
126. ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
127. LIGHTON, J. R. B.; GARRIGAN, D. Ant breathing: testing regulation and mechanism hypotheses with hypoxia. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1613-1620, 1995.
128. FALK, M.; ANDORALOV, V.; BLUM, Z.; SOTRES, J.; SUYATIN, D. B.; RUZGAS, T.; ARNEBRANT, T.; SHLEEV, S. Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 37, p. 38-45, 2012.
129. COMAN, V.; LUDWIG, R.; HARREITHER, W.; HALTRICH, D.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; SHLEEV, S. A direct electron transfer-based glucose/oxygen biofuel cell operating in human serum. **Fuel Cells**, v. 10, p. 9-16, 2010.
130. KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; SCHUHMANN, W.; SCHMIDT, H. L. Electropolymerized azines: part II. In a search of the best electrocatalyst of NADH oxidation. **Electroanalysis**, v. 11, p. 553-557, 1999.
131. ASAD, S. F.; SINGH, S.; AHMAD, A.; HADI, S. M. Bilirubin/biliverdin-Cu(II) induced DNA breakage; reaction mechanism and biological significance. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 181-189, 2002.

132. KARYAKIN, A. A.; IVANOVA, Y. N.; KARYAKINA, E. E. Equilibrium (NAD^+/NADH) potential on poly(neutral red) modified electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 667-668, 2003.
133. 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, p. 1698-1707, 2017.
134. SU, X.; HÜBNER, J.; KAUKE, M. J.; DALBOSCO, L.; THOMAS, J.; GONZALEZ, C. C.; ZHU, E.; FRANZREB, M.; JAMISON, T. F.; HATTON, T. A. Redox interfaces for electrochemically controlled protein-surface interactions: bioseparations and heterogeneous enzyme catalysis. **Chemistry of Materials**, v. 29, p. 5702-5712, 2017.
135. KIM, D.; KIM, M.; REDDY, S. S.; CHO, J.; CHO, C.; JUNG, S.; SHIM, Y. Electron-transfer mediator for a NAD-glucose dehydrogenase based glucose sensor. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 11643-11649, 2013.
136. MIYAKE, T.; OIKE, M.; YOSHINO, S.; YATAGAWA, Y.; HANEDA, K.; KAJI, H.; NISHIZAWA, M. Biofuel cell anode: $\text{NAD}^+/\text{glucose}$ dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 480, p. 123-126, 2009.
137. GROSS, A. J.; CHEN, X.; GIROUD, F.; ABREU, C.; LE GOFF, A.; HOLZINGER, M.; COSNIER, S. A high power buckypaper biofuel cell: exploiting 1,10-phenanthroline-5,6-dione with FAD-dependent dehydrogenase for catalytically-powerful glucose oxidation. **ACS Catalysis**, v. 7, p. 4408-4416, 2017.
138. ZENG, H.; TANG, Z.; LIAO, L.; KANG, J. CHEN, Y. Electrochemistry of ABTS at glassy carbon electrodes. **Chinese Journal of Chemical Physics**, v. 25, p. 653-658, 2011.
139. BALDAN, M. R.; ALMEIDA, E. C.; AZEVEDO, A. F.; GONÇALVES, E. S.; REZENDE, M. C.; FERREIRA, N. G. Raman validity for crystallite size L_a determination on reticulated vitreous carbon with different graphitization index. **Applied Surface Science**, v. 254, p. 600-603, 2007.
140. PAULIUKAITE, R.; BRETT, C. M. A. Poly(neutral red): electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator. **Electroanalysis**, v. 20, n. 12, p. 1275-1285, 2008.