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

João Carlos Perbone de Souza

**Fibras de Carbono Modificadas com a Álcool Desidrogenase para o Estudo da
Bioeletroxidação do Etanol Utilizando Espectrometria de Massas Diferencial
Eletroquímica (DEMS)**

São Carlos – SP

2017

João Carlos Perbone de Souza

Fibras de Carbono Modificadas com a Álcool Desidrogenase para o Estudo da Bioeletroxidação do Etanol Utilizando Espectrometria de Massas Diferencial Eletroquímica (DEMS)

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

São Carlos – SP

2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais (João Perbone de Souza e Maria Ap. Robuste Souza) e aos meus irmãos (George M. R. P. Souza e Marco Aurélio P. Souza), especialmente aos meus pais que sempre me incentivaram e deram forças para seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, João e Maria, que me deram apoio e suporte para esta longa caminhada. Agradeço pelo incentivo, compreensão e pelo crédito que sempre depositaram em mim;
- Ao meu irmão mais velho, George, que também seguiu a carreira acadêmica, portanto servindo de fonte de inspiração. Agradeço pelas discussões científicas de alto nível;
- Ao meu irmão mais novo, Marco Aurélio, que também optou por um curso de exatas, assim sempre tiramos dúvidas um com o outro;
- A minha avó, Geralda, que sempre esteve presente na minha vida, sempre desprendendo alegria, dando amor e carinho aos netos. Obrigado por sempre me apoiar;
- A minha companheira, Haluana Nogueira, que esteve sempre ao meu lado durante a pós-graduação, ouvindo minhas frustrações e alegrias durante a execução deste projeto. Obrigado por sempre ter me apoiado em todas minhas decisões e trazer mais calma na minha vida;
- Ao meu orientador, prof. Dr. Frank Crespilho, que me aceitou em seu laboratório e depositou confiança em meu trabalho. Sou muito grato pelos vários cafés que tomamos juntos em que tivemos valorosas discussões científicas. Agradeço também por ter me ensinado grande parte do que eu sei hoje, enfim, pela orientação e amizade;
- Aos meus amigos do Grupo de Bioeletroquímica e Interfaces, que acabaram por se tornar uma família aqui em São Carlos: Vítor Carvalho, Rodrigo Iost, Antônio Francisco, Kamila Pagnoncelli, Fernanda Sales, Andressa Dancini, Danielle Castro, Graziela Sedenho, Roberto Luz, Lucyano Macedo, Thiago Bertaglia, Ayaz Hassan, Tharik Dahwache. Agradeço por muitas vezes tornarem meus dias melhores, pelas parcerias e discussões científicas;
- Ao recém doutor, Wanderson O. Silva, por ter me auxiliado nos experimentos de espectroscopia de massas eletroquímica diferencial e pela forte amizade que desenvolvemos durante a execução deste trabalho;

- Ao recém doutor, Flávio Cabrera (Flavinho), ex-aluno da Unesp de Presidente Prudente que estagiou no laboratório, estabelecemos uma ótima parceria científica e um forte laço de amizade;
- Ao Prof. Dr. Fábio H. B. Lima por disponibilizar gentilmente o equipamento para realizar os experimentos de espectroscopia de massas eletroquímica diferencial e por contribuir com sua experiência neste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Peter Hammer e ao Laboratório de Espectroscopia de Fotoelétrons (LEFE) da Unesp de Araraquara por realizar as medidas de XPS;
- Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da UFSCar pela realização do imageamento das fibras flexíveis de carbono por MEV-FEG;
- Ao Prof. Dr. Ubirajara P. R. Filho pelas discussões sobre XPS e pela participação na banca do exame de qualificação;
- À Profa. Dr. Joelma Perez por sua contribuição como membro da banca de qualificação;
- À CAQI e seus técnicos, principalmente ao Márcio por auxiliar nas primeiras imagens por MEV e sugerir a utilização do FEI Magellan no LCE;
- Ao Prof. Dr. Fábio Florenzano, que me orientou na iniciação científica, na UNIFAL-MG, despertando-me o interesse pela Ciência. Obrigado pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança;
- Ao Prof. Dr. Mario J. Politi, que supervisionou meu estágio no IQ-USP, período no qual foi muito frutífero;
- Aos amigos da minha querida Itamogi-MG e aos amigos que fiz ao longo da minha vida acadêmica;
- Ao IFGoiano pelo afastamento concedido e incentivo a qualificação;
- Às agências de fomento Capes, CNPq e Fapesp. Em especial à Capes pela concessão de bolsa durante dois anos e meio;
- Às redes de pesquisa NanoBiomed e INEO;
- Aos professores do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pela minha formação profissional.

*“É preciso ter um caos dentro de si para
dar à luz uma estrela cintilante”*

*(Friedrich Nietzsche, Assim Falou
Zaratustra)*

*“Deus criou o bulk; a superfície foi
inventada pelo demônio.”*

(Wolfgang Ernst Pauli)

RESUMO

Para a bioeletrocatalise de oxidação de etanol, a alteração da superfície eletródica e a otimização do processo de imobilização enzimática se fazem necessárias. Neste cenário, as fibras flexíveis de carbono (FFC) merecem destaque, pois além de sua superfície ser facilmente modificada devido à presença de carbono sp^2 , as mesmas possuem alta resistência mecânica e elasticidade, combinadas com a alta condutividade elétrica e térmica. Nesta tese de doutorado, apresenta-se como obter bioeletrodos de FFC modificadas com a enzima álcool desidrogenase proveniente da *Saccharomyces cerevisiae* (ADH) NAD-dependente, visando também aprimorar a oxidação da coenzima NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). Os resultados mostram que quando as FCF são previamente submetidas a um tratamento oxidativo em meio ácido ($KMnO_4/H_2SO_4$), obtém-se bioeletrodos estáveis, robustos e com alta área superficial. Além disso, observou-se que esses eletrodos possuem grupos funcionais contendo oxigênio que auxiliam na bioeletrocatalise de oxidação do etanol. Presume-se que presença de grupos quinonas seja responsável por facilitar a regeneração da coenzima, ou seja, estes grupos atuam decisivamente na oxidação do NADH. A alta qualidade dos bioeletrodos possibilitou manter a atividade catalítica da ADH por longo prazo, propriedade essa crucial para o estudo da oxidação do etanol acoplada à espectrometria de massas (DEMS). Devido a este estudo, foi possível observar concomitantemente a regeneração da coenzima ($NADH \rightarrow NAD^+$) e a geração de acetaldeído como produto de bioeletrooxidação do etanol, ambos em estado estacionário. Em suma, o estudo aqui apresentado introduz uma abordagem que combina não só o desenvolvimento de fibras de carbono tratadas quimicamente para aplicação em bioeletrocatalise, mas também um foco inédito no acoplamento entre a espectrometria de massas e a bioeletroquímica para a resolução de mecanismos enzimáticos.

Palavras chave: Fibras Flexíveis de Carbono. Bioeletrocatalise. Oxidação de Etanol. Álcool Desidrogenase.

ABSTRACT

Regarding the bioelectrocatalysis of the ethanol oxidation, the electrodic surface modification and the optimization of enzymatic immobilization are necessary. In this scenario, the flexible carbon fibers (FCF) are noteworthy, because besides their surface can be modified in an easy way due the presence of carbon sp^2 , they have high mechanical resistance and elasticity, combined with high electrical and thermal conductivity. In this doctoral thesis, it is presented how to obtain bioelectrodes of FFC modified with the enzyme alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* (ADH) NAD-dependent, as well as to improve the oxidation of the coenzyme NADH (nicotinamide adenine dinucleotide). The results show that when FCF is previously submitted to an oxidative treatment in acidic medium ($KMnO_4/H_2SO_4$), stable, robust and high surface area bioelectrodes are obtained. In addition, it was observed that these electrodes have oxygen-containing functional groups that improve the bioelectrocatalysis of ethanol oxidation. There is proposed that the presence of quinone groups is responsible for facilitating the regeneration of the coenzyme, *i. e.*, these groups act decisively in the oxidation of NADH. The high quality of the bioelectrodes allowed it to maintain the catalytic activity of the ADH for long term, property crucial for the study of the oxidation of ethanol coupled to mass spectrometry (DEMS). By using DEMS, there were possible to observe coenzyme regeneration and the generation of acetaldehyde as a bioelectrooxidation product of ethanol, both at steady state, which were simultaneously observed. In summary, the present study introduces an to an approach that combines not only the development of chemically treated carbon fibers for application in bioelectrocatalysis, but also an unprecedented focus on the coupling between mass spectrometry and bioelectrochemistry for the resolution of enzymatic mechanisms.

Keywords: Flexible Carbon Fibers. Bioelectrocatalysis. Ethanol Oxidation. Alcohol Dehydrogenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Passos reacionais para a produção de FFC utilizando PAN como precursor.....	22
Figura 2 - Diagrama esquemático e imagens de AFM correspondentes ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}^2$) dos quatro estágios envolvidos no recobrimento seletivo dos planos de borda e basais.....	23
Figura 3 - Principais métodos de imobilização enzimática.....	25
Figura 4 - a) Estrutura da álcool desidrogenase; b) dinucleotídeo de nicotinamida e adenina ligada ao sítio ativo. As esferas representam os átomos de: carbono (cinza), oxigênio (vermelha), nitrogênio (azul) e flúor (verde).....	27
Figura 5 - Mecanismo proposto para o estado estacionário da enzima ADH, representado por um mecanismo Bi Bi ordenado. NAD^+ e NADH são a coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina na versão oxidada e reduzida, respectivamente. E representa a enzima, EtOH é o etanol e AcH é o acetaldeído.....	28
Figura 6 - Estratégias de alteração dos eletrodos para a aplicação em bioeletrocatalise. (a) Transferência direta (acima) e mediada de elétrons; (b) modulação do nível de Fermi do eletrodo para processos de oxirredução; (c) Aproximação do cofator enzimático através da formação de defeitos na superfície eletródica.....	31
Figura 7 - a) Ciclo catalítico da hidrogenase NiFe, em preto a oxidação do H_2 e em cinza a inativação da hidrogenase NiFe. b) cronoamperogramas em diferentes sobrepotenciais para a hidrogenase em atmosfera de hidrogênio saturada (linha preta) e em atmosfera de argônio saturada (linha cinza) em solução-tampão. c) e d) Mostram espectros da região ν_{CO} em cada potencial sob atmosfera de argônio saturado c) e em atmosfera de hidrogênio saturada d).....	33
Figura 8 - Esquema do DEMS. 1) Meia-célula eletroquímica, 2) Conexão entre a meia-célula eletroquímica e o espectrômetro de massas, 3) câmara de pré-vácuo, 4) bombas turbomoleculares, 5) quadrupolo e 6) controlador. As esferas vermelhas representam compostos voláteis, e as azuis e amarelas são os fragmentos ionizados.....	34
Figura 9 - Fluxograma descrevendo as etapas desse estudo e as técnicas utilizadas em cada uma.....	36
Figura 10 - a) Fotografias do tecido de carbono (CCS 200) e b) conjunto de fibras utilizada para um eletrodo. Imagens de MEV-FEG de c) um conjunto de fibras e d) comparação entre uma única fibra (6,67 μm) e um fio de cabelo (74,89 μm).....	39

Figura 11 - a) Eletrodo de FFC com a área delimitada com resina epóxi e b) Região ampliada da resina epóxi na FFC.....40

Figura 12 - Configuração do equipamento de DEMS. 1) Célula eletroquímica; 2) câmara de pré-vácuo; 3) bomba turbomolecular da câmara de pré-vácuo; 4) analisador quadripolar; 5) bomba turbomolecular da câmara principal; 6) válvulas; 7) controlador eletrônico e 8) computador.....42

Figura 13 - a) e b) Peça de aço que estabelece a conexão entre a célula eletroquímica (EC) e o espectrômetro de massas (MS). Em a) está apontado o fio de ouro que estabelece o contato elétrico e o eletrodo de trabalho que é a FFC. Em b) o topo é conectado a EC e a base ao MS. c) Conector de aço sem a montagem do eletrodo de trabalho. d) fio e *o-ring* de ouro que estabelece a conexão elétrica entre o eletrodo de trabalho e o potenciostato (1), FFC antes e após o dimensionamento (2), Membrana de PTFE (3). e) meia-célula eletroquímica 1) eletrodo de referência, 2) contra eletrodo de platina, 3) eletrodo de trabalho, 4) entrada de gás, 5) entrada de fluido termostatizado. f) Interior da meia-célula eletroquímica.....43

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo em diferentes magnificações: a) e b) FFC prístina; c) e d) FFC-T1; e) e f) FFC-T2.....47

Figura 15 - a) características morfológicas de uma FFC sumarizadas, na qual mostra a sobreposição das camadas lamelares e porosidade (I); mesofases durante o processo de carbonização e grafitização de uma FFC (II); esquema tridimensional da estrutura de fibra de carbono (III). b) Modelo esquemático da formação de vesículas na superfície da FFC-T2: I) seção transversal de uma cristallito grafítico da FFC, a qual as linhas representam os planos grafíticos; II) oxidação e intercalação de íons e água, após a imersão no mistura de H_2SO_4/HNO_3 ; III) Formação do blister pela intercalação e delaminação, e pelo estresse mecânico pela evolução de gases.....48

Figura 16 - Análise elementar por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X. a) FFC prístina, b) FFC-T1 e c) FFC-T2.....50

Figura 17 - Espectros de XPS (a) e (d) fibra prístina; (b) e (e) FFC-T1; (c) e (f) FFC-T2. Os espectros (a), (b) e (c) correspondem a deconvolução da região C 1s: ■ carbono sp^2 ; ● carbono sp^3 ; ▲ C-OH; ▼ C=O; ▽ O-C=O; ◀ CO, CO₂ adsorvidos e plásmon $\pi-\pi^*$. Os espectros (d), (e) e (f) correspondem a deconvolução da região O 1s: ■ C=O; ● C-OH; ▼ O-C=O; ◀ O₂ e H₂O adsorvidos; ▲ C-NO₂. Para ambos: ○ espectro total; ◆ background.....53

Figura 18 - (a) Estrutura grafítica; (b) Difratomogramas das FFC: em azul FFC prístina, em vermelho FFC-T1 e em preto FFC-T2, região ampliada em 43° ; (c) difratogramas com intensidade normalizada ampliados na região de 25° (b) Espectro de XPS da região N 1s deconvoluido da

FFC-T2: ■ nitrato intercalado; ● -NO₂; ▼ nitrogênio sp²; ▲ nitrogênio sp³; ○ espectro total; ◆ background.....56

Figura 19 - Espectro de XPS na região da banda de valência: a) FFC prístina, (b) FFC-T1 e c) FFC-T2. d) Estrutura de bandas para um cristal de grafite, as regiões hachuradas representam os estados ocupados, I) σ^+ e π^+ indica a região da banda de valência dos orbitais ligantes, σ^- e π^- é referente a banda de condução; II é a região de sobreposição das bandas, III) estrutura de bandas para uma estrutura de grafite desordenada.^{114,115}57

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos em solução. (a) K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 0,005 mol L⁻¹ e (b) [Ru(NH₃)₆]Cl₃ 0,005 mol L⁻¹. FFC prístina (linha azul), FFC-T1 (linha vermelha) e FFC-T2 (linha preta). Ambos em eletrólito suporte KCl 0,5 mol L⁻¹, atmosfera de N₂, velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹60

Figura 21 - (a) Circuito equivalente de Randles; (b) Diagramas de Nyquist das FFC; (c) região de altas frequências ampliada. (■) Fibra prístina (▲) FFC-T1 (●) FFC-T2. (d) Capacitância *versus* o logaritmo da frequência obtido por impedância. Solução de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 0,005 mol L⁻¹, eletrólito suporte KCl 0,5 mol L⁻¹, atmosfera de N₂.....61

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos em solução de NADH 0,001 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH, velocidade de varredura 5 mV s⁻¹, atmosfera de N₂. (a) e (b) FFC prístina, (c) FFC-T1 e (d) FFC-T2.....63

Figura 23 – Reação redox proposta do NADH mediada pela orto-quinona.....64

Figura 24 - a) Voltamogramas cíclicos da FFC-T1-ADH com adições sucessivas de etanol absoluto até a concentração final de 796,6 mmol L⁻¹, velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. b) Voltamogramas cíclicos da FFC-T1-ADH com variação da velocidade de varredura na concentração de 796,6 mmol L⁻¹ de etanol. c) Dependência da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida para FFC-T1-ADH na concentração de etanol de 796,6 mmol L⁻¹ E = 0,6 V d) Dependência da corrente de pico em função velocidade de varredura obtida para FFC-T1-ADH na concentração de etanol de 796,6 mmol L⁻¹ E = 0,0 V. O eletrólito suporte foi solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH= 7,5, a 25 °C para todos experimentos.....65

Figura 25 - (a) Cronoamperogramas da FFC-T1-ADH com adições sucessivas de etanol absoluto até a concentração final de 796,6 mmol L⁻¹. O eletrólito suporte foi tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH= 7,5, voltagem aplicada 0,6 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) a 25 °C. (b) Monitoramento da intensidade dos picos de massa em $m/z = 29$ e 22, sob aplicação potencial 0,6 V e em 0,0 V (vs. Ag/AgCl_{sat}). Concentração de etanol: 0.0 mol L⁻¹ ou $m/z = 22$ para os dados de espectroscopia de massas

(preto), 0,086 mol L⁻¹ (vermelho), 0,171 mol L⁻¹ (verde), 0,257 mol L⁻¹ (roxo), 0,428 mol L⁻¹ (vermelho escuro), 0,642 mol L⁻¹ (cinza), 0,860 mol L⁻¹ (azul).....67

Figura 26 - a) Gráfico do duplo-recíproco usando a corrente faradaica dos cronoamperogramas da figura 27a e b) gráfico do duplo-recíproco usando a corrente iônica durante a polarização em 0,6 V vs. Ag/AgCl_{sat} extraídos do gráfico apresentado na figura 27b. A linha vermelha pontilhada representa a extrapolação dos dados do duplo-recíproco.....68

Figura 27 - a) Cronoamperogramas da FFC-T1-ADH com variação do pH em solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a 25 °C contendo 0,860 mol L⁻¹ de etanol, sob sobrepotencial de 0,6 V vs. Ag/AgCl_{sat}. (b) Monitoramento da intensidade do pico de massa em $m/z = 29$, sob aplicação potencial 0,6 V e em 0,0 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) com variação do pH em solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a 25 °C contendo 0,860 mol L⁻¹ de etanol.....70

Figura 28 - a) Cronoamperogramas da FFC-T1-ADH com variação da temperatura em solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH= 9,0 contendo 0,860 mol L⁻¹ de etanol, sob sobrepotencial de 0,6 V vs. Ag/AgCl_{sat}. (b) Monitoramento da intensidade do pico de massa em $m/z = 29$, sob aplicação potencial 0,6 V e em 0,0 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) com variação da temperatura em solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH= 9,0 contendo 0,860 mol L⁻¹ de etanol.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos cinco métodos básico de imobilização.....	26
Tabela 2 - Constantes de velocidades estimadas para a oxidação de etanol e redução de acetaldeído para o mecanismo mostrado na figura 5.....	28
Tabela 3 - Reagentes e materiais utilizados na modificação das FFC e no estudo da bioeletrocatalise da enzima álcool desidrogenase.....	37
Tabela 4 - Composição química elemental obtidas por EDS das FFC prístina e submetidas aos tratamentos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FFC – fibras flexíveis de carbono

PAN – poli(acrilonitrila)

HOPG – carbono pirolítico altamente ordenado

AFM – microscopia de força atômica

ADH – álcool desidrogenase

AOX – álcool oxidase

MEV-FEG – microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

EDS – espectroscopia de energia dispersiva

XPS – espectroscopia fotoeletrônica de raios-X

DRX – difração de raios-X

Ag/AgCl_{sat} – eletrodo de referência de cloreto de prata em solução saturada de cloreto de potássio

DEMS - espectroscopia de massas eletroquímica diferencial

FFC-T1 – fibra flexível de carbono tratada com KMnO₄/H₂SO₄

FFC-T2 – fibra flexível de carbono tratada com HNO₃/H₂SO₄ EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

HOMO – orbital molecular ocupado de maior energia

LUMO – orbital molecular de menor energia

NAD⁺ - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADH - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida

FFC-T1-ADH – fibra flexível de carbono tratada com KMnO₄/H₂SO₄ com ADH imobilizada.

CE – Contra-eletrodo

WE – Eletrodo de trabalho

RE – Eletrodo de referência

MS – Espectrômetro de massas

EC – Célula eletroquímica,

DOS – Densidade de estados

PTFE – Politetrafluoretileno

IR – Infravermelho

FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina

LISTA DE SÍMBOLOS

λ – comprimento de onda

nm – nanômetro (10^{-9} m)

Å – angstrom (10^{-10} m)

β – largura na meia altura do pico de difração

K – constante dependente da forma geométrica de cristalitos

$D_{h,k,l}$ – diâmetro médio dos cristalitos

θ – ângulo de incidência ou de difração

d – distância entre planos de um cristal

ΔE – distância entre os picos de redução e oxidação

mV – millivolts

V – volts

k^0 – constante heterogênea de transferência de elétrons

V_0 – velocidade inicial de reação

$V_{\text{máx}}$ – velocidade máxima de reação

K_m – constante de Michaelis

[S] – concentração de substrato

K_m^{app} – constante de Michaelis aparente

I_{ss} – corrente de estado estacionário

$I_{\text{máx}}$ – corrente máxima

σ – orbital sigma

π – orbital pi

Z'' – impedância imaginária

f – frequência

k – constante de velocidade específica

C – capacitância

dE/dt – variação do potencial pelo tempo (velocidade de varredura)

j – densidade de corrente

R_{tc} – resistência à transferência de carga

R_Q – resistência ôhmica

R_w – Impedância de Warburg

C_{dc} – Capacitância associada a dupla camada elétrica

m/z – razão massa por carga

mA – miliampere

mA cm⁻² – miliampere por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	Introdução.....	19
2	Revisão Bibliográfica	21
2.1	Fibras Flexíveis de Carbono: Estrutura, Superfície e Propriedades	21
2.2	Imobilização enzimática em superfícies de carbono	24
2.3	Álcool desidrogenase – aspectos estruturais, mecanísticos e cinéticos	26
2.4	Bioeletrocatalise.....	29
2.5	Técnicas eletroquímicas acopladas técnicas instrumentais analíticas	32
3	Objetivos	35
4	Procedimentos Experimentais.....	36
4.1	Etapas do projeto	36
4.2	Materiais e Reagentes	37
4.3	Transformações Químicas das Fibras Flexíveis de Carbono.....	37
4.3.1	Transformação química com permanganato de potássio e ácido sulfúrico	37
4.3.2	Transformação química com ácido sulfúrico e ácido nítrico	38
4.4	Técnicas de Caracterização Morfológica, de Superfície e da Microestrutura das FFC.....	38
4.5	Caracterização Eletroquímica	39
4.6	Imobilização da Enzima Álcool Desidrogenase	41
4.7	Espectrometria de Massas Eletroquímica Diferencial (DEMS)	41
4.8	Cinética bioeletroquímica	44
5	Resultados e Discussão.....	46
5.1	Morfologia, Composição e Estrutura das FFC	46

5.2	Eletroquímica das Sondas Redox Hexacianoferrato e Hexaminrutênio	58
5.3	Eletroxidação do NADH.....	63
5.4	Bioeletrocatalise de Oxidação do Etanol pela Enzima Álcool Desidrogenase.....	64
5.5	Bioeletroxidação do etanol: efeito do pH e da temperatura.....	69
6	Conclusão	73
7	Referências.....	75
8	Artigos publicados no doutorado.....	88

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a bioeletroquímica é um dos campos de grande interesse científico visto a imensa aplicabilidade tecnológica dos biodispositivos eletroquímicos em áreas como sensoriamento¹⁻³, geração de energia^{4,5}, dispositivos médicos⁶ e até mesmo descontaminação de efluentes⁷. Estas aplicações se devem ao desenvolvimento de novos materiais eletródicos e a “*engenharia molecular*” de proteínas, as quais permitem melhorar o desempenho dos bioeletrodos. Dentre os materiais eletródicos, o carbono se destaca quando este se encontra com a hibridização sp^2 e condensando em anéis aromáticos, isto é uma estrutura grafítica, pois ele se torna um material com alta condutividade, que é uma propriedade importante quando se trata de eletrodos. Além disso, este tipo de material pode ser facilmente funcionalizado, o que altera suas propriedades estruturais e interfaciais, influenciando diretamente nas propriedades eletroquímicas. Neste contexto, as fibras flexíveis de carbono são materiais que vêm sendo amplamente empregado em bioeletroquímica, uma vez que possuem estrutura grafítica, alta versatilidade na fabricação de dispositivos devido a sua flexibilidade e por sua estrutura ser facilmente modificada.

Além do campo tecnológico, o uso de técnicas bioeletroquímicas aliado a outras técnicas se torna uma ferramenta importante no campo no estudo fundamental de cinética enzimática⁸, considerando que as técnicas que empregam a catálise homogênea podem ser limitadas para algumas enzimas. As técnicas bioeletroquímicas com detecção *in situ* ou *online*, podem ser utilizadas tanto na elucidação das etapas de um mecanismo enzimático quanto no cálculo de parâmetros cinéticos. Para isto, é necessário o monitoramento da formação de espécies ou dos arranjos estruturais intermediários concomitantes ao processo de transferência de elétrons. O monitoramento pode ser feito pela utilização de técnicas espectroscópicas e a transferência de elétrons por técnicas eletroquímicas potenciostáticas ou potenciodinâmicas. Com isto, torna-se possível ter compreensão acerca do mecanismo e da velocidade de formação de produtos por uma determinada enzima. Para a que se obtenha sucesso neste tipo de abordagem é necessário fabricar um eletrodo de alta performance e construir uma boa interface entre a célula eletroquímica e o equipamento que irá detectar os produtos formados.

Portanto, este trabalho de doutorado buscou a melhora na performance da transferência de elétrons em eletrodos de fibras flexíveis de carbono. Para isto, utilizaram-se dois métodos oxidativos para a alteração das propriedades estruturais e interfaciais deste material. O primeiro

tratamento foi realizado pela imersão do tecido de carbono em solução de ácido sulfúrico contendo permanganato de potássio e mantido em um banho ultrassom, o qual leva a formação de defeitos na superfície e a formação de grupos tipo quinona. No segundo tratamento, imergiu-se o tecido de carbono em sistema de ácido sulfúrico/ácido nítrico que foi mantido sob aquecimento, levando a formação de defeitos na superfície e intercalação de íons.

Para ambos, ocorre a melhora na transferência de elétrons para o par redox de hexacianoferrato, pois ocorre a maior exposição dos planos de borda da estrutura grafítica na superfície. Porém, somente quando há a formação de grupos tipo quinona, foi possível observar o processo de bioeletrocatalise na oxidação da dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida. Logo, como a enzima utilizada neste estudo foi a álcool desidrogenase e, trata-se de uma enzima NAD-dependente, utilizou-se como base eletródica as fibras submetidas ao primeiro tratamento, devido a formação de quinonas. Com a obtenção de um bioeletrodo com ótimo desempenho, propôs-se neste trabalho, pela primeira vez a utilização da espectroscopia de massas eletroquímica diferencial no estudo do processo de bioeletrocatalise da enzima álcool desidrogenase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FIBRAS FLEXÍVEIS DE CARBONO: ESTRUTURA, SUPERFÍCIE E PROPRIEDADES

Os materiais a base de carbono são amplamente empregados em estudos eletroquímicos, devido as suas propriedades físico-químicas, as quais incluem alta condutividade elétrica, resistência à corrosão, baixa densidade e elasticidade, e podem ser encontrados com alto grau de pureza.⁹ Além disso, o carbono é um material extremamente versátil, uma vez que este é encontrado em diversas formas alotrópicas, várias microtexturas, diferentes graus de grafitação e dimensionalidades (de 0 a 3D).¹⁰ Dentre estes materiais, as fibras flexíveis de carbono (FFC) merecem destaque devido a conjuntura de propriedades físicas que as mesmas possuem, as quais incluem alta flexibilidade, resistência mecânica e elasticidade (módulo de Young), e alta condutividade elétrica/térmica.^{11,12}

As FFC podem ser obtidas através de vários precursores, tais como a poliacrilonitrila (PAN), celulose, piche, lignina, raio e polietileno.¹³ Dentre estes o mais utilizado e considerado como o mais adequado para a fabricação de FFC é a PAN, a qual é um polímero atático, linear e que contém grupos nitrilas altamente polares. Devido às fortes interações dipolo-dipolo entre os grupos nitrilas a PAN assume uma conformação do tipo helicoidal irregular.¹⁴

O processo de fabricação das FFC consiste no tratamento térmico dos fios de PAN, o qual é dividido em três etapas de um tratamento térmico complexo (figura 1). A primeira etapa é estabilização pela oxidação em ar em temperatura mais branda (200-300°C); a etapa intermediária é a carbonização ($\leq 1600^{\circ}\text{C}$) com a finalidade de eliminar os átomos não-carbônicos; e a última consiste na grafitação ($> 2000^{\circ}\text{C}$) que gera a hibridização sp^2 , assim tornando este um material condutor, esta etapa também melhora a orientação dos planos basais e a rigidez das FFC.¹⁵⁻¹⁸ Os carbonos de hibridização sp^2 são empilhados uns sobre os outros até a formação de cristalitos de grafite, que são considerados as unidades básicas das FFC derivadas da PAN. Entretanto, a formação destes cristalitos é imperfeita, levando à formação de uma estrutura turbostrática e a grafitação que nunca é completa, por isso na estrutura também há carbonos com a hibridização sp^3 .¹⁹

Figura 1 - Passos reacionais para a produção de FFC utilizando PAN como precursor.

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de FRANK, E., 2012, p. 499; RAHAMAN, M. S. A., 2007, p. 1423; SAHA, B., 2012, p. 4684.

Para a alteração de propriedades da região interfacial, as FFC são submetidas a tratamentos de superfície, que podem ser feitos por métodos químicos²⁰, oxidação eletroquímica²¹ e utilização de plasma²². A modificação da superfície é de extrema importância para processos de adesão²³, adsorção²⁴, molhabilidade²⁵ e, principalmente, em processos eletroquímicos²⁶, pois estes ocorrem exclusivamente na interface. As metodologias do tratamento das FFC, geralmente, promovem a formação de grupos carbonílicos, éteres, fenóis e álcoois, os quais possuem oxigênio na estrutura.²⁷

A presença de grupos funcionais oxigenados na superfície do eletrodo baseados em carbono pode alterar a velocidade da transferência de elétrons para determinadas sondas redox, pois promove mudanças na região interfacial eletrodo-solução.²⁸⁻³⁰ Outros fatores que também influenciam nos processos eletroquímicos são a microestrutura e a limpeza da superfície de

eletrodos de carbono.³¹ Por exemplo, a cinética eletroquímica em eletrodos carbono que possuem mais planos de borda que basais é mais rápida para sondas redox como o par ferro/ferricianeto.³² Entretanto, alguns estudos têm reportado resultados diferentes relativos à reatividade em planos basais e de borda para alguns tipos materiais de carbono, tais como grafeno e nanotubos.^{32,33} Logo, para comparar as diferenças nas taxas de transferência de elétrons para diferentes superfícies de eletrodos de carbono é necessário levar em consideração pelo menos três fenômenos que afetam extremamente estas observações: a) mecanismo redox; b) densidade de estados eletrônicos da superfície; c) a presença de sítios de planos de borda na superfície do eletrodo.³⁴

Para investigar a diferença entre as reatividades dos planos basais e de borda, Davies e colaboradores, estudaram a cinética eletroquímica específica para cada plano fazendo o recobrimento seletivo dos terraços e degraus de um eletrodo de carbono pirolítico altamente ordenado (HOPG), ficando exposto somente os planos de borda ou os basais, respectivamente, como apresentado na figura 2.³⁵

Figura 2 - Diagrama esquemático e imagens de AFM correspondentes ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}^2$) dos quatro estágios envolvidos no recobrimento seletivo dos planos de borda e basais.

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de DAVIES, T. J., 2005, p. 5252.

O recobrimento específico dos planos de borda foi realizado por um método previamente reportado de eletrodeposição de MoO_2 ³⁶, o qual leva a formação de nanofios na superfície dos planos de borda, que corresponde ao segundo estágio apresentado na figura 2. Posteriormente, a superfície do HOPG foi passivada por radicais nitrofenil, os quais não reagem seletivamente, estes radicais foram gerados pela redução eletroquímica de cátions de 4-nitrobenzenodiazônio, correspondendo ao estágio 3.³⁷ A última etapa consistiu na retirada dos nanofios de MoO_2 através da imersão do HOPG em uma solução de HCl 1 mol L^{-1} , sob agitação. Para todos os estágios descritos acima foram feitas microscopias de força atômica (AFM) e voltametrias cíclicas. Os experimentos de eletroquímica comprovaram que os planos de borda são mais reativos que os basais, uma vez que possuem a cinética eletroquímica mais rápida, isto é, a constante heterogênea de transferência de carga (k^0) é maior para os planos de borda do que para os basais.³⁵

Pelo fato das FFC terem natureza grafítica, alguns tratamentos químicos oxidativos podem gerar defeitos na estrutura^{38;39}, assim promovendo o aumento na exposição de planos de borda, e, portanto, alterando a cinética eletroquímica de eletrodos baseados em FFC tratadas. O Grupo de Bioeletroquímica e Interfaces vem mostrando que as FFC são extremamente versáteis, as quais podem ser miniaturizadas para o emprego em biosensores⁴⁰ ou biocélulas a combustível implantáveis⁴¹⁻⁴³, também podem ser utilizadas na fabricação de dispositivos flexíveis baseados em borracha natural⁴⁴ e no estudo fundamental de processo de transferência de carga em bioeletroquímica³⁸.

2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA EM SUPERFÍCIES DE CARBONO

Para estudos de bioeletrocatalise é necessária a imobilização de enzimas na superfície dos eletrodos, a qual pode ser realizada por diferentes estratégias.⁴⁵ Os principais métodos de imobilização estão apresentados na figura 3, os quais são: adsorção física, aprisionamento, ligações intercruzadas, ligação covalente enzima-eletrodo e por afinidade.⁴² A tabela 1 sumariza os tipos de ligação e, também, as principais desvantagens e vantagens de cada método.

A forma em que a enzima é imobilizada na superfície pode influenciar na sua interação com o substrato e na transferência de elétrons do sítio redox para a superfície do eletrodo, de forma que possa afetar a performance do bioeletrodo. As biomoléculas quando imobilizadas devem manter sua estrutura, sua função, atividade biológica, ter ligação próxima a superfície e não podem se desorver.⁴⁵ Para que se tenha adsorção física ou ligação covalente de

biomoléculas em plataformas eletródicas, torna-se necessário a funcionalização da superfície.⁴⁶ Para a funcionalização de eletrodos baseados em carbono, geralmente, emprega-se métodos oxidativos que leva formação de grupos oxigenados.⁴⁷ Estes grupos são hidrofílicos, assim faz com que a adsorção de enzimas não seja favorecida, uma vez que para este tipo de imobilização é necessário que se tenha interações hidrofílicas enzima-eletrodo.⁴⁶ Para uma superfície de natureza hidrofílica, torna-se necessário recorrer a outras técnicas de imobilização, como o aprisionamento por materiais poliméricos. O Nafion[®] é um dos polímeros mais utilizados na fabricação de bioeletrodos, pois permite a troca de íons e é biocompatível.⁴⁸

Figura 3 - Principais métodos de imobilização enzimática.

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de LUZ, R. A. S., 2014, p. 1758.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos cinco métodos básico de imobilização.

Métodos - Natureza da ligação	Vantagens	Desvantagens
Aprisionamento - Incorporação da enzima com um gel ou polímero	Não há reação química entre a enzima e o monômero que possa afetar a atividade enzimática Muitos tipos de enzimas podem ser imobilizadas por um mesmo polímero	Barreira de difusão Perda de enzima Altas concentrações de monômero e enzimas é requerido para eletropolimerização
Adsorção física - Ligações fracas	Simples e fácil Pouca perda da atividade enzimática	Dessorção Não há adsorção específica
Ligação covalente - Ligação química entre grupos funcionais da enzima e do eletrodo	Sem barreira de difusão Estável Reposta rápida	Matriz não regenerável Ligação <i>via</i> compostos tóxicos
Ligação intercruzada - Ligação entre enzima/agente de ligação intercruzada/molécula inerte	Simples	Alta perda de atividade enzimática
Afinidade - Ligações de afinidade entre um grupo funcional do eletrodo e um grupo marcador em uma sequência proteica	Imobilização controlada e orientada	Requer presença de grupos específicos na enzima (His, biotina)

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de LUZ, R. A. S., 2014, p. 1759.

2.3 ÁLCOOL DESIDROGENASE – ASPECTOS ESTRUTURAIS, MECANÍSTICOS E CINÉTICOS

A família da ADH consiste em muitas enzimas capazes de catalisar a reação de oxidação, de forma reversível, de álcoois primários e secundários em seus respectivos aldeídos e cetonas.⁴⁹ A álcool desidrogenase (ADH) proveniente da *Saccharomyces cerevisiae* é um homotetrâmero, ou seja, é um complexo de proteína formado por quatro subunidades idênticas,

neste caso com 347 resíduos de aminoácidos por subunidade⁵⁰. A ADH possui em sua estrutura sítios de zinco e de ligação da coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+), os quais participam na reação de oxidação de álcoois^{51,52}. A figura 4a apresenta a estrutura da ADH proveniente da *Saccharomyces cerevisiae* a 4b a coenzima ligada ao sítio ativo.

Figura 4 - a) Estrutura da álcool desidrogenase; b) dinucleotídeo de nicotinamida e adenina ligada ao sítio ativo. As esferas representam os átomos de: carbono (cinza), oxigênio (vermelha), nitrogênio (azul) e flúor (verde).

Fonte: autoria própria (Protein Data Base - PDB 5ENV)

No processo reacional desta enzima ocorre a conversão de dois substratos em produtos em uma única reação, isto é, álcool é oxidado ao seu aldeído ou cetona e o NAD^+ é reduzido a NADH, ressaltando que este processo pode acontecer no sentido inverso dependendo das condições do meio. Logo, trata-se de um mecanismo de bisubstrato, o qual é dividido em cinco tipos: Bi Bi sequencial ordenado, Bi Bi iso-ordenado, Ping Pong Bi Bi, Theorel-Chance e Bi Bi aleatório.⁵³ A ADH segue o mecanismo Bi Bi sequencial ordenado durante a reação catalítica de oxidação do etanol, a figura 5 apresenta as etapas reacionais deste mecanismo. Neste modelo, o NAD^+ , provavelmente, se liga primeiro a estrutura proteica (ADH-NAD^+), com a ligação subsequente do etanol, assim formando um complexo ternário ($\text{NAD}^+\text{-ADH-etanol}$). Então, ocorre as reações redox, levando a formação do complexo NADH-ADH-Acetaldeído, do qual o acetaldeído dissocia-se primeiro da estrutura proteica, seguido pela dissociação do NADH.

Figura 5 - Mecanismo proposto para o estado estacionário da enzima ADH, representado por um mecanismo Bi Bi ordenado. **NAD⁺** e **NADH** são a coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina na versão oxidada e reduzida, respectivamente. **E** representa a enzima, **EtOH** é o etanol e **AcH** é o acetaldeído.

Fonte: Relido de PLAPP, B. V., 2010, p. 5.

As constantes de cada etapa foram determinadas em meio homogêneo por Plapp^{51,54} e colaboradores, estes valores estão reproduzidos na tabela 2.

Tabela 2 - Constantes de velocidades estimadas para a oxidação de etanol e redução de acetaldeído para o mecanismo mostrado na figura 5.

Constante de velocidade	Etanol/Acetaldeído
k₁ (M⁻¹s⁻¹)	4,5.10⁷
k₋₁ (s⁻¹)	2,3.10⁴
k₂ (M⁻¹s⁻¹)	2,4.10⁵
k₋₂ (s⁻¹)	560
k₃ (s⁻¹)	490 (150)
k₋₃ (s⁻¹)	610 (360)
k₄ (s⁻¹)	64
k₋₄ (M⁻¹s⁻¹)	9,2.10⁴
k₅ (s⁻¹)	5,5
k₋₅ (M⁻¹s⁻¹)	1,1.10⁷

Fonte: Relido de PLAPP, B. V., 2010, p. 6.

A técnica utilizada, pelos autores, para o cálculo das constantes de velocidade foi a espectrofotometria *stopped-flow*, na qual um software foi utilizado para obtenção de dados de transiente e das constantes de velocidade observadas^{51,54}. Os valores para a etapa 3 em parênteses são para substratos deuterados, no qual as constantes de velocidade para as outras

etapas foram mantidas para a simulação. Destes dados, podemos observar que a constante k_{-5} possui a magnitude de 10^7 , que é muito alta comparada ao k_5 , isto nos mostra que o NADH possui alta afinidade pela estrutura enzimática, assim limitando a reação de oxidação de etanol, uma vez que se torna necessário a regeneração da coenzima para que esta reação ocorra.

2.4 BIOELETROCATÁLISE

A eletrocatalise pode ser definida como o aumento na taxa de uma reação eletroquímica por substância que não é consumida na reação, que é o eletrocatalisador.⁵⁵ Em um processo eletrocatalítico, o eletrodo não tem a função de simplesmente transferir elétrons, este participa efetivamente da reação, gerando sítios de adsorção e transferência eletrônica.⁵⁶ Quando o substrato eletródico possui sítios que tem a capacidade de adsorver o reagente, a probabilidade de se atingir uma situação energética que favoreça a transferência de elétrons aumenta significativamente, logo os materiais que possuem esta propriedade são chamados de eletrocatalisadores.⁵⁷ Portanto, a atuação como eletrocatalisador dependerá da estrutura eletrônica dos átomos da superfície que compõem o eletrodo, assim como natureza química da superfície, morfologia e estrutura cristalina.⁵⁸ Para que se tenha esta situação alguns tipos de materiais são utilizados no recobrimento de eletrodos, os quais alteram a região interfacial do eletrodo e, portanto, atuando como eletrocatalisadores, tais como nanomateriais,^{59;60} monocamadas^{61;62} e *clusters* metálicos.⁶³ Em suma, um ciclo eletrocatalítico típico compreende em três etapas: (a) transporte do reagente do eletrólito até o sítio ativo, (b) reação eletrocatalítica e (c) transporte dos produtos para longe da superfície do catalisador. Na etapa (b), sub-reações devem ser consideradas, que inclui a adsorção dos reagentes, a transferência de elétrons e a dessorção dos produtos.⁶⁴

Em bioeletrocatalise, os agentes eletrocatalisadores são biomoléculas, em especial as enzimas da classe das oxidoredutases, as quais catalisam reações de oxido-redução.^{65,66} As oxidoredutases se dividem em subclasses, as quais são: oxidases, desidrogenases, catalases, oxigenases e peroxidases.⁶⁷ Dentre estas, as duas primeiras merecem destaque por catalisarem o mesmo tipo de reação, isto é, partindo de um mesmo substrato a reação catalítica leva ao mesmo produto, porém seguindo mecanismos diferentes.⁶⁸ Por exemplo, tanto a álcool oxidase (AOX) como a álcool desidrogenase (ADH) oxidam o etanol produzindo acetaldeído⁶⁹, as reações para estas enzimas estão apresentadas nas equações 1 (a e b) e 2, respectivamente. As oxidases transferem elétrons para o cofator enzimático dinucleotídeo de flavina e adenina FAD, que é reoxidado posteriormente na presença de oxigênio, formando peróxido de oxigênio. Já as

desidrogenases transferem elétrons diretamente para uma espécie aceptora de elétrons da enzima, neste caso trata-se de uma coenzima, que é a dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, NAD^+ . A ADH é considera mais estável e possui maior especificidade que a AOX, porém para estudos bioeletroquímicos da ADH é necessário a adição externa da coenzima NAD^+ .⁶⁹

A atividade catalítica de uma enzima redox como catalisador biológico depende, em alguns casos, da sua estrutura proteica. Em algumas situações é necessário a presença de cofatores não-proteicos, tais como metais para as metaloenzimas ou moléculas orgânicas no caso de coenzimas.⁷⁰ Em bioeletrocatalise, estes cofatores podem atuar como centros redox que trocam cargas com o eletrodo, os quais se encontram dentro da estrutura proteica que não é condutora apresentando alta seletividade e especificidade.⁵⁸ A transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo é mais lenta quando comparada com eletrocatalisadores convencionais.

Um outro fator que influencia na performance bioeletrocatalítica é o que concerne à eletródica. Para se alterar as características de um suporte eletródico pode-se usar algumas estratégias, tais como a utilização de mediadores redox, aproximação dos cofatores enzimáticos na superfície eletródica e a modulação do nível de Fermi do material que compõe o eletrodo. A figura 6 apresenta esquemas do funcionamento das estratégias abordadas para processos de oxidação enzimática.

O primeiro esquema (figura 6a) mostra dois tipos de processos bioeletroquímicos, no qual a troca de elétrons entre a superfície do eletrodo e a enzima ocorre de duas formas: direta ou mediada. No primeiro caso, a enzima transfere os elétrons para a superfície do eletrodo sem auxílio de outras espécies e esse processo é conhecido como transferência direta de elétrons.⁷¹ No segundo caso, a enzima transfere os elétrons para o eletrodo por meio de uma espécie mediadora de elétrons.⁷² A principal vantagem da utilização destas espécies mediadoras de elétrons é ela possibilita a aproximação entre o cofator e a superfície eletródica, uma vez que a

estrutura proteica da enzima é muito volumosa, assim facilitando a troca de elétrons entre a enzima e o eletrodo.

Figura 6 - Estratégias de alteração dos eletrodos para a aplicação em bioeletrocatalise. (a) Transferência direta (acima) e mediada de elétrons; (b) modulação do nível de Fermi do eletrodo para processos de oxirredução; (c) Aproximação do cofator enzimático através da formação de defeitos na superfície eletródica.

Fonte: Fig. 4a e b autoria própria, fig. 4c Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de MARTINS, M. V. A., 2014, p. 17434.

A utilização de mediadores é aplicada, por exemplo, quando se tem a oxidação de um substrato em um bioeletrodo que é composto por uma enzima NAD-dependente que produz o cofator reduzido, o qual precisa ser regenerado *via* oxidação electrocatalítica para que a catálise enzimática continue. Vários mediadores e electrocatalisadores têm sido empregados na electro-oxidação do NADH em baixos potenciais, tais como fenotiazinas e compostos de rutênio.^{73,74} Compostos que contêm grupos funcionais quinona merecem destaque, pois auxiliam na regeneração do NAD^+ pela electro-oxidação do NADH gerado no processo de oxidação de um substrato.⁷⁵ Neste contexto, na superfície de materiais de carbono pode ser facilmente formados

grupos funcionais do tipo quinona por reações simples de oxidação, assim tornando-se uma potencial plataforma eletródica para a avaliação da bioeletroquímica de enzimas NAD-dependentes. As reações eletroquímicas seguem as leis da mecânica quântica, logo os processos eletroquímicos ocorrem apenas em situações em que o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) ou o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO) possua a mesma energia do elétron no nível de Fermi do eletrodo. Desta forma, pode-se ter a transferência de elétrons do eletrodo para o LUMO da espécie eletroativa, ocorrendo assim processo de redução, ou pode ocorrer a transferência de elétrons do HOMO da espécie eletroativa para o eletrodo, sendo este o processo de oxidação.⁷⁶ O nível de Fermi de um eletrodo pode ser modulado pela aplicação de uma diferença de potencial utilizando-se de um potenciostato ou pela alteração da estrutura do material eletródico. Para que se tenha um processo bioeletrocatalítico de oxidação, é necessário que o HOMO da espécie eletroativa esteja em um estado de energia maior ou igual ao nível de Fermi do eletrodo, como representado no esquema b da figura 6.

Uma outra forma de melhorar a performance bioeletroquímica está apresentada no esquema c da figura 6, a qual mostra que a formação de defeitos (II) também por levar a melhora da performance bioeletrocatalítica, pois esta estratégia faz com que o cofator fique mais próximo da superfície do eletrodo, assim a enzima transfere elétrons de forma mais eficiente para o eletrodo.³⁸ Além disso, a formação de defeitos na estrutura do eletrodo melhora o processo de imobilização enzimática.

Os processos que envolvem a transferência de elétrons podem ser investigados pela utilização de um potenciostato, já os produtos formados não podem ser detectados, por isso devemos recorrer as técnicas eletroquímicas acopladas a técnicas instrumentais analíticas.

2.5 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS ACOPLADAS TÉCNICAS INSTRUMENTAIS ANALÍTICAS

Para se obter modelos de mecanismos bioeletrocatalíticos há de se recorrer a técnicas eletroquímicas acopladas a alguma técnica instrumental analítica, tais como espectroscopias de infravermelho,⁷⁷⁻⁸⁰ UV-Vis⁸¹, fluorescência⁸², Raman⁸³, dicroísmo circular magnético⁸⁴ e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.⁸⁵ Métodos bioeletroquímicos combinados com uma técnica espectroscópica podem fornecer informações detalhadas sobre a atividade enzimática, a taxa reacional e a estrutura de estados relevantes da proteína alvo. Por exemplo, a técnica de infravermelho (IR) sob controle eletroquímico (IR *in*

situ)⁷⁸ tem sido usada no estudo de metaloenzimas, tais como hidrogenases e nitrogenases. A técnica de IR *in situ*, com detecção por reflectância total atenuada (ATR) foi utilizada na caracterização da regeneração da estrutura proteica (*turnover* proteico) de hidrogenases com sítio ativo níquel-ferro (NiFe)⁸⁰ (figura 7a). Neste estudo, foi possível observar as mudanças das bandas sob controle de potencial, associadas com o sítio ativo da enzima como apresentado na figura 7b.

Figura 7 - a) Ciclo catalítico da hidrogenase NiFe, em preto a oxidação do H₂ e em cinza a inativação da hidrogenase NiFe. b) cronoamperogramas em diferentes sobrepotenciais para a hidrogenase em atmosfera de hidrogênio saturada (linha preta) e em atmosfera de argônio saturada (linha cinza) em solução-tampão. c) e d) Mostram espectros da região ν_{CO} em cada potencial sob atmosfera de argônio saturado c) e em atmosfera de hidrogênio saturada d).

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de HIDALGO, R., 2015, p. 7110 e 7112

Em eletrocatalise, técnicas *in situ* ou *online* também são utilizadas, por exemplo, a espectrometria de massas eletroquímica diferencial (DEMS). Esta técnica é utilizada, em eletrocatalise, como uma forma de buscar a elucidação de mecanismos eletrocatalíticos de compostos orgânicos voláteis. Esta técnica permite a identificação da formação de intermediários e de produtos de reações eletroquímicas de moléculas orgânicas pequenas, um exemplo é a reação de oxidação do etanol.⁸⁶

A figura 8 apresenta, esquematicamente, o equipamento de DEMS. Este sistema é composto por uma célula eletroquímica convencional conectada a um espectrômetro de massas.

Esta conexão se dá por uma membrana de Teflon[®], a qual é hidrofóbica e permite somente a passagem de compostos orgânicos com alta pressão de vapor.

Figura 8 - Esquema do DEMS. 1) Meia-célula eletroquímica, 2) Conexão entre a meia-célula eletroquímica e o espectrômetro de massas, 3) câmara de pré-vácuo, 4) bombas turbomoleculares, 5) quadrupolo e 6) controlador. As esferas vermelhas representam compostos voláteis, e as azuis e amarelas são os fragmentos ionizados.

Fonte: autoria própria

Neste trabalho, propõe-se pela primeira vez a utilização de DEMS para estudo mecanístico da bioeletroxidação do etanol pela enzima ADH, a fim de elucidar etapas do processo de bioeletrocatalise. Esta técnica permite a detecção concomitante do acetaldeído formado pela oxidação do etanol e do NADH formado pela redução da coenzima NAD^+ . O acetaldeído é detectado pela técnica de espectrometria de massas e o NADH pelo potenciostato. A figura 8a apresenta, esquematicamente, o equipamento de DEMS, este sistema é composto por uma célula eletroquímica convencional conectada a um espectrômetro de massas. Esta conexão se dá por uma membrana de Teflon[®], a qual é hidrofóbica e permite somente a passagem de compostos orgânicos com alta pressão de vapor.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é investigar a modificação da superfície dos eletrodos de FFC utilizando dois métodos oxidativos: um composto por $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ e o outro por $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. Com estes tratamentos, objetiva-se melhorar o processo de transferência de elétrons visando a bioeletroxidação do NADH. Além disso, objetiva-se avaliar o desempenho eletroquímico da enzima ADH e estudar a bioeletrocatalise de oxidação do etanol por espectrometria de massas eletroquímica diferencial (DEMS).

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 ETAPAS DO PROJETO

O procedimento experimental está dividido em seis etapas. A figura 9 contém o fluxograma que resume em quais etapas esse estudo está dividido e quais as técnicas utilizadas. A etapa final que é o estudo de bioeletrocatalise foi dividida em duas partes: a primeira foi um estudo por eletroquímica convencional da bioeletrocatalise de oxidação do etanol pela enzima ADH e a segunda foi uma abordagem inédita para o estudo desta reação utilizando a técnica de detecção online, que foi a DEMS.

Figura 9 - Fluxograma descrevendo as etapas desse estudo e as técnicas utilizadas em cada uma.

Fonte: autoria própria

4.2 MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes e materiais utilizados neste trabalho encontram-se listados na tabela 3. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e as vidrarias foram previamente limpas e secas.

Tabela 3 - Reagentes e materiais utilizados na modificação das FFC e no estudo da bioeletrocatalise da enzima álcool desidrogenase.

Reagente/material	Marca
Ácido clorídrico 37%	Fluka
Ácido nítrico 65%	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico 98%	Vetec
Álcool desidrogenase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich
Cloreto de potássio	Synth
Cloreto de hexaminrutênio (III)	Sigma-Aldrich
Etanol >99,5%	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio bibásico heptahidratado	Synth
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	Synth
Hexacianoferrato (II) de potássio	Sigma-Aldrich
Hexacianoferrato (III) de potássio	Sigma-Aldrich
Solução de náfion 117 (5% mistura de álcoois alifáticos e água)	Sigma-Aldrich
Permanganato de potássio 99%	Synth
Propanol 99,5%	Vetec
Tecido de carbono	CCS 200
Membrana de Teflon®	GoreTex

Fonte: autoria própria

4.3 TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS DAS FIBRAS FLEXÍVEIS DE CARBONO

4.3.1 Transformação química com permanganato de potássio e ácido sulfúrico

Duas metodologias distintas foram realizadas para a transformação química das FFC^{38;39}, a primeira consistiu em um tratamento de oxidação em uma solução de H₂SO₄ e KMnO₄ (transformação 1). Para isto, foram dissolvidos 464 mg de KMnO₄ em 120 mL de uma solução de H₂SO₄ 1,0 mol L⁻¹. Em seguida, 0,5 g de FCF foram imersas na solução formada por H₂SO₄/KMnO₄. O sistema foi mantido no ultrassom durante 3 horas, a 40 °C. Após isso, as

fibras foram lavadas com HCl concentrado com o intuito de remover o MnO_2 formado e, em seguida, lavadas com água destilada, até que todo o ácido fosse removido. As FFC submetidas a esta transformação foi atribuída a notação FFC-T1.

4.3.2 Transformação química com ácido sulfúrico e ácido nítrico

Para a segunda transformação química utilizou-se uma mistura ácida de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ na proporção 3:1, nesta solução, foi imerso 0,5 g de FFC e foram mantidas em repouso por uma hora (tratamento 2). Posteriormente a solução foi aquecida a 70 °C, com auxílio de uma chapa de aquecimento, por 3 horas. Depois, elevou-se a temperatura da mistura a 80 °C por mais 1 hora. As FCF foram retiradas da mistura ácida, lavadas com água ultrapura, secas e armazenadas em temperatura ambiente. Para as FFC submetidas a esta transformação foi atribuída a notação FFC-T2.

4.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, DE SUPERFÍCIE E DA MICROESTRUTURA DAS FFC.

Para caracterização da morfologia topográfica das FFC utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), as imagens foram obtidas utilizando um microscópio FEI Magellan 400L, a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) também foi realizada no mesmo equipamento. O imageamento foi realizado no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos.

A caracterização da natureza química da superfície foi realizada por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (do inglês, XPS), para a qual utilizou-se um espectrômetro comercial UNI-SPECS UHV System sob pressão menor que 5×10^{-7} Pa. A linha Mg $K\alpha$ foi utilizada ($h\nu = 1253,6$ eV) como fonte de ionização e a energia de passagem do analisador foi ajustada para 10 eV. O ruído inelástico dos espectros de alta resolução C 1s N 1s e O 1s foi subtraído utilizando o método de Shirley. A composição em porcentagem atômica da camada superficial (<5 nm) foi determinada pelas proporções relativas das áreas dos espectros corrigidas pelos fatores de sensibilidade atômica de Scofield, com uma precisão de $\pm 5\%$. Os espectros foram deconvoluídos utilizando função do tipo pseudo-voigtiana, com combinações Gaussianas (70%) e Lorentzianas (30%). A largura à meia altura variou entre 1,2 e 2,1 eV, e a posição dos picos foi determinada com precisão de $\pm 0,1$ eV. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia de Fotoelétrons na Unesp de Araraquara.

A análise da microestrutura das FFC foi realizada por um estudo cristalográfico, no qual utilizou-se um difratômetro de raios-X equipado com duas microfontes, cobre e molibdênio, Bruker/Apex II Duo. Para a difração, utilizou-se a radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda = 0,15406$ nm) em um intervalo 2θ variando entre 10° e 70° com passos de $0,2^\circ$ medidos a cada 12 s. As medidas foram realizadas na Central Analítica do IQSC-USP.

4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

A figura 10a mostra o tecido de carbono, do qual um conjunto de fibras são extraídos para a fabricação de eletrodos de FFC. A figura 10b mostra a quantidade de fibras usada para um único eletrodo. A figura 10c apresenta uma imagem de MEV-FEG de um conjunto de fibras utilizada no eletrodo, enquanto na figura 10d uma fibra com um fio de cabelo, com os diâmetros de $6,67\ \mu\text{m}$ e $74,89\ \mu\text{m}$, respectivamente.

Figura 10 - a) Fotografias do tecido de carbono (CCS 200) e b) conjunto de fibras utilizada para um eletrodo. Imagens de MEV-FEG de c) um conjunto de fibras e d) comparação entre uma única fibra ($6,67\ \mu\text{m}$) e um fio de cabelo ($74,89\ \mu\text{m}$).

Fonte: Retirado de PEREIRA A. R., 2016, p. 397.

A região do eletrodo de trabalho que ficou em contato com a solução foi delimitada com resina epóxi, com área geométrica final de aproximadamente $0,1 \text{ cm}^2$, como eletrodo de referência utilizou-se o eletrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ e o como contra eletrodo uma placa de platina com área de $0,5 \text{ cm}^2$. A delimitação com resina epóxi, apresentada na figura 11b, impede a ascensão de eletrólito por capilaridade pelo corpo da fibra até o contato elétrico.

Figura 11 - a) Eletrodo de FFC com a área delimitada com resina epóxi e b) Região ampliada da resina epóxi na FFC.

Fonte: Retirado de PEREIRA A. R., 2016, p. 399.

As técnicas eletroquímicas utilizadas para avaliação de propriedades eletroquímicas dos eletrodos baseados em fibra flexível de carbono foram a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica. Para a investigação da performance eletroquímica dos eletrodos de FFC utilizou-se as sondas redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)]\text{Cl}_3$, em eletrólito suporte de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl . Para analisar detalhadamente as propriedades da interface eletrodo/solução, como a resistência a transferência de carga e propriedades intrínsecas de supercapacitores, empregou-se a técnica de espectroscopia em eletrólito suporte de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Uma outra caracterização eletroquímica da superfície foi utilizando a sonda redox NADH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato em diversos valores de pH.

4.6 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE

O eletrodo enzimático para o estudo bioeletroquímico, em uma célula eletroquímica convencional, foi preparado pela adsorção física da ADH por 24 horas, no qual um conjunto de FFC-T1 foi mantida em um tubo *eppendorf*[®] de 2 mL contendo 200 μL de ADH 8 mg mL^{-1} em solução-tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,5. Posteriormente, utilizou-se a técnica de aprisionamento, na qual foi gotejado sob o eletrodo 20 μL de Náfon 2,5 % em solução-tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,5 e mantido no dessecador por 1 hora. Este eletrodo foi utilizado nos estudos por voltametria cíclica com incrementos de etanol.

4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS ELETROQUÍMICA DIFERENCIAL (DEMS)

No estudo de bioeletrocatalise, na célula do eletroquímica do DEMS, o eletrodo de trabalho foi preparado utilizando a FFC-T1 com ADH imobilizada. Utilizou-se dois processos de imobilização. O primeiro foi realizado pela adsorção de 200 μL de solução de ADH 16 mg mL^{-1} e mantida na geladeira por 5 horas, e posteriormente levado a dessecador com 20 μL de solução de Nafion[®] 5% para a imobilização enzimática. Posteriormente, a imobilização foi otimizada, então o segundo processo de imobilização se deu pelo gotejamento de 200 μL de solução de ADH 8 mg mL^{-1} na superfície da FFC-T1, a qual foi mantida na geladeira por 3 horas, posteriormente levado a dessecador por 2 horas. Depois gotejou-se, sob o eletrodo, 20 μL de Náfon 2,5 % em solução-tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,5 e mantido no dessecador por 1 hora, para o aprisionamento da enzima na superfície eletródica. Este eletrodo é chamado de FFC-T1-ADH.

O estudo bioeletrocatalítico da oxidação do etanol pela enzima ADH foi realizada utilizando a técnica de DEMS. Esta técnica permite a detecção *online* de compostos voláteis ou gasosos de reações eletroquímicas. A figura 12 mostra o equipamento manufaturado: 1) célula eletroquímica manufaturada; 2) câmara de pré-vácuo, na qual os compostos voláteis estão em fase gasosa; 3) bomba turbomolecular da câmara de pré-vácuo; 4) analisador quadripolar; 5) bomba turbomolecular da câmara principal; 6) válvulas; 7) controlador eletrônico e 8) computador. O espectrômetro de massas quadripolar é um Pfeiffer Vacuum QMA 200 com duas câmaras diferenciais de bombeamento. O potencial eletroquímico foi registrado, simultaneamente, com a intensidade das massas para os valores selecionados de razão massa/carga (m/z) dos sinais iônicos, os quais foram m/z 22, 29 e 44. Um eletrodo de platina

com grande área e um de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-_{\text{sat}}$ foram utilizados como contra-eletródo e eletródo de referência, respectivamente. Como eletródo de trabalho utilizou-se a FFC-T1-ADH. O sistema eletroquímico foi controlado por potenciostato/galvanostato Autolab, PGSTAT 128N.

Nesta técnica o eletródo de trabalho fica sobreposto sobre uma membrana porosa de politetrafluoretileno (PTFE), também conhecida pela marca comercial Teflon[®], com porosidade de 0,02 μm da marca GoreTex, a qual permite a passagem de reagentes e produtos voláteis ou gasosos.

Figura 12 - Configuração do equipamento de DEMS. 1) Célula eletroquímica; 2) câmara de pré-vácuo; 3) bomba turbomolecular da câmara de pré-vácuo; 4) analisador quadripolar; 5) bomba turbomolecular da câmara principal; 6) válvulas; 7) controlador eletrônico e 8) computador.

Fonte: Retirado de DE SOUZA, J. C. P., 2017, (*supporting information*).

A figura 13 destaca algumas partes fundamentais do equipamento de DEMS. Nas figuras 13a e b são apresentadas a peça de aço que estabelece a conexão entre a célula eletroquímica e o espectrômetro de massas, nestas figuras o eletródo de trabalho já está montado para o uso. Na figura 13a estão apontadas a região em são fixadas as FFC e o fio de ouro que estabelece a conexão elétrica com o potenciostato. Na figura 13b mostra o topo da peça que é a região que é conectada a célula eletroquímica e a base que é conectada ao espectrômetro de massas.

A figura 13c mostra o conector de aço desmontado, na qual pode se observar a disco de aço poroso, que possui porosidade de ordem micrométrica, que permite a difusão facilitada de compostos voláteis após a passagem destes pela membrana de PTFE. Além disto, este disco serve como suporte mecânico para a membrana de PTFE. A figura 13d apresenta o conector elétrico de ouro em 1, o qual é composto por um fio e um *o-ring* de ouro, sendo que este é colocado em contato direto com as FFC para o controle do sobrepotencial em relação ao eletrodo de referência e também para a passagem de corrente. Nesta figura, 2 apresenta um conjunto de FFC que são dimensionadas e alocadas sobre a membrana de PTFE em 3.

Figura 13 - a) e b) Peça de aço que estabelece a conexão entre a célula eletroquímica (EC) e o espectrômetro de massas (MS). Em a) está apontado o fio de ouro que estabelece o contato elétrico e o eletrodo de trabalho que é a FFC. Em b) o topo é conectado a EC e a base ao MS. c) Conector de aço sem a montagem do eletrodo de trabalho. d) fio e *o-ring* de ouro que estabelece a conexão elétrica entre o eletrodo de trabalho e o potenciostato (1), FFC antes e após o dimensionamento (2), Membrana de PTFE (3). e) meia-célula eletroquímica 1) eletrodo de referência, 2) contra eletrodo de platina, 3) eletrodo de trabalho, 4) entrada de gás, 5) entrada de fluido termostatizado. f) Interior da meia-célula eletroquímica.

Fonte: autoria própria

A figura 13e apresenta a meia-célula eletroquímica, a qual é composta por um eletrodo de referência (1), um contra eletrodo de platina em forma de anel (2), um eletrodo de trabalho que é um conjunto de FFC conectadas pelo fio de ouro (3) e uma entrada de gás que utilizada para saturar o sistema (4), neste caso o gás utilizado foi o argônio. Em (5) consisti na entrada e saída de fluidos termostatizados para o controle da temperatura do sistema. A figura 13f mostra com mais detalhes o interior da meia-célula eletroquímica, na qual podemos observar o fio de ouro, o anel de platina do contra-eletrodo, a ponta do eletrodo de referência próximo ao eletrodo de trabalho e a tubulação para entrada de gás no sistema.

4.8 CINÉTICA BIOELETROQUÍMICA

A cinética enzimática homogênea foi descrita pela primeira vez qualitativamente e quantitativamente por Leonor Michaelis and Maud Leonora Menten, em 1913.^{87,88} Eles estudaram a reação da enzima invertase, que é reconhecida por este nome devido a promoção da inversão da rotação óptica positiva da sacarose para a negativa da soma da frutose e da glicose. Nesse estudo, eles monitoraram a taxa reacional catalisada pela invertase em diferentes concentrações de sacarose pela medida da rotação óptica em função do tempo^{87,88}, até a reação se completar. Este modelo propõe que ocorre uma etapa intermediária que é a formação de um complexo enzima substrato, em que a reação pode se proceder no sentido direto ou inverso. Com isto foi estabelecida a relação entre a concentração de substrato com a velocidade da taxa reacional, que é dada pela seguinte equação:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

onde V_0 é a velocidade inicial da reação, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima, K_m é a constante de Michaelis e $[S]$ é a concentração de substrato. Uma derivação deste modelo muito usual em bioquímica é o gráfico do duplo-recíproco ou Lineweaver-Burk, que é dado pela seguinte equação:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{[S]} \frac{K_m}{V_{max}} \quad (4)$$

Em bioeletroquímica, este modelo pode ser adaptado para correntes obtidas de cronoamperometria no estado estacionário⁸⁹⁻⁹¹, assim a corrente faradaica pode ser utilizada na obtenção de parâmetros cinéticos pela seguinte equação:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{1}{[S]} \frac{K_m^{app}}{I_{max}} \quad (5)$$

onde I_{ss} é a corrente de estado estacionário após a adição do substrato, I_{max} é a corrente máxima medida sob condições de saturação de substrato, $[S]$ é a concentração de substrato no *bulk*, e K_m^{app} é a constante de Michaelis-Menten aparente.

Com as correntes faradaicas e iônicas, obtidas por DEMS, *versus* a concentração de substrato (etanol) obteve-se uma regressão linear que segue a equação 5. De onde o coeficiente angular da curva é referente ao K_m^{app}/I_{max} , o qual é proporcional ao K_m/V_{max} .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MORFOLOGIA, COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS FFC

Antes e após os tratamentos oxidativos, as FFC foram submetidas a caracterização morfológica. As imagens de MEV-FEG, apresentadas na figura 14, revelam detalhes dos aspectos morfológicos das FFC antes e após os tratamentos. As fotomicrografias apresentadas nas figuras 14a e b mostram a FFC pristina em diferentes magnificações, a qual apresenta a superfície estriada com linhas paralelas ao longo do eixo axial, com sulcos pouco profundos. Esta morfologia é característica de fibras de carbono obtidas pelo processo de carbonização de filamentos de poliacrilonitrila, por fiação a úmido.⁹³

As figuras 14c e d têm-se as imagens da fibra submetida a transformação química 1 (FFC-T1), a qual pode-se observar o aumento na profundidade dos sulcos e a formação de defeitos na superfície da fibra. Este aumento se deve, principalmente, pela oxidação da superfície, uma vez que as FFC foram expostas a um sistema oxidativo composto por KMnO_4 e H_2SO_4 . Além disso, o ultrassom pode auxiliar na formação destes defeitos através dos processos de cavitação e sonólise.⁹⁴

As figuras 14e e f mostram as imagens da fibra submetida ao transformação química 2, na qual foi observado a formação de estruturas vesiculares (globulares), no qual a sua formação é atribuída a possível intercalação de íons entres as camadas gráficas e pela evolução de gases.⁹⁵⁻⁹⁷ A evolução de gases pode ser proveniente da mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$, que podem seguir as reações 6, 7 e 8:⁹⁸

Resultados semelhantes são encontrados para materiais como o HOPG. O processo proposto para a formação destas vesículas é que a oxidação do HOPG leva a delaminação

seguida pela deformação retículo induzindo a fratura, a qual resulta em um tamanho menor do microcristalito^{95,96}. Além disso, há a evidência que, em meio aquoso contendo 1 mol L^{-1} de H_2SO_4 ou 1 mol L^{-1} de HNO_3 , a danificação do retículo grafítico é procedida ou acompanhada pela intercalação de alguns íons entre as camadas grafíticas. A proposição de que a força motriz para expansão vertical e horizontal das vesículas é devido ao estresse mecânico causado pela evolução de gases na subsuperfície, no qual a identidade do gás é incerta, podendo ser CO_2 , CO ou O_2 .

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo em diferentes magnificações: a) e b) FFC prístina; c) e d) FFC-T1; e) e f) FFC-T2.

Fonte: autoria própria

A figura 15a mostra a estrutura de uma única fibra e, em I, tem-se as características morfológicas de uma FFC sumarizadas, na qual mostra a sobreposição das camadas lamelares e porosidade.⁹⁹ A região externa da fibra apresenta uma morfologia irregular e a região interna é composta por camadas lamelares. Em II mostra as mesofases durante o processo de carbonização e grafitização de uma FFC¹⁰⁰, na qual se evidencia a formação de planos grafíticos ao longo do eixo axial. Em III apresenta um esquema tridimensional da estrutura de uma fibra de carbono, mostrando novamente, que os planos grafíticos crescem preferencialmente no sentido axial.¹⁰¹

A figura 15 esquematiza o processo da formação das vesículas em estruturas grafíticas. A figura 15b I representa uma seção transversal de uma estrutura grafítica, no qual as linhas representam camadas desta estrutura, as interrupções nas linhas representam defeitos no plano basal, os quais permitem a entrada de eletrólito entre as camadas. Em B as linhas marcadas representam as regiões onde a intercalação de íons e água ocorreram. Em C mostra a evolução dos gases proporcionando a formação de uma vesícula.

Figura 15 - a) características morfológicas de uma FFC sumarizadas, na qual mostra a sobreposição das camadas lamelares e porosidade (I); mesofases durante o processo de carbonização e grafitização de uma FFC (II); esquema tridimensional da estrutura de fibra de carbono (III). b) Modelo esquemático da formação de vesículas na superfície da FFC-T2: I) seção transversal de uma cristallito grafítico da FFC, a qual as linhas representam os planos grafíticos; II) oxidação e intercalação de íons e água, após a imersão no mistura de H_2SO_4/HNO_3 ; III) Formação do blister pela intercalação e delaminação, e pelo estresse mecânico pela evolução de gases.

Fonte: Figura a) adaptação de Souza, J. C. P. 2017 a partir de PEREIRA A. R., 2017, p. 1699; MARSH, H., 1991, p. 704; BENNETT, S. C., 1983, p. 3338. Figura b) adaptação de Souza, J. C. P. 2017 a partir de HATHCOCK, K. W., 1995, p. 2002.

A técnica de EDS foi utilizada para obter informações sobre a composição química elementar das FFC. Dentre os aspectos importantes na medida de EDS, vale ressaltar que a aceleração dos elétrons, no equipamento MEV-FEG, a qual é determinada pela diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo no gerador de elétrons, influencia no tamanho do volume de interação e na profundidade de penetração do feixe de elétrons, os sinais gerados são de ordem micrométrica, portanto trata-se de uma análise elementar do *bulk* do material. A região analisada por EDS é de aproximadamente $1\ \mu m^3$. De acordo com a microanálise a fibra prístina

é composta 98,9% de carbono e 1,1% de oxigênio, a qual quando submetida aos tratamentos oxidantes aumenta-se a porcentagem de oxigênio para 3,3% e 14,4% para o tratamento 1 e 2, respectivamente. Isto mostra que a oxidação do tratamento 1 foi mais branda e superficial, enquanto o tratamento 2 foi mais agressivo.

Para análise química da superfície das FFC utilizou-se a técnica de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), na qual a profundidade de amostragem é 3-10 nm. A análise elementar da superfície (camada de 5nm) das FFC realizada *via* espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, revelou que as mesmas se constituem dos elementos: carbono, oxigênio, nitrogênio e silício (figura 16). A presença de nitrogênio se deve ao fato de se utilizar PAN com material precursor na fabricação das FFC, já a presença de silício ocorre, pois é utilizado silicone para que não ocorra a aglutinação das fibras no processo de carbonização.¹⁵ Os picos de silício resistem mesmo após as FFC serem submetidas aos tratamentos, mas com intensidade atenuada. Os resultados da análise elementar de XPS corroboram com os resultados de EDS, uma vez que ambos apresentam que as FFC são constituídas essencialmente de carbono e oxigênio. A tabela 4 apresenta os valores percentuais da composição das FFC analisadas por EDS e XPS.

Uma peculiaridade da técnica de XPS frente à EDS é que a partir dela é possível detectar nitrogênio, que possivelmente está presente em toda a estrutura pelo fato da fibra ser obtida da PAN. Já os demais elementos são elementos que estão somente adsorvidos a superfície devido aos processos de tratamento e fabricação, estes elementos são: enxofre e silício. Confrontando as duas técnicas podemos verificar também que a FFC prístina e a FFC-T1 apresentam uma grande porcentagem de oxigênio na superfície no espectro de XPS, enquanto para a técnica de EDS a porcentagem de carbono é muita mais alta para estas fibras, isto se deve a profundidade de operação distintas para as duas análises.

Tabela 4 - Composição química elementar obtidas por EDS das FFC prístina e submetidas aos tratamentos.

<i>FFC (técnica)</i>	<i>Carbono</i>	<i>Oxigênio</i>	<i>Nitrogênio</i>	<i>Silício</i>	<i>Enxofre</i>
Prístina (EDS)	98,9 %	1,1 %	-	-	-
FFC-T1 (EDS)	96,7 %	3,3 %	-	-	-
FFC-T2 (EDS)	85,6 %	14,4 %	-	-	-
Prístina (XPS)	83,5 %	15,3 %	0,4 %	0,7 %	-
FFC-T1 (XPS)	84,7 %	13,5 %	1,3 %	0,5 %	-
FFC-T2 (XPS)	73,9 %	20,1 %	3,7 %	0,4 %	1,9%

Fonte: Autoria própria.

A figura 16 apresenta o resultado de análise elementar por XPS das FFC prístina e tratadas. Este espectro apresenta os picos de caroço dos elementos encontrados na superfície do material analisado, no qual utiliza-se a notação espectroscópica dos níveis eletrônicos para a identificação destes picos. Nesta notação considera-se primeiramente o número quântico principal ($n = 1, 2, 3...$) referente as camadas eletrônicas (K, L, M...). Posteriormente, é atribuído o momento angular orbital l (s, p, d e f) e, por último, é identificado o momento angular total do elétron j , o qual é soma do momento angular orbital com o momento de spin do elétron. Os picos de caroço encontrados foram: C 1s, O 1s, N 1s, Si 2s e S 2p.

Figura 16 - Análise elementar por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X. a) FFC prístina, b) FFC-T1 e c) FFC-T2.

Fonte: autoria própria

Na figura 16 também pode-se observar um pico Auger, que ocorre quando a vacância de deixada pelo fotoelétron é preenchida por um elétron de uma camada mais externa e, a energia deste processo é transmitida a outro elétron, o qual é ejetado do átomo, chamado de elétron Auger. A emissão Auger se encontra na energia de ligação de 977 eV.

A técnica de XPS é crucial para análise na formação de grupos funcionais em superfícies, em especial, materiais opacos a base de carbono que são difíceis de analisar por outras técnicas espectroscópicas. Quando ocorre a funcionalização, ocorre alteração na estrutura eletrônica dos átomos, assim modificando energia dos elétrons de valência e também dos elétrons mais internos. Esta variação é característica para cada tipo de ligação e é chamada de desvio químico. Como as FFC são compostas basicamente de carbono, como confirmado por EDS, e os tratamentos utilizados são oxidativos, ou seja, ocorre a inserção de grupos funcionais oxigenados nas amostras, pode-se obter informações sobre a funcionalização pela análise dos desvios químicos nas regiões C 1s e O 1s.

Para se obter informações sobre a funcionalização da superfície foi realizada a deconvolução dos espectros nas regiões dos picos C 1s e O 1s. As figuras 17 a-c apresentam os picos dos espectros de XPS deconvoluídos na região C 1s, para a FFC prístina, FFC-T1 e FFC-T2, respectivamente. As energias das ligações características já são bem descritas na literatura,¹⁰²⁻¹⁰⁴ portanto pode-se atribuir aos picos os grupos funcionais ou a presença de moléculas adsorvidas na estrutura. Os picos da região C 1s foram enumerados da seguinte forma: I CO, CO₂ adsorvidos e plásmon π - π^* (291,3 - 290,4 eV), II grupos carboxílicos ou ésteres (288,6 - 289,1 eV), III grupos carbonilas ou quinonas (287,7 eV), IV grupos fenólicos, álcoois, éter ou nitrila (286,4 eV), V carbono sp³ (285,1 eV), e VI carbono sp² (284,6 eV). Como resultado, podemos observar que as fibras tratadas apresentam um pico proeminente em aproximadamente 288,6 eV, o qual indica a ocorrência de maior oxidação devido a formação de grupos carboxílicos e carbonílicos, ou seja, grupos do tipo O-C=O e C=O.

As figuras 17 d-f apresentam quatro picos dos espectros de XPS deconvoluídos da região O 1s, para a FFC prístina, FFC-T1 e FFC-T2, respectivamente. Os picos também foram enumerados correspondendo a: I água e oxigênio adsorvidos (534,6 - 535,1 eV), II grupos carboxílicos ou ésteres (533,4 - 534,1 eV), III grupos fenólicos, álcoois ou éteres (532,3 - 532,8 eV), IV grupos carbonilas ou quinonas (531,0 - 531,4 eV), e V grupos nitro (530,0 - 531,0 eV). De maneira similar, evidencia-se que a oxidação aumentou para as fibras tratadas. Além disso, para a FFC-T2 surge o pico V na região O 1s mostram a funcionalização da fibra com grupos nitros e a possível intercalação de nitratos entre os planos da estrutura gráfica.

A deconvolução dos espectros de XPS confirma a variação do grau de oxidação das fibras pela identificação dos diferentes grupos funcionais oxigenados. O estado de oxidação segue a seguinte ordem: $\text{O-C=O} > \text{C=O} > \text{C-O} > \text{C-C} = \text{C=C}$. Os espectros de XPS deconvoluídos da região C 1s (figura 17 a-c) mostram que ocorre o aumento da intensidade na região de maior energia de ligação para as fibras submetidas aos tratamentos oxidativos. As regiões de maior energia de ligação se situam grupos funcionais com maior estado de oxidação, tais como grupos carboxílicos e ésteres (288,2 -289 eV), portanto mostrando que ocorre alterações na natureza superficial das fibras. Para os espectros deconvoluídos da região O 1s (figura 17 d-f) evidencia-se que as fibras tratadas tiveram a superfície oxidada. Pode-se concluir que os tratamentos promoveram o aumento na formação de grupos funcionais com maior grau de oxidação, tais como carbonilas e carboxilas.

Uma característica interessante pode ser observada no espectro O 1s, que é a porcentagem relativa a área do pico C=O (pico IV), sendo os valores encontrados de 13,50 % para a FFC prístina, 28,55 % para a FFC-T1 e 21,20%. Isto é um indicativo que a FFC-T1 teve um grau de oxidação intermediário e o tratamento levou a formação de grupos funcionais do tipo quinona e cetonas, sendo as quinonas um importante grupo funcional na para eletrocatalise de oxidação da dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (NADH)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Um estudo reporta a oxidação de nanotubos de carbono utilizando três meios oxidantes distintos¹⁰⁸: ácido nítrico (2,6 M), uma mistura de ácido sulfúrico (98%) e ácido nítrico (16 mol L⁻¹) 3:1, e permanganato de potássio. A formação de quinonas foi evidenciada quando se utilizou permanganato como oxidante, enquanto que para os outros dois meios evidenciou pouca formação deste grupo funcional, mesmo em tempos curtos de reação. Isto ocorre, pois, o permanganato reage com o carbono grafítico formando orto-hidroxilas.

Através da comparação dos picos VI da região C 1s, que é referente a carbono com hibridização sp², nota-se o aumento na largura a meia altura (do inglês, *full width at half maximum*, FWHM) quando se oxida a superfície das FFC. O valor de FMHM para a FFC prístina é de 1,38 eV, para a FFC-T1 é 1,46 eV e para a FFC-T2 é de 1,51 eV. Este aumento sugere que ocorreu o desordenamento do retículo grafítico, o qual deve a oxidação da superfície que aumenta o número de defeitos na estrutura, e no caso FFC-T2 a intercalação de íons na estrutura.¹⁰⁹

A funcionalização da superfície altera as propriedades do material, a presença de grupos oxigenados aumenta a hidrofiliabilidade, assim aumentando a sua molhabilidade que pode auxiliar na imobilização enzimática e nos processos de transporte de massa próximo ao eletrodo. A criação de defeitos na estrutura pode auxiliar nos processos de transferência de carga de

algumas espécies redox e também na aproximação de cofatores enzimáticos na superfície eletródica. Esses fatores serão discutidos com mais ênfase no tópico de caracterização eletroquímica.

Figura 17 - Espectros de XPS (a) e (d) fibra prístina; (b) e (e) FFC-T1; (c) e (f) FFC-T2. Os espectros (a), (b) e (c) correspondem a deconvolução da região C 1s: ■ carbono sp^2 ; ● carbono sp^3 ; ▲ C-OH; ▼ C=O; ▽ O-C=O; ▲ CO, CO₂ adsorvidos e plásmon $\pi-\pi^*$. Os espectros (d), (e) e (f) correspondem a deconvolução da região O 1s: ■ C=O; ● C-OH; ▼ O-C=O; ▲ O₂ e H₂O adsorvidos; ▲ C-NO₂. Para ambos: ○ espectro total; ◆ background.

Fonte: autoria própria

Portanto, para verificar se houve alteração na microestrutura das FFC após o tratamento foi realizada análise pela técnica de difração de raios-X (DRX), a qual permite determinação do espaçamento entre os planos grafíticos e o tamanho dos cristalitos. Uma estrutura de grafite monocristalino pertence ao grupo simetria D_4^{6h} , sendo sua cela unitária composta por quatro átomos, na qual a distância entre dois destes átomos é de 1,42 Å e o espaçamento entre as camadas é de 3,345 Å (figura 18a). Na figura 18b estão apresentados três difratogramas referentes à FFC prístina e FFC tratadas, nos quais se pode observar a presença dos picos em aproximadamente 25° e 43° referentes aos planos cristalinos (002) e, (101) e (001) sobrepostos, respectivamente, os quais característicos de uma estrutura grafítica.

A difração depende da estrutura do material e do comprimento de onda utilizado. Quando se utiliza comprimento de onda da mesma ordem ou menor que a constante da rede cristalina, podem surgir feixes difratados em diferentes direções. Os feixes difratados observados nas direções em que as reflexões dos planos paralelos interferem construtivamente. A distância entre um conjunto de planos paralelos pode ser considerada como d , e a diferença de percurso entre os raios refletidos por planos vizinhos é considerada $2d \sin \theta$, onde θ é o ângulo de incidência. Desta forma, os raios refletidos pelos planos distintos interferem construtivamente quando a diferença de percurso é igual a um número inteiro n de comprimento de onda λ , ou seja:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad (9)$$

Esta é a lei de Bragg (equação 9), onde n é um número inteiro, λ é comprimento de onda da fonte de raios-X, d distância entre planos e θ é o ângulo de incidência, esta lei só é válida apenas para comprimentos de onda $\lambda \leq 2d$. Logo, a média do espaçamento entre as camadas grafíticas das FFC podem ser obtidas utilizando a lei de Bragg (equação 9).¹¹⁰

Utilizando-se da equação de Bragg, obtiveram-se os valores de distâncias interplanares de 3,514 Å para a FFC prístina e Å para a FFC-T1, já para a FFC-T2 foi obtido o valor de 3,569 Å. O processo de fabricação das FFC leva a formação de planos grafênicos de forma desordenada, portanto sua microestrutura se enquadra na de materiais amorfos, a qual também é considerada uma estrutura turbostrática. O tratamento da FFC com H_2SO_4/HNO_3 promoveu o deslocamento do pico do plano 002 para 24,925°, como apresentado na figura 18c, isto indica que houve o aumento entre a distância média dos planos grafíticos.

O tamanho do cristalito pode ser obtido utilizando a equação de Scherrer (equação 11), a qual só pode ser aplicada para tamanho médios de cristais menores que 1000 Å (100nm).^{111,112}

Esta equação pode ser obtida pela derivação da equação de Bragg. Mantendo o comprimento de onda constante (λ) e alargando um pico estreito de difração de um cristal de tridimensional com ordenamento perfeito, assim, para um único cristal, a difração de um conjunto de planos terá a distância d^* precisamente em θ^* , logo $\lambda = 2 d^* \sin \theta^*$. Para muitos cristais de ordem nanométrica a difração possui um desvio de $\pm\Delta\theta$ em relação a θ^* . Isto significa que no eixo 2θ (eixo das abscissas) o desvio corresponde a $2\Delta\theta$. O valor de $\Delta\theta$ corresponde à FWHM (β), o qual é aproximadamente a metade de $2\Delta\theta$. Uma vez que os valores de $\Delta\theta$ podem ser positivos ou negativos, o valor absoluto deve ser tomado como a metade da largura do desvio do pico em 2θ , que é β . Logo, a variação de d e θ na equação de Bragg, com λ constante fica,

$$\lambda = 2 \Delta d \cos \theta \Delta \theta \quad (10)$$

A espessura ou diâmetro médio dos cristalitos é Δd ou $D_{h,k,l}$, portanto, a equação fica:

$$D_{h,k,l} = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (11)$$

Onde, $D_{h,k,l}$ é o diâmetro médio dos cristalitos, λ é comprimento de onda da fonte de raios-X, β é a largura na metade da altura do pico de difração θ é o ângulo de difração e, K é uma constante que depende da forma das partículas. O valor de K atribuído para partículas esféricas é de 0,94, este valor foi utilizado para o cálculo do tamanho dos cristalitos. Os tamanhos médios dos cristalitos foram de 20,11 Å para a FFC prístina, 20,54 Å para a FFC-T1 e 13,75 Å para a FFC-T2. Os valores calculados para o tamanho do cristalito das FFC corroboram com outros resultados de DRX já reportados em outros trabalhos, nos quais os valores variam de 17,50 a 30,00 Å, (1,75 a 3,00 nm).^{110,113}

Vale ressaltar que o valor $D_{h,k,l}$ é além de nos dar informação sobre o tamanho dos cristalito, também está relacionado com a microdeformação da estrutura. O aumento da distância interplanar na FFC-T2 pode ter sido ocasionado pela intercalação de íons nitratos entre os planos, que ocasiona a microdeformação dos cristalitos, a qual está relacionado com o menor valor de $D_{h,k,l}$ para a FFC-T2. Para comprovar a presença destes íons, a região N 1s do espectro de XPS foi deconvoluída, a qual é apresentada na figura 18d. Neste gráfico os picos representados são: I nitrato intercalado (407,5 eV), II grupos nitro -NO₂ (405,7 eV), III nitrogênio com hibridização sp^2 , e IV nitrogênio com hibridização sp^3 . Nesta região do espectro, podemos observar que também houve a intercalação de íons nitratos (pico I) e a nitração da FFC (pico II).

Figura 18 - (a) Estrutura gráfitica; (b) Difratogramas das FFC: em azul FFC prístina, em vermelho FFC-T1 e em preto FFC-T2, região ampliada em 43°; (c) difratogramas com intensidade normalizada ampliados na região de 25° (b) Espectro de XPS da região N 1s deconvolúido da FFC-T2: ■ nitrato intercalado; ● -NO₂; ▼ nitrogênio sp²; ▲ nitrogênio sp³; ○ espectro total; ◆ background.

Fonte: autoria própria.

Uma outra caracterização utilizada foi a medição da região da banda de valência por XPS. Pela análise desta região dos espectros é possível obter informações importantes sobre o a densidade de estados (DOS) e também sobre o nível de Fermi dos materiais. As figuras 19a, b e c mostram a região da banda de valência para as FFC prístina, FFC-T1 e FFC-T2, respectivamente. Estes espectros apresentam características intensas de C 2s na região próxima de 18 eV, e também da superposição dos orbitais C 2p-σ e C 2p-π. Abaixo desta região a intensidade é proveniente dos orbitais O 2p, no qual se observa o aumento da intensidade, em aproximadamente 7 eV.

O ponto em que se inicia a ejeção de elétrons pela amostra corresponde ao nível de Fermi. Comparando esta região para as FFC, observa-se que ocorreu a diminuição do valor de energia de ligação quando as FFC foram oxidadas, sendo os valores de 4,8 eV para a FFC

prístina, 4,2 eV para FFC-T1 e 3,7 eV para FFC-T2. Isto é, quando se aumenta a desordem na estrutura das FFC ocorre o aumento da DOS próxima ao nível de Fermi, assim gerando esta aparente diminuição. A figura 19d apresenta três esquemas para a estrutura de bandas para um cristal de grafite, sendo I para uma estrutura sem defeitos, na qual a região hachurada representa os estados ocupados, σ^+ e π^+ indica a região da banda de valência dos orbitais ligantes, σ^- e π^- é referente a banda de condução; o esquema II é região ampliada onde ocorre a sobreposição dos orbitais; e o esquema III representa uma estrutura gráfitica desordenada, com estados localizados associados a desordem.

Figura 19 - Espectro de XPS na região da banda de valência: a) FFC prístina, (b) FFC-T1 e c) FFC-T2. d) Estrutura de bandas para um cristal de grafite, as regiões hachuradas representam os estados ocupados, I) σ^+ e π^+ indica a região da banda de valência dos orbitais ligantes, σ^- e π^- é referente a banda de condução; II) estrutura de bandas para uma estrutura de grafite desordenada e III) é a região de sobreposição das bandas,^{114,115}

Fonte: Fig. a), b) e c) autoria própria. Fig. d) adaptação de Souza, J. C. P. 2017 a partir de CLINE, K. K., 1994, p. 5317.

Pela as caracterizações da estrutura, morfologia e de composição podemos observar, que pelos tratamentos oxidativos, as FFC apresentaram grandes alterações nestes parâmetros.

Estas alterações podem influenciar nos processos de transferência de carga, uma vez que os processos eletroquímicos e eletrocatalíticos são muito influenciados pela estrutura do material eletródico. Na próxima seção será discutido como estes fatores afetam os processos de transferência de carga e acúmulo de carga na interface, pelo estudo eletroquímico utilizando sondas redox.

5.2 ELETROQUÍMICA DAS SONDAS REDOX HEXACIANO FERRATO E HEXAMINRUTÊNIO

Materiais de carbono têm a superfície química, significativamente mais complexa que dos metais, não somente devido às estruturas dos diferentes alótropos, mas também às ligações das superfícies e pela presença de grupos funcionais. A caracterização espectroscópica e microscópica mostrou que houve alteração na morfologia e composição da superfície das FFC, então estas foram alvo de estudo baseado em técnicas eletroquímicas, uma vez que a eletroquímica é baseada fundamentalmente em fenômenos interfaciais. Nesta parte do trabalho será discutida como estes fatores influenciam nos processos interfaciais eletroquímicos.

A natureza da superfície desempenha um papel essencial, uma vez que a mesma altera as propriedades da interface eletrodo-solução, na qual ocorrem as reações eletroquímicas. Portanto, para avaliar se as propriedades eletroquímicas foram alteradas realizou-se o estudo eletroquímico utilizando as sondas $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (figura 20a) e $[Ru(NH_3)]Cl_3$ (figura 20b). A figura 20 apresenta voltamogramas cíclicos para as FFC, a fibra prístina (linha azul), a FFC-T1 (linha vermelha) e a FFC-T2 (linha preta).

A sonda redox cloreto de hexamin-rutênio $[Ru(NH_3)]Cl_3$ é utilizada em estudos eletroquímicos pelo fato do íon complexo possuir carga positiva e os processos de oxido-redução ocorrerem em potenciais negativos, diferentemente do $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. A diferença das cargas dos complexos pode exercer interações distintas na interface eletrodo-solução, uma vez que os íons de diferentes naturezas se organizam de forma distintas na interface. Segundo McCreery et al.,²⁸⁻³¹ a reatividade dos planos basais é diferente em relação aos planos de borda para as diferentes sondas redox são diferentes, apresentando a cinética de transferência de elétrons distinta. Os autores sugerem que os planos de borda são mais sensíveis em relação aos planos basais quando se utiliza o par de sonda redox $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$. Já o par sonda redox $Ru(NH_3)_6^{2+}/[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ transfere elétrons com a mesma velocidade para os dois tipos de planos. A diferença na reatividade, quando se compara planos basais com planos de borda, está relacionado com densidade de estados (do inglês, *density of states*, DOS), quando

a superfície possui poucos defeitos e altamente ordenada, o material de carbono possui baixa DOS. Um outro estudo utilizando a técnica de microscopia eletroquímica de varredura (SECM) avalia a constante heterogênea de transferência de elétrons para o grafeno em função do aumento de defeitos na estrutura por ablação com plasma.¹¹⁶ Os autores afirmam que pelo balanço de defeitos induzidos, aumenta-se a densidade de estados e diminui-se a condutividade, logo a condição ótima para transferência heterogênea de elétrons pode ser atingida com a modulação da densidade de defeitos. Além disso, eles realizaram simulações *ab initio* para mostrar que com o aumento defeitos na estrutura aumenta-se a DOS de uma estrutura grafênica.

A reversibilidade de uma reação eletroquímica está associada a velocidade troca de elétrons, quanto mais rápido for esta troca mais reversível é a reação.³² O parâmetro utilizado para se medir a reversibilidade é a distância entre os picos de oxidação e redução (ΔE). Os valores de ΔE , para os voltamogramas da figura 20a, foram de 0,448 V para a FFC prístina, 0,062 V para FFC-T1 e 0,083 V para FFC-T2. As FFC submetidas aos tratamentos oxidativos apresentaram maior reversibilidade para a reação eletroquímica do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, o que sugere a ocorrência da formação de defeitos na superfície das FFC tratadas, assim, aumentando a exposição de planos de borda na superfície eletródica. Este resultado corrobora com os dados obtidos pela sondagem por XPS na banda de valência, o qual mostra-nos o aumento da DOS próxima ao nível de Fermi, logo o aumento de defeitos na estrutura faz com que o processo de transferência de carga para esta sonda seja mais rápido, portanto apresentando maior reversibilidade.

Os valores de ΔE , para os voltamogramas da figura 20b, foram de 0,091 V para a FFC prístina, 0,051 V para FFC-T1 e 0,162 V para FFC-T2. Neste caso, foi utilizado a sonda $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, a qual é insensível aos tipos de plano, portanto os valores de ΔE ficaram próximos, nos quais podemos observar alta reversibilidade para todos os eletrodos. Observa-se também que os voltamogramas cíclicos correspondentes aos eletrodos de FFC-T2 apresentam alta corrente capacitiva. Eletrodos que geram este tipo de perfil voltamétrico possuem alta área superficial. Isto ocorre devido à formação das estruturas vesiculares e ao aumento entre o espaçamento dos planos cristalinos, este tipo de perfil voltamétrico é característico de capacitores eletroquímicos.¹¹⁷ Como a FFC-T2 comporta-se como um supercapacitor, utilizou-se a equação 6 para a obtenção do valor da capacitância utilizando a equação 12:

$$C = \frac{j}{dE/dt} \quad (12)$$

Onde, C é a capacitância, j é a densidade de corrente e dE/dt é a velocidade de varredura. Assim, em 0,0 V, atinge-se densidade de corrente no valor de $2,0 \text{ mA cm}^{-2}$, que corresponde a 400 mF cm^{-2} ($40,0 \text{ F g}^{-1}$).

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos em solução. (a) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ $0,005 \text{ mol L}^{-1}$. FFC-próstina (linha azul), FFC-T1 (linha vermelha) e FFC-T2 (linha preta). Ambos em eletrólito suporte KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, atmosfera de N_2 , velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

Fonte: autoria própria.

Na figura 20b, outra característica é a alta queda ôhmica apresentada pela FFC-T2, que se deve a processos resistivos. Esta alta resistividade pode estar associada ao grande número de defeitos gerados na estrutura, fazendo com que a mesma tenha perda de condutividade elétrica.¹¹⁶ Logo, a FFC que possui o melhor balanço na geração de defeitos induzidos pelo

tratamento oxidativo é a FFC-T1, a qual apresenta melhora no processo de transferência de carga sem perder a condutividade.

A outra técnica eletroquímica capaz de trazer informações a respeito da transferência eletrônica e do acúmulo de carga na interface é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A interpretação dos resultados de EIE é facilitada quando se elucida a interface eletrodo/solução através de um equivalente elétrico, o qual é representado por circuitos elétricos, contendo componentes como resistores, capacitores e indutores. Estes modelos ajudam na interpretação do diagrama de Nyquist, que é o um dos resultados mais usuais quando se trata de EIE. O modelo mais utilizado para a elucidação dos fenômenos interfaciais é o circuito equivalente de Randles (figura 21a), o qual auxilia na interpretação de um espectro de impedância eletroquímica, como o diagrama de Nyquist típico.

Figura 21 - (a) Circuito equivalente de Randles; (b) Diagramas de Nyquist das FFC; (c) região de altas frequências ampliada. (■) Fibra pristina (▲) FFC-T1 (●) FFC-T2. (d) Capacitância *versus* o logaritmo da frequência obtido por impedância. Solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 0,005 mol L⁻¹, eletrólito suporte KCl 0,5 mol L⁻¹, atmosfera de N₂.

Fonte: autoria própria.

No circuito equivalente de Randles, consisti na combinação de um resistor R_{tc} e um capacitor C_{dl} , em paralelo. O R_{tc} representa a relação entre corrente e potencial associada com o processo de transferência de carga, a C_{dl} representa a capacitância associada com a dupla camada elétrica, sendo ambas, parâmetros dependentes do potencial. Além disso, o circuito de Randles engloba também um parâmetro chamado de impedância de Warburg (R_w), a qual é uma resistência complexa referente ao processo de difusão linear semi-infinita que se comporta como se fosse um arranjo seriado de um resistor com um capacitor. Em um diagrama Nyquist típico, o diâmetro do semicírculo é a resistência à transferência de carga R_{tc} que é equivalente à resistência ôhmica do eletrólito entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (R_Ω). Assim, quanto maior o diâmetro deste semicírculo, maior a resistência R_{tc} , consequentemente, mais difícil é o processo de transferência de carga.

As figuras 21b e c mostram resultados de EIE obtidos para os eletrodos baseados em FFC. A solução utilizada na EIE era composta de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] 0,005 \text{ mol L}^{-1}$, assim foi possível analisar processos de relacionados a capacitância/resistência e também sobre processos de transferência de carga. As figuras 21b e c apresentam diferentes perfis no diagrama de Nyquist para os eletrodos. Pode-se confirmar que a FFC prístina possui maior resistência à transferência de carga quando comparada as fibras oxidadas, ou seja, os eletrodos baseados em FFC tratadas trocam carga mais facilmente com o meio eletrolítico, assim corroborando com os resultados de voltametria cíclica.

Além disso, este estudo confirmou que a FFC-T2 comporta como um supercapacitor, pois em altas frequências (início do diagrama), supercapacitores se comportam como resistências, portanto apresentam uma inclinação menor. Em altas frequências o eixo imaginário da impedância aumenta bruscamente e o gráfico tende a ficar vertical, indicando comportamento capacitivo. Usando os resultados da EIE é possível calcular os valores de capacitância aplicando a equação 13:

$$C = \frac{1}{2\pi f Z''} \quad (13)$$

Onde, Z'' é o componente imaginário da impedância e f é a frequência aplicada. Os valores de capacitância em função do logaritmo da frequência estão apresentados na figura 21d, os quais corroboram com os valores obtidos por voltametria cíclica. O valor de capacitância

calculado para baixas frequências é próximo de 40 F g^{-1} , este valor corrobora com o valor encontrado para a voltametria cíclica.

5.3 ELETROXIDAÇÃO DO NADH

Pelo fato da ADH ser uma enzima NAD-dependente é necessário que o eletrodo atue na regeneração da coenzima pela a oxidação da mesma. Então, foi avaliada a eletro-oxidação de NADH usando eletrodos baseados em FFC prístina, FFC-T1 e FFC-T2. A figura 22 apresenta voltamogramas cíclicos no qual foi avaliada os processos eletroquímicos do NADH em soluções-tampão fosfato em diferentes valores de pH utilizando como eletrodo de trabalho as FFC prístina e tratadas.

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos em solução de NADH $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH, velocidade de varredura 5 mV s^{-1} , atmosfera de N_2 . (a) e (b) FFC prístina, (c) FFC-T1 e (d) FFC-T2.

Fonte: autoria própria.

A figura 22 mostra que o processo de oxidação do NADH na janela de potencial de -0,2 a 0,8 V ocorre para os eletrodos de FFC prístina e FFC-T1, porém os potenciais em que se evidencia o início da oxidação são diferentes, sendo em 0,7 e 0,2 V, respectivamente. O fato para oxidação do NADH se iniciar em um potencial de menor valor pode estar associado à funcionalização da superfície por grupos funcionais do tipo quinona. Alguns autores já mostraram que as orto-quinonas atuam como mediadores eficientes na eletro-oxidação do NADH¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, isto é, a quinona participa da reação de eletro-oxidação do como mostrado na reação apresentada na figura 23. Na figura 22b observa-se que aumento do pH favorece a eletrocatalise de oxidação do NADH pois o H⁺ liberado reage com os íons hidroxilas presentes no meio formando H₂O.

Figura 23 – Reação redox proposta do NADH mediada pela orto-quinona.

Fonte: de Souza, J. C. P. (2016) a partir de CARLSON, B. W., 1985, p. 479.

Visto que a FFC-T1 melhora o processo de oxidação do NADH e que a enzima ADH é NAD-dependente, o eletrodo selecionado para a imobilização enzimática e estudos de bioeletrocatalise foi a FFC-T1. Então, os estudos de bioeletrocatalise foram realizados com a utilização da FFC-T1 como matriz eletródica para a imobilização da ADH. Os resultados referentes a bioeletrocatalise estão apresentados na próxima seção.

5.4 BIOELETROCATÁLISE DE OXIDAÇÃO DO ETANOL PELA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE.

Como foi verificado que o eletrodo baseado na FFC-T1 eletro-oxida o NADH em baixo potencial e, pelo fato da enzima ADH, na presença da coenzima oxidada produzir NADH com o aumento da concentração de etanol ao meio reacional, esta enzima foi imobilizada no eletrodo na superfície da FFC-T1 e experimentos de bioeletrocatalise foram conduzidos. Então, o bioeletrodo tem como base eletródica para a imobilização enzimática a FFC-T1, com a imobilização da ADH, este bioeletrodo passa a ser chamado de FFC-T1-ADH. A figura 24a

mostra voltamogramas cíclicos da FFC-T1-ADH em diferentes concentrações de etanol, na qual é observada o aumento na corrente de oxidação concomitante as adições de etanol, onde o começo da oxidação ocorre em 0,25 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}). A figura 24b apresenta voltamogramas cíclicos da FFC-T1-ADH em diferentes velocidades de varredura, na qual observa-se que houve o aumento da densidade de corrente na região associada a oxidação de etanol que se inicia em 0,25 V (*vs.* Ag/AgCl_{sat}). Também é observado o aumento da corrente em potenciais negativos que é relativo aos processos oxidação de grupos funcionais na superfície da FFC-T1-ADH.

Figura 24 - a) Voltamogramas cíclicos da FFC-T1-ADH com adições sucessivas de etanol absoluto até a concentração final de 796,6 mmol L⁻¹, velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. b) Voltamogramas cíclicos da FFC-T1-ADH com variação da velocidade de varredura na concentração de 796,6 mmol L⁻¹ de etanol. c) Dependência da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura obtida para FFC-T1-ADH na concentração de etanol de 796,6 mmol L⁻¹ E = 0,6 V d) Dependência da corrente de pico em função velocidade de varredura obtida para FFC-T1-ADH na concentração de etanol de 796,6 mmol L⁻¹ E = 0,0 V. O eletrólito suporte foi solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH= 7,5, a 25 °C para todos experimentos.

Fonte: Fig. a) Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de DE SOUZA, J. C. P., 2017, p. 8401. Fig. b), c) e d) autoria própria.

Informações adicionais sobre o processo de bioeletroxidação do etanol pela FFC-T1-ADH foram obtidas por meio da avaliação da intensidade de corrente de pico anódica, em função da velocidade de varredura. Assim, um gráfico de corrente de pico *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura foi obtido para a bioeletroxidação de etanol em 0,6 V (figura 26c), sendo observada uma relação linear. Portanto, trata-se de um processo controlado por difusão do NADH, ou seja, o transporte de massa é um fator limitante da reação.

Na figura 24b observa-se também o aumento da corrente em regiões de potencial negativo que é associado a grupos redox quinona/hidroquinona.¹¹⁸ Para comprovar que são grupos funcionais presentes na superfície avaliação da intensidade de corrente de pico anódica em -0,05 V, em função da velocidade de varredura. A figura 24d apresenta o gráfico de corrente de pico, em 0,05 V, *versus* a velocidade de varredura, no qual observa-se uma relação linear, portanto trata-se de um processo limitado pelo transporte de carga.

Para os gráficos 24c e d, a corrente capacitiva não foi subtraída, a qual também aumenta com a velocidade de varredura, sendo proporcionalmente constante. Por isso, conseguimos distinguir o processo de oxidação das quinonas da organização dos íons na interface, pois como o primeiro é limitado por transferência de carga, este processo será mais proeminente com o aumento da velocidade de varredura. Já o processo de oxidação do NADH trata-se de um processo eletrocatalítico, portanto a corrente deste processo pode considerada como totalmente faradaica.

A reação enzimática de oxidação do etanol, pela ADH, leva a formação de acetaldeído, e concomitantemente ocorre a redução de NAD^+ para NADH. Como o produto da oxidação é um composto orgânico e volátil, esta reação bioeletrocatalítica pode ser determinada por espectrometria de massas eletroquímica diferencial (DEMS), tornando-se possível a elucidação de mecanismos e de equações de cinética enzimática. A configuração utilizada no experimento de DEMS é composta por uma meia-célula eletroquímica acoplada a um espectrômetro de massas, a qual está representada na figura 25. A junção destes sistemas se dá por uma membrana porosa de Teflon[®] (tamanho dos poros igual a 0,2 μm) que separa o eletrólito do vácuo, mas é permeável para gases e compostos voláteis, assim possibilitando a análise *in situ* por espectrometria de massas. O alto vácuo é gerado por bombas turbomoleculares em uma pré-câmara, a qual está conectada ao quadrupolo do espectrômetro de massas.

Neste experimento, a FFC-T1 foi fixada sobre a membrana de Teflon[®] após o processo de imobilização da ADH, o qual foi realizado pela adsorção de 200 μL de solução de ADH

16 mg mL⁻¹ e mantida na geladeira por 5 horas, e posteriormente levado a dessecador com 20 µL de solução de Nafion® 5% para a imobilização enzimática. Para o contato elétrico entre o potenciostato/galvanostato (PGSTAT 128 N) e o eletrodo de trabalho utilizou-se um fio de ouro. Os experimentos de bioeletrocatalise foram conduzidos em condições de argônio saturado e em solução-tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH= 7,5 na presença de 282,92 µmol L⁻¹ de NAD⁺.

Figura 25 - (a) Cronoamperogramas da FFC-T1-ADH com adições sucessivas de etanol absoluto até a concentração final de 796,6 mmol L⁻¹. O eletrólito suporte foi tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH= 7,5, voltagem aplicada 0,6 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) a 25 °C. (b) Monitoramento da intensidade dos picos de massa em $m/z = 29$ e 22, sob aplicação potencial 0,6 V e em 0,0 V (vs. Ag/AgCl_{sat}). Concentração de etanol: 0.0 mol L⁻¹ ou $m/z = 22$ para os dados de espectroscopia de massas (preto), 0,086 mol L⁻¹ (vermelho), 0,171 mol L⁻¹ (verde), 0,257 mol L⁻¹ (roxo), 0,428 mol L⁻¹ (vermelho escuro), 0,642 mol L⁻¹ (cinza), 0,860 mol L⁻¹ (azul).

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de DE SOUZA, J. C. P., 2017, p. 8401.

Três produtos podem ser formados na oxidação do etanol: acetaldeído, ácido acético e gás carbônico. Com a finalidade de avaliar a formação dos produtos foram registrados os picos de corrente iônica em nas regiões da razão massa/carga (m/z) de 22 e 29, as quais correspondem ao íon CO_2^{++} e ao fragmento COH^+ (principal fragmento do acetaldeído), respectivamente. O ácido acético não pode ser analisado quantitativamente por DEMS por possuir baixa pressão de vapor. Na figura 25b pode ser observado que corrente iônica de $m/z = 29$ aumenta simultaneamente com a polarização do eletrodo em 0,6 V (vs. Ag/AgCl_{sat}), assim podendo ser evidenciado a formação de acetaldeído. Entretanto, para a corrente iônica de $m/z = 22$ que foi monitorada para todas as adições de etanol permaneceu sem sinal. Portanto, isto comprova que a oxidação do etanol pela ADH leva somente a formação de acetaldeído. Além disso,

evidenciou-se que a corrente iônica em $m/z = 29$ aumenta com as adições de etanol (figura 25b), e o mesmo é observado para as correntes faradaica (figura 25a).

Durante a polarização do eletrodo em 0,6 V (vs. Ag/AgCl_{sat}), a atividade bioeletrocatalítica foi mantida, convertendo etanol em acetaldeído. Sob a aplicação de 0.0 (vs. Ag/AgCl_{sat}), a corrente decresce para 0.0 pA. Este fato é muito interessante, pois foi a primeira vez que medindo fragmentos de massas de acetaldeído com a regeneração eletroquímica do NAD⁺ pela oxidação do NADH demonstrou que trata de uma condição primordial para a biocatálise ocorrer.

Com base nos resultados de transiente de corrente no estado estacionário (figura 25a) e de monitoramento de fragmentos de massas em m/z 29 (figura 25b), foram plotados gráficos de duplo-recíproco para as correntes faradaicas e iônicas, que estão apresentados nas figuras 26a e 26b, respectivamente. Estes gráficos estão relacionados com a ligação de NAD⁺/NADH e a cinética do etanol/acetaldeído, uma vez que a corrente faradaica é associada a oxidação de NADH e a corrente iônica é gerada pela a ionização do acetaldeído.

Figura 26 - a) Gráfico do duplo-recíproco usando a corrente faradaica dos cronoamperogramas da figura 25a e b) gráfico do duplo-recíproco usando a corrente iônica durante a polarização em 0,6 V vs. Ag/AgCl_{sat} extraídos do gráfico apresentado na figura 25b. A linha vermelha pontilhada representa a extrapolação dos dados do duplo-recíproco.

Fonte: Adaptação de Souza, J. C. P. (2017) a partir de DE SOUZA, J. C. P., 2017, p. 8401.

Considerando que ambos os sítios de ligação seguem o modelo de Michaelis-Menten, é possível considerar o coeficiente angular destes gráficos como $K_m/V_{\text{máx}}$, com base na equação

5, em que K_m é a constante de Michaelis e $V_{m\acute{a}x}$ é taxa reacional máxima. Os valores de coeficiente angular para as figuras 28a e 28b são $5,84 \times 10^3$ e $4,17 \times 10^{11}$, respectivamente. Estes valores indicam que o acetaldeído se dissocia da estrutura enzimática cerca de 10^7 vezes mais rápido que o NADH. Interessantemente, estes resultados confirmam que a etapa limitante é a dissociação do NADH do complexo e, assim os mecanismos Bi Bi sequencial ordenado é favorecido.

5.5 BIOELETROXIDAÇÃO DO ETANOL: EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA

Estudos por DEMS variando o pH e a temperatura também foram realizados. Nestes experimentos, utilizou-se o segundo procedimento de imobilização que consistiu no gotejamento de 200 μL de solução de ADH 8 mg mL^{-1} na superfície da FFC-T1 que foi mantida a 4 °C (na geladeira) por 3 horas, posteriormente levado a dessecador por 2 horas. Depois gotejou-se, sob o eletrodo, 20 μL de Náfon 2,5 % em solução-tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,5 e mantido no dessecador por 1 hora, para o aprisionamento da enzima na superfície eletródica. Este processo, foi escolhido devido a maior reprodutibilidade que o primeiro, pois o gotejamento direto de Náfon 5 % pode desnaturar a enzima, uma vez que possui alta acidez.

Na figura 27a observa-se que, com aumento do pH, ocorre o aumento da corrente faradaica. O mesmo é observado na figura 29b, ou seja, quanto maior o pH maior é a corrente iônica, quando se polariza o eletrodo em 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$). Já é bem estabelecido que o NADH é instável em soluções ácidas que leva a sua hidrólise^{119,120}, assim, gerando um produto inativo enzimaticamente. Além disso, as reações catalisadas por enzimas desidrogenases NADP ou NAD-dependentes são dependentes do pH, sendo que o pH ótimo para estas enzimas é acima de 7,0.⁶⁷

Alguns estudos foram realizados para a ADH proveniente de levedura *Saccharomyces cerevisiae* sob a influência da variação do pH¹²³⁻¹²⁵, mostrou-se que o aumento de pH influencia no processo de transferência de hidreto. Isto é relacionado com as histidinas^{50,122,123} presentes no sítio ativo, as quais estão envolvidas na formação do complexo ternário ao invés da ligação da coenzima. Quando se substitui a histidina H48Q a eficiência catalítica de oxidação do etanol diminui e a dependência do pH é alterada.^{50,124}

Figura 27 - a) Cronoamperogramas da FFC-T1-ADH com variação do pH em solução-tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C contendo $0,860 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol, sob sobrepotencial de $0,6 \text{ V}$ vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$. (b) Monitoramento da intensidade do pico de massa em $m/z = 29$, sob aplicação potencial $0,6 \text{ V}$ e em $0,0 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$) com variação do pH em solução-tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 25°C contendo $0,860 \text{ mol L}^{-1}$ de etanol.

Fonte: autoria própria

As figuras 28a e 28b mostram variação da corrente nos cronoamperogramas faradaico e iônico, respectivamente, com a variação da temperatura. Estes experimentos foram conduzidos para o último valor de pH do mesmo sistema descrito anteriormente. Nota-se que com a elevação da temperatura ocorre o aumento das correntes em ambos os gráficos. Mesmo em altas temperaturas a enzima parece não se desnaturar. O aumento da corrente iônica talvez seja superestimado devido ao aumento da pressão de vapor com o aumento da temperatura, porém mesmo assim o aumento na produção de acetaldeído é plausível, uma vez que também ocorreu o aumento na produção de NADH.

Todas as transformações químicas passam por estado instável chamado estado de transição, que está posicionado entre as estruturas químicas dos produtos e dos reagentes. As enzimas, por sua natureza, aceleram as reações, uma vez que são catalisadores biológicos, ou seja, estas entidades químicas são capazes de abaixar a energia de ativação naturalmente e assim atingir o estado de transição mais facilmente.¹²⁵ Para que uma reação ocorra é necessário que atinja a energia de ativação, que está diretamente relacionado com a temperatura. Aumentando-se a temperatura, a proporção de moléculas que com energia superior a energia de ativação aumenta, lembrando que a temperatura é uma média da energia das partículas de um sistema.

A relação entre a energia de ativação e a temperatura é dada pela equação de Arrhenius, em que quanto maior a temperatura mais facilmente se atinge a energia de ativação.¹²⁵

Para o sistema utilizado no estudo de DEMS é válido ressaltar duas peculiaridades, a primeira é por se tratar de um processo eletroquímico, logo tem-se um processo de cinética heterogênea e a outra é fato de usarmos a enzima como catalisador que pode ser inativada pelo aquecimento. Em processo catalítico heterogêneo envolve as seguintes etapas: difusão do substrato até a superfície catalítica, adsorção, reação na superfície, dessorção dos produtos seguido pela difusão da superfície catalítica. Cada um desses estágios segue uma equação de Arrhenius, mas todo este processo é determinado por uma etapa limitante, que neste caso é a que possui maior barreira de energia de ativação. Para nosso sistema vimos que a oxidação do NADH se trata de um processo limitado por transporte de massa, logo etapa limitante deste tipo de processo é a difusão, o qual segue a lei de difusão de Fick,⁷⁶ então esta etapa é favorecida quando se aumenta a temperatura. Isto pode ser um dos fatores relacionados ao aumento da corrente faradaica com o aumento da temperatura.

Figura 28 - a) Cronoamperogramas da FFC-T1-ADH com variação da temperatura em solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH= 9,0 contendo 0,860 mol L⁻¹ de etanol, sob sobrepotencial de 0,6 V vs. Ag/AgCl_{sat}. (b) Monitoramento da intensidade do pico de massa em $m/z = 29$, sob aplicação potencial 0,6 V e em 0,0 V (vs. Ag/AgCl_{sat}) com variação da temperatura em solução-tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH= 9,0 contendo 0,860 mol L⁻¹ de etanol.

Fonte: autoria própria

Em relação ao uso de proteína, o aumento da temperatura também faz com a catálise aumente até uma determinada faixa, sendo que em temperaturas superiores 50-60 °C pode

ocorrer a inativação da enzima. No experimento utilizando DEMS, percebe-se que até a 70 °C não ocorreu a inativação da enzima, isto pode ser devido ao fato de que a enzima pode ter sua estrutura estabilizada pela presença de Nafion, fazendo com que não ocorra o colapso da estrutura proteica e, então, sua desnaturação.

6 CONCLUSÃO

As duas transformações químicas oxidativas utilizadas para as FFC, uma com $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ (FFC-T1) e a outra com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (FFC-T2), possibilitaram a modificação da superfície e da microestrutura, como apresentado nos resultados de XPS, DRX e MEV-FEG. Estas alterações, por sua vez, influenciaram diretamente nos processos eletroquímicos interfaciais, tal como a velocidade da transferência de elétrons. Para ambos os tratamentos ocorreu o aumento na cinética da transferência de elétrons, quando se utilizou a sonda redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Este fato é atribuído a maior exposição de planos de borda na superfície das FFC, a qual está, possivelmente, relacionada à formação de defeitos por reações de oxidação dos tratamentos.

A FFC-T1 além de ter o processo de transferência de carga aumentado para a sonda inorgânica $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, também apresentou propriedades que melhoraram o processo de eletroxidação do NADH, o qual é mais pronunciado em valores de pH alcalinos (8,0 – 9,0). A FFC-T2 apresentou comportamento de supercapacitor, o qual pode ser verificado pela alta corrente capacitiva nos voltamogramas cíclicos, assim como no perfil do espectro de impedância eletroquímica. Também apresentou alta resistividade quando se utilizou a sonda $\text{Ru}(\text{NH}_3)\text{Cl}_3$, logo, mostrou que este tratamento gerou muitos defeitos na estrutura grafítica, fazendo com que o eletrodo baseado na FFC-T2 apresentasse perda de condutividade. Esta mudança pode ser comprovada por DRX e XPS os quais mostraram, que possivelmente, nesta transformação houve a intercalação de íons nitrato entre as camadas grafíticas, desta forma, aumentando a distância interplanar.

Como a FFC-T1 se mostrou mais eficiente no processo de eletroxidação do NADH e que ADH se trata de uma enzima NAD-dependente, as FFC submetidas a este tratamento foram selecionadas para a fabricação do eletrodo enzimático (FFC-T1-ADH) para os estudos de bioeletrocatalise. Foram realizadas voltametrias cíclicas para o bioeletrodo FFC-T1-ADH em diferentes concentrações de etanol o qual mostrou o aumento na densidade de corrente com os incrementos de etanol. Portanto, pode-se evidenciar que a enzima manteve a atividade catalítica quando imobilizada na superfície do eletrodo, pois o aumento de corrente se deve a produção de NADH, quando ocorre pelas reações de oxidação do etanol e de redução no NAD^+ na estrutura enzimática. Além disso, variou-se a velocidade de varredura, mostrando que o

processo de oxidação do NADH é difusional e o processo atribuídos as quinonas são limitados por transferência de carga.

A técnica de DEMS se mostrou eficaz no estudo de aspectos cinéticos e mecanísticos da biooxidação do etanol utilizando a ADH. Esta técnica permitiu verificar o aumento da corrente faradaica concomitante ao aumento da corrente iônica no pico $m/z = 29$, quando foram adicionadas alíquotas de etanol e o bioeletrodo foi polarizado em 0,6 V vs. Ag/AgCl_{sat}. A corrente faradaica foi atribuída a formação de NADH e a corrente iônica a formação de acetaldeído na reação enzimática, com isto foi possível plotar gráficos de duplo-recíproco e inferir sobre os parâmetros obtidos, que a ADH segue o mecanismo do tipo Bi Bi sequencial ordenado e que as velocidades de abandono dos produtos da estrutura enzimática são diferentes. Para este mesmo, verificou-se como fatores como pH e temperatura afetam a cinética para o bioeletrodo FFC-T1-ADH. Quando se aumenta o pH aumenta-se a formação de produtos que pode estar relacionado com a influência sob as histidinas no sítio ativo. O aumento da temperatura proporcionou o aumento na formação de produtos e não foi possível observar a inativação da enzima pelo aumento da temperatura.

Em suma, a técnica de DEMS aplicada à bioeletroquímica aponta-se como uma técnica promissora para o estudo de proteínas que tenham em suas etapas reacionais algum composto volátil e que seja possível também, concomitante, analisar algum processo de transferência de carga pela mesma. Portanto, nesta tese apresentou-se pela primeira vez o uso de DEMS aplicado a avaliação da atividade enzimática da ADH.

7 REFERÊNCIAS

1. CAMPUZANO, S.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRON, J. M. Electrochemical biosensing approaches for diagnosis of viral infections and tropical diseases. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 4, p. 753–777, 2017.
2. GRATTIERI, M.; HASAN, K.; MINTEER, S. D. Bioelectrochemical systems as a multipurpose biosensing tool: present perspective and future outlook. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 4, p. 834–842, 2017.
3. SILVA, E. T.; SOUTO, D. E.; BARRAGAN, J. T.; GIAROLA, J. F.; MORAES, A. C.; KUBOTA, L. T. Electrochemical biosensors in point-of-care devices: recent advances and future trends. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 4, p. 778–794, 2017.
4. CHEN, Y.; GAI, P.; ZHANG, J.; ZHU, J. J. Design of an enzymatic biofuel cell with large power output. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 21, p. 11511–11516, 2015.
5. GELLETT, W.; KESMEZ, M.; SCHUMACHER, J.; AKERS, N.; MINTEER, S. D. Biofuel cells for portable power. **Electroanalysis**, v. 22, n. 7–8, p. 727–731, 2010.
6. DARWISH, A.; HASSANIEN, A. E. Wearable and implantable wireless sensor network solutions for healthcare monitoring. **Sensors**, vol. 11, n. 6, p. 5561–5595, 2011.
7. PISCIOTTA, J. M.; DOLCEAMORE JR, J. J. Bioelectrochemical and conventional bioremediation of environmental pollutants. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 8, n. 4, p. 327–343, 2016.
8. LÉGER, C.; BERTRAND, P. Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2379–2438, 2008.
9. KINOSHITA, K. **Carbon: electrochemical and physicochemical properties**. New York: John Wiley, 1988. 533 p.
10. FRACKOWIAK, E.; BÉGUIN, F. Carbon materials for the electrochemical storage of energy in capacitors. **Carbon**, vol. 39, n. 6, pp. 937–950, 2001.

11. EDIE, D. D. The effect of processing on the structure and properties of carbon fibers. **Carbon**, v. 36, n. 4, p. 345–362, 1998.
12. DEAN, G. D.; TURNER, P. The elastic properties of carbon fibres and their composites, **Composites**, v. 4, n. 4, p. 174–180, 1973.
13. FRANK, E.; STEUDLE, L. M.; INGILDEEV, D.; SPÖRL, J. M.; BUCHMEISER, M. R. Carbon fibers: Precursor systems, processing, structure, and properties. **Angewandte Chemie-International Edition**, vol. 53, n. 21, pp. 5262–5298, 2014.
14. JÚNIOR, C. A. R. B.; FLEMING, R. R.; PARDINI, L. C.; ALVES, N. P. Poliacrilonitrila: processos de fiação empregados na indústria. **Polímeros**, v. 23, p. 764–770, 2013.
15. FRANK, E.; HERMANUTZ, F.; BUCHMEISER, M. R. Carbon fibers: Precursors, manufacturing, and properties. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 297, n. 6, p. 493–501, 2012.
16. LIU, J.; WANG, P. H.; LI, R. Y. Continuous carbonization of polyacrylonitrile-based oxidized fibers: aspects on mechanical properties and morphological structure. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 52, n. 7, pp. 945–950, 1994.
17. SAHA, B.; SCHATZ, G. C. Carbonization in polyacrylonitrile (PAN) based carbon fibers studied by reaxff molecular dynamics simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 15, p. 4684–4692, 2012.
18. RAHAMAN, M. S. A.; ISMAIL, A. F.; MUSTAFA, A. A review of heat treatment on polyacrylonitrile fiber. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 8, p. 1421–1432, 2007.
19. PENEV, E. S.; ARTYUKHOV, V. I.; YAKOBSON, B. I. Basic structural units in carbon fibers: Atomistic models and tensile behavior. **Carbon**, v. 85, p. 72–78, 2015.
20. 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.
21. SZÁZDI, L.; GULYÁS, J.; PUKÁNSZKY, B. Surface characterization of electrochemically oxidized carbon fibers: surface properties and interfacial adhesion. **Composite Interfaces**, v. 9, n. 2, p. 219–232, 2002.

22. YUAN, L. Y.; CHEN, C. S.; SHYU, S. S.; LAI, J. Y. Plasma surface treatment on carbon fibers. Part 1: Morphology and surface analysis of plasma etched fibers. **Composites Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 1–7, 1992.
23. TRAN, M. Q.; HO, K. K. C.; KALINKA, G.; SHAFFER, M. S. P.; BISMARCK, A. Carbon fibre reinforced poly(vinylidene fluoride): Impact of matrix modification on fibre/polymer adhesion. **Composites Science and Technology**, v. 68, n. 7–8, p. 1766–1776, 2008.
24. PITTMAN, C. U.; JIANG, W.; YUE, Z. R.; GARDNER, S.; WANG, L.; TOGHIANI, H.; LEON Y LEON, C. A. Surface properties of electrochemically oxidized carbon fibers. **Carbon**, v. 37, n. 11, p. 1797–1807, 1999.
25. DONNET, J. B.; BRENDLE, M.; DHAMI, T. L.; BAHL, O. P. Plasma treatment effect on the surface energy of carbon and carbon fibers. **Carbon**, v. 24, n. 6, p. 757–770, 1986.
26. MOMMA, T.; LIU, X.; OSAKA, T.; USHIO, Y.; SAWADA, Y. Electrochemical modification of active carbon fiber electrode and its application to double-layer capacitor. **Journal of Power Sources**, v. 60, n. 2, p. 249–253, 1996.
27. TIWARI S.; BIJWE, J. Surface treatment of carbon fibers - A review. **Procedia Technology**, v. 14, p. 505–512, 2014.
28. POON, M.; MCCREERY, R. L.; ENGSTROM, R. Laser activation of carbon electrodes. Relationship between laser-induced surface effects and electron transfer activation. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 1725–1730, 1988.
29. CHEN, P.; MCCREERY, R. L. Control of electron transfer kinetics at glassy carbon electrodes by specific surface modification. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 22, p. 3958–3965, 1996.
30. CHEN, P.; FRYLING, M. A.; MCCREERY, R. L. Electron transfer kinetics at modified carbon electrode surfaces: the role of specific surface sites. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 78, p. 3115–3122, 1995.
31. MCCREERY, R. L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2646–2687, 2008.

32. BANKS, C. E.; DAVIES, T. J.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites. **Chemical Communications**, n. 7, p. 829–841, 2005.
33. WILLIAMS, C. G.; EDWARDS, M. A.; COLLEY, A. L.; MACPHERSON, J. V.; UNWIN, P. R. Scanning micropipet contact method for high-resolution imaging of electrode surface redox activity. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 7, p. 2486–2495, 2009.
34. MCCREERY R. L.; MCDERMOTT, M. T. Comment on electrochemical kinetics at ordered graphite electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 2602–2605, 2012.
35. 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.
36. ZACH, M. P.; NG, K. H.; PENNER, R. M. Molybdenum nanowires by electrodeposition. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2120–2123, 2000.
37. ALLONGUE, P.; DELAMAR, M.; DESBAT, B.; FAGEBAUME, O.; HITMI, R.; PINSON, J.; SAVÉANT, J. M. Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts. **Journal of American Chemical Society**, v. 7863, n. 8, p. 201–207, 1997.
38. MARTINS, M. V.; PEREIRA, A. R.; LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Evidence of short-range electron transfer of a redox enzyme on graphene oxide electrodes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 33, p. 17426–17436, 2014.
39. DE SOUZA, J. C. P.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Nitrated carbon nanoblister for high-performance glucose dehydrogenase bioanodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 860–865, 2016.
40. IOST, R. M.; SALES, F. C.; MARTINS, M. V.; ALMEIDA, M. C.; CRESPILO, 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.
41. 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.

42. LUZ, R. A.; PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILO, F. N. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 11, p. 1751-1777, 2014.
43. SALES, F. C. P. F.; IOST, R. M.; MARTINS, M. V.; 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. 3, 468-474, 2013.
44. CABRERA, F. C.; DE SOUZA, J. C. P.; JOB, A. E.; CRESPILO, F. N. (2014). Natural-rubber-based flexible microfluidic device. **Rsc Advances**, vol. 4, n. 67, pp. 35467-35475, 2014.
45. SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.
46. WILLNER, I.; KATZ, E. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n.7, 1180-1218, 2000.
47. BOEHM, H. P. (2002). Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. **Carbon**, v. 40, n. 2, p. 145-149.
48. WANG, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 7-14, 2005.
49. DUESTER, G.; FARRÉS, J.; FELDER, M. R.; HOLMES, R. S.; HÖÖG, J. O.; PARÉS, X.; PLAPP, B. V.; YIN, S. H.; JÖRNVALL, H. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 389-395, 1999.
50. RAJ, S. B.; RAMASWAMY, S.; PLAPP, B. V. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. **Biochemistry**, v. 53, n. 36, p. 5791-5803, 2014.
51. PLAPP, B. V. Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 1, p. 3-12, 2010.
52. DOŁĘGA, A. Alcohol dehydrogenase and its simple inorganic models. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 7, p. 916-937, 2010.

53. YON-KAHN, J.; HERVÉ, G. **Molecular and cellular enzymology**. New York: Springer, 2009. 783 p.
54. SEKHAR, V. C.; PLAPP, B. V. Rate constants for a mechanism including intermediates in the interconversion of ternary complexes by horse liver alcohol dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 29, n. 18, p. 4289-4295, 1990.
55. GRUBB, W. T. Catalysis, electrocatalysis, and hydrocarbon fuel cells. **Nature**, v. 198, p. 883-884, 1963.
56. FORTI, J. C. **Aplicação de eletrodos de óxidos ativados em eletrooxidação orgânica: oxidação de formaldeído, acetaldeído e ácido oxálico**. 2005.110f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
57. GONZALEZ, E. R. Eletrocatalise e poluição ambiental. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 262-266, 2000.
58. TICIANELLI, E. A.; CAMARA, G. A.; SANTOS, L. G. R. A. (2005). Eletrocatalise das reações de oxidação de hidrogênio e de redução de oxigênio. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 664-669, 2005.
59. CHUNG, H. T.; WON, J. H.; ZELENAY, P. Active and stable carbon nanotube/nanoparticle composite electrocatalyst for oxygen reduction. **Nature Communications**, v. 4, n 1922, p. 1-5, 2013.
60. GONG, K.; SU, D.; ADZIC, R. R. Platinum-monolayer shell on AuNi_{0.5}Fe nanoparticle core electrocatalyst with high activity and stability for the oxygen reduction reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 41, p. 14364-14366, 2010.
61. ADZIC, R. R.; ZHANG, J.; SASAKI, K.; VUKMIROVIC, M. B.; SHAO, M.; WANG, J. X.; NILEKAR, A. U.; MAVRIKAKIS, M.; VALERIO, J. A.; URIBE, F. Platinum monolayer fuel cell electrocatalysts. **Topics in Catalysis**, v. 46, p. 249-262, 2007.
62. VUKMIROVIC, M. B.; ZHANG, J.; SASAKI, K.; NILEKAR, A. U.; URIBE, F.; MAVRIKAKIS, M.; ADZIC, R. R. Platinum monolayer electrocatalysts for oxygen reduction. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 2257-2263, 2007.

63. ZHANG, J.; SASAKI, K.; SUTTER, E.; ADZIC, R. R. Stabilization of platinum oxygen-reduction electrocatalysts using gold clusters. **Science**, v. 220, p. 10–13, 2007.
64. MASA, J.; SCHUHMANN, W. Electrocatalysis and bioelectrocatalysis—Distinction without a difference. **Nano Energy**, v. 29, p. 466–475, 2016.
65. GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. **Electroanalysis**, v. 9, n. 9, p. 661–674, 1997.
66. MAY, S. W. Applications of oxidoreductases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 370–5, 1999.
67. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.
68. 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. 1068–76, 2011.
69. AZEVEDO, A. M.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M.; FONSECA, L. P. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 2, p. 235–247, 2005.
70. BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996. 471 p.
71. IVNITSKI, D.; BRANCH, B.; ATANASSOV, P.; APBLETT, C. Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 8, p. 1204–1210, 2006.
72. 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.
73. GORTON, L.; DOMÍ, E. Electrocatalytic oxidation of NAD (P) H at mediator-modified electrodes. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 82, no. 4, p. 371–392, 2002.

74. REUILLARD, B.; LE GOFF, A.; COSNIER, S. Polypyrrolic bipyridine bis (phenantrolinequinone) Ru (II) complex/carbon nanotube composites for nad-dependent enzyme immobilization and wiring. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 9, p. 4409-4415, 2014.

75. ABDELLAOUI, S.; MILTON, R. D.; QUAH, T.; MINTEER, S. D. NAD-dependent dehydrogenase bioelectrocatalysis: the ability of a naphthoquinone redox polymer to regenerate NAD. **Chemical Communications**, v. 52, n. 6, p. 1147-1150, 2016.

76. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd Edition. New York: Wiley, 2001, 864p.

77. HIDALGO, R.; ASH, P. A.; HEALY, A. J.; VINCENT, K. A. Infrared spectroscopy during electrocatalytic turnover reveals the Ni-L active site state during H₂ oxidation by a NiFe hydrogenase. **Angewandte Chemie**, v. 127, n. 24, p. 7216-7219, 2015.

78. HEALY, A. J.; REEVE, H. A.; VINCENT, K. A. Development of an infrared spectroscopic approach for studying metalloenzyme active site chemistry under direct electrochemical control. **Faraday Discussions**, v. 148, p. 345-357, 2011.

79. GRABARCZYK, D. B.; ASH, P. A.; VINCENT, K. A. Infrared spectroscopy provides insight into the role of dioxygen in the nitrosylation pathway of a [2Fe2S] cluster iron–sulfur protein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 32, p. 11236-11239, 2014.

80. HIDALGO, R.; ASH, P. A.; HEALY, A. J.; VINCENT, K. A. Infrared spectroscopy during electrocatalytic turnover reveals the ni-l active site state during H₂ oxidation by a NiFe hydrogenase. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 24, p. 7110-7113, 2015.

81. WU, S. P.; BELLEI, M.; MANSY, S. S.; BATTISTUZZI, G.; SOLA, M.; COWAN, J. A. (2011). Redox chemistry of the Schizosaccharomyces pombe ferredoxin electron-transfer domain and influence of Cys to Ser substitutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 806-811, 2011.

82. KRZEMIŃSKI, Ł.; NDAMBA, L.; CANTERS, G. W.; AARTSMA, T. J.; EVANS, S. D.; JEUKEN, L. J. Spectroelectrochemical investigation of intramolecular and interfacial electron-transfer rates reveals differences between nitrite reductase at rest and during turnover. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 38, p. 15085-15093, 2011.

83. SEZER, M.; FRIELINGS DORF, S.; MILLO, D.; HEIDARY, N.; UTESCH, T.; MROGINSKI, M. A.; FRIEDRICH, B.; HILDEBRANDT, P. ZEBGER, I.; WEIDINGER, I. M. Role of the HoxZ subunit in the electron transfer pathway of the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* immobilized on electrodes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 34, p. 10368-10374, 2011.

84. MARRITT, S. J.; VAN WONDEREN, J. H.; CHEESMAN, M. R.; BUTT, J. N. Magnetic circular dichroism of hemoproteins with in situ control of electrochemical potential: "MOTTLE". **Analytical Biochemistry**, v. 359, n. 1, p. 79-83, 2006.

85. ARTZ, J. H.; MULDER, D. W.; RATZLOFF, M. W.; LUBNER, C. E.; ZADVORNY, O. A.; LEVAN, A. X.; WILLIAMS, S. G.; ADAMS, M. W. W.; JONES, A. K.; KING, P. W.; PETERS, J. W. Reduction potentials of [FeFe]-hydrogenase accessory iron-sulfur clusters provide insights into the energetics of proton reduction catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 28, p. 9544-9550, 2017.

86. DE SOUZA, J. P. I.; QUEIROZ, S. L.; NART, F. C. Uso de espectrometria de massas em medidas eletroquímicas - A técnica de DEMS. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 384 - 391, 2000.

87. MICHAELIS, M. I.; MENTEN, L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

88. JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264-8269, 2011.

89. HILL, H. A. O.; SANGHERA, G. S.; CASS, A. E. G. **Biosensors: a practical approach**. Oxford: Oxford University, 1990. 288 p.

90. NASRI, Z.; SHAMS, E.; AHMADI, M. Direct modification of a glassy carbon electrode with toluidine blue diazonium salt: application to NADH determination and biosensing of ethanol. **Electroanalysis**, v. 25, n. 8, p. 1917-1925, 2013.

91. LI, J.; TAN, S. N.; GE, H. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 335, n. 1, p. 137-145, 1996.

92. DE SOUZA, J. C. P.; SILVA, W. O.; LIMA, F. H. B.; CRESPILO, F. N. Enzyme activity evaluation by differential electrochemical mass spectrometry. **Chemical Communications**, v. 53, n. 60, p. 8400-8402, 2017.

93. JENKINS, G.M.; KAWAMURA, K. **Polymeric carbons:** carbon fibre, glass and char. Cambridge: Cambridge University, 1976. 186 p.
94. ZHANG, H.; COURY, L. A. Effects of high-intensity ultrasound on glassy carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 1552-1558, 1993.
95. HATHCOCK, K. W.; BRUMFIELD, J. C.; GOSS, C. A.; IRENE, E. A.; MURRAY, R. W. Incipient electrochemical oxidation of highly oriented pyrolytic graphite: correlation between surface blistering and electrolyte anion intercalation. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2201-2206, 1995.
96. GOSS, C. A.; BRUMFIELD, J. C.; IRENE, E. A.; MURRAY, R. W. Imaging the incipient electrochemical oxidation of highly oriented pyrolytic graphite. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 1378-1389, 1993.
97. AN, H.; TAN, B. H.; MOO, J. G. S.; LIU, S.; PUMERA, M.; OHL, C. D. Graphene nanobubbles produced by water splitting. **Nano Letters**, v. 17, n. 5, p. 2833-2838, 2017.
98. DI SOMMA, I.; MAROTTA, R.; ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V. Nitric acid decomposition kinetics in mixed acid and their use in the modeling of aromatic nitration. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 366-373, 2013.
99. PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; GONÇALVES, A. D.; PAGNONCELLI, K. C.; CRESPILO, F. N. Bioelectrooxidation of ethanol using NAD-dependent alcohol dehydrogenase on oxidized flexible carbon fiber arrays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1698-1707, 2017.
100. MARSH, H. A tribute to Philip L. Walker. **Carbon**, v. 29, n. 6, p. 703-704, 1991.
101. BENNETT, S. C.; JOHNSON, D. J.; JOHNSON, W. Strength-structure relationships in PAN-based carbon fibres. **Journal of Materials Science**, v. 18, n. 11, p. 3337-3347, 1983.
102. PROCTOR, A.; SHERWOOD, P. M. A. X-ray photoelectron spectroscopic studies of carbon fibre surfaces. I. carbon fibre spectra and the effects of heat treatment. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 27, n. 1, p. 39-56, 1982.

103. DESIMONI, E.; CASELLA, G. I.; MORONE, A.; SALVI, A. M. XPS determination of oxygen-containing functional groups on carbon-fibre surfaces and the cleaning of these surfaces. **Surface and Interface Analysis**, v. 15, n. 10, p. 627-634, 1990.

104. XIE, Y.; SHERWOOD, P. M. A. X-ray photoelectron spectroscopic studies of carbon fibers. Part XIV: Electrochemical treatment of pitch-based fibers and the surface and bulk structure changes monitored by XPS, XRD, and SEM. **Applied Spectroscopy**, v. 44, n. 10, p. 1621-1628, 1990.

105. CARLSON, B. W.; MILLER, L. L. Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 2, p. 479-485, 1985.

106. DICU, D.; MUNTEANU, F. D.; CATALIN POPESCU, I.; GORTON, L. Indophenol and O-quinone derivatives immobilized on zirconium phosphate for NADH electro-oxidation. **Analytical Letters**, v. 36, n. 9, p. 1755-1779, 2003.

107. RAFIEE, M.; NEMATOLLAHI, D. Voltammetry of electroinactive species using quinone/hydroquinone redox: a known redox system viewed in a new perspective. **Electroanalysis**, v. 19, n. 13, p. 1382-1386, 2007.

108. ZHANG, J.; ZOU, H.; QING, Q.; YANG, Y.; LI, Q.; LIU, Z.; GUO, X.; DU, Z. Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 16, p. 3712-3718, 2003.

109. XU, Z.; HUANG, Y.; ZHANG, C.; CHEN, G. Influence of rare earth treatment on interfacial properties of carbon fiber/epoxy composites. **Materials Science and Engineering: A**, v. 444, n. 1, p. 170-177, 2007.

110. WANG, S.; CHEN, Z. H.; MA, W. J.; MA, Q. S. Influence of heat treatment on physical-chemical properties of PAN-based carbon fiber. **Ceramics International**, v. 32, n. 3, p. 291-295, 2006.

111. HOLZWARTH, U.; GIBSON, N. The Scherrer equation versus the 'Debye-Scherrer equation'. **Nature Nanotechnology**, vol. 6, n. 9, p. 534-534, 2011.

112. MONSHI, A.; FOROUGHI, M. R.; MONSHI, M. R. Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 2, n. 3, p. 154-160, 2012.

113. LIU, J.; TIAN, Y.; CHEN, Y.; LIANG, J Interfacial and mechanical properties of carbon fibers modified by electrochemical oxidation in $(\text{NH}_4\text{HCO}_3)/(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ aqueous compound solution. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 21, p. 6199-6204, 2010.
114. CLINE, K. K.; MCDERMOTT, M. T.; MCCREERY, R. L. Anomalous slow electron transfer at ordered graphite electrodes: influence of electronic factors and reactive sites. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 20, p. 5314-5319, 1994.
115. SPAIN, I. L. **Chemistry and physics of carbon**. New York: CRC. 1980. v. 16.
116. ZHONG, J. H.; ZHANG, J.; JIN, X.; LIU, J. Y.; LI, Q.; LI, M. H.; CAI, W.; WU, D. Y.; ZHAN, D.; REN, B. Quantitative correlation between defect density and heterogeneous electron transfer rate of single layer graphene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 47, p. 16609-16617, 2014.
117. PELL, W. G.; CONWAY, B. E. Voltammetry at a de Levie brush electrode as a model for electrochemical supercapacitor behaviour. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 500, n. 1, p. 121-133, 2001.
118. TSE, D. C. S.; KUWANA, T. Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine diphosphate with quinones and modified quinone electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 50 n. 9, p. 1315-1318, 1978.
119. BRAUN, R. D.; SANTHANAM, K. S. V.; ELVING, P. J. Electrochemical Oxidation in aqueous and nonaqueous media of dihydropyridine nucleotides NMNH, NADH, and NADPH. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 10, p. 2591-2598, 1975.
120. BARTLETT, P. N.; BIRKIN, P. R.; WALLACE, E. N. K. Oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at poly (aniline)-coated electrodes. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 93, n. 10, p. 1951-1960, 1997.
121. COOK, P. F.; CLELAND, W. W. Mechanistic deductions from isotope effects in multireactant enzyme mechanisms. **Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1790-1796, 1981.
122. DICKENSON, C. J.; DICKINSON, F. M. The role of an essential histidine residue of yeast alcohol dehydrogenase. **European Journal of Biochemistry**, v. 52, n. 3, p. 595-603, 1975.

123. DICKENSON, C. J.; DICKINSON, F. A study of the ionic properties of the essential histidine residue of yeast alcohol dehydrogenase in complexes of the enzyme with its coenzymes and substrates. **Biochemical Journal**, v. 161, n. 1, p. 73-82, 1977.

124. PLAPP, B.V. GANZHORN, A. J.; GOULD, R. M.; GREEN, D. W.; JACOBI, T.; WARTH, E.; KRATZER, D. A. Catalysis by yeast alcohol dehydrogenase. In: WEINER, H.; WERMUTH, B.; CRABB, D. W. (Ed.). **Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 3**. New York: Springer, 1990. p. 241-251.

125. MEISTER, A. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**. New York: John Wiley, 2009. v. 70. 344p.

8 ARTIGOS PUBLICADOS NO DOUTORADO

1. LUZ, R. A. S.; PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILOHO, F. N. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **ChemElectroChem**. v. 1, n. 11, 1751-1777, 2014.
2. CABRERA, F. C.; DE SOUZA, J. C. P.; JOB, A. E.; CRESPILOHO, F. N. Natural-rubber-based flexible microfluidic device. **Rsc Advances**, v. 4, n. 67, p. 35467-35475, 2014.
3. CABRERA, F. C.; MELO, A. F.; DE SOUZA, J. C. P.; JOB, A. E.; CRESPILOHO, F. N. A flexible lab-on-a-chip for the synthesis and magnetic separation of magnetite decorated with gold nanoparticles. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 8, p. 1835-1841, 2015.
4. PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; IOST, R. M.; SALES, F. C. P. F.; CRESPILOHO, F. N. Application of carbon fibers to flexible enzyme electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 780, p. 396-406, 2016.
5. DE SOUZA, J. C. P.; IOST, R. M.; CRESPILOHO, F. N. Nitrated carbon nanoblister for high-performance glucose dehydrogenase bioanodes. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 77, pp. 860-865, 2016.
6. PEREIRA, A. R.; DE SOUZA, J. C. P.; GONÇALVES, A. D.; PAGNONCELLI, K. C.; CRESPILOHO, F. N. Bioelectrooxidation of Ethanol Using NAD-Dependent Alcohol Dehydrogenase on Oxidized Flexible Carbon Fiber Arrays. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 28, No. 9, 1698-1707, 2017.
7. DE SOUZA, J. C. P.; SILVA, W. O.; LIMA, F. H. B.; CRESPILOHO, F. N. Enzyme activity evaluation by differential electrochemical mass spectrometry. **Chemical Communications**, vol. 53, n. 60, p. 8400-8402, 2017.
8. SEDENHO, G. C.; PEREIRA, A. R.; PAGNONCELLI, K. C.; DE SOUZA, J. C. P.; CRESPILOHO, F. N. Implantable enzyme based biofuel cells. In: **Encyclopedia of interfacial chemistry: surface science and electrochemistry**, 2017. *Invited and Submitted*.

9. PEREIRA, A. R.; SEDENHO, C. R.; DE SOUZA, J. C. P.; CRESPILO, F. N. Enzyme bioelectrochemistry. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2017. *Accepted*