Rodrigo Michelin Iost

Biocélula a Combustível *On-Chip* Utilizando Folhas Individuais de Grafeno

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

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

16/09/2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Iost, Rodrigo Michelin

Biocélula a combustível on-chip utilizando folhas individuais de grafeno. /
Rodrigo Michelin Iost. — São Carlos, 2016.
94 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2016.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

1. Enzimas. 2. Biocélula. 3. Grafeno. 4. on-Chip. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

Dedicatória

Reservo esse espaço valioso para dedicar esse trabalho a minha família, sem a qual o seu apoio esse caminho não seria possível. Aos meus pais Rui Alberto Iost e Ana Fátima Michelin Iost, a minha irmã Simone Michelin Iost Giovani pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

A minha família pela convivência, muito mais do que especial para mim. Aos primos com quem desfruto de ótimos momentos: Matheus Paiola, Lais Paiola e Rodrigo Pimenta, Cristiano Iost e Aline Picelli, Sandro Lourenço do Prado.

Aos meus amigos da república com quem eu convivi e pude desfrutar de grandes alegrias e momentos de descontração, crescimento pessoal e experiências: Vitor Nunes, Antônio Francisco, Roberto Luz, Everton Leandro, Germano Santos e aos meus amigos que embora um pouco distantes a amizade permanece como sempre, Alexandre Carrara, Raphael Rinaldi, Bruno Manzolli, Caio Ronconi, Alan Barros e Alisson Barros.

Ao amigo Prof. Eugênio Duarte de Almeida pelo apoio desde o ensino médio, pelos conselhos e pelo conhecimento que fizeram uma grande diferença na minha vida profissional.

Aos amigos do Instituto Max Planck para Pesquisa do Estado Sólido com quem pude conviver durante o meu período de doutorado sanduíche, na cidade de Estugarda: Laura Zuccaro (Ciao), Doris Grumelli, Peter Jacobson, Bogdana Borca, Ana Maldonado Cid, Claudius Morchutt, Matthias Munks, Pablo Merino, Muriel de Pauli e Fabiola Balderas. Roberto Urcuyo, Milena Jímenes e Ma Xing, obrigado pela amizade.

Obrigado a todos do Grupo de Bioeletroquímica e Interfaces pela convivência desde o início do doutorado.

Roseli Sanches e a *todos* do grupo Paz e Harmonia, muito obrigado pelos conselhos e pela orientação.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Frank Nelson Crespilho pela orientação não somente durante o meu doutoramento mas desde o início da minha carreira científica no grupo de Polímeros Prof. Bernhard Gross, no Instituto de Física de São Carlos. O apoio científico, as discussões e o acompanhamento de perto nos projetos de pesquisa tanto no Brasil quanto no exterior foram de extrema importância para a minha formação acadêmica.

O meu muito obrigado à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas de doutorado (2012/15442-6) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE, 2013/15433-0) e apoio financeiro para realização dos projetos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Klaus Kern, professor da Ècole Polytechnique na Suíça e diretor do Instituto Max Planck e ao orientador no exterior e líder de grupo Dr. Kannan Balasubramanian pela disposição, dedicação e pela oportunidade de trabalhar em um instituto de excelência em pesquisa na área de dispositivos eletrônicos. As reuniões e discussões foram uma bagagem única na minha formação como pesquisador. Muito obrigado pela oportunidade.

Aos professores do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pela minha formação profissional, pela ajuda e conselhos em alguns momentos do curso que foram muito importantes para mim.

*“importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim,
pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo
mundo vê”*

Arthur Schopenhauer

Resumo

A miniaturização de uma biocélula a combustível (BC) enzimática de glicose/O₂ para aplicação em dispositivos bioeletrônicos implantáveis representa um grande desafio em eletroquímica moderna. Isso porque é preciso desenvolver bioeletrodos com alta atividade bioeletrocatalítica, com enzimas fortemente ligadas a superfície eletródica. Além disso, o próprio processo de micromanipulação é desafiador, uma vez que é desejável obter biocélulas miniaturizadas e com alta densidade de potência. Para isso, desenvolveram-se bioânodos e biocátodos compostos por folhas de grafeno individuais modificadas com as enzimas glicose desidrogenase (GDh) e bilirrubina oxidase (BOx), respectivamente. Eletrodos de grafeno com área de 10⁻³ cm² e espessura de 0,9 ± 0,2 nm foram utilizados em um microchip de Si/SiO₂. Observou-se que o grafeno transferido para o microchip permanecia com contaminações de cobre, mesmo após a utilização dos métodos químicos tradicionais de remoção desse metal. A presença de cobre é decorrente do processo de fabricação do grafeno, neste caso, a deposição química em fase vapor (CVD). Para remover qualquer resíduo deste metal, submeteu-se o grafeno a um procedimento de remoção eletroquímica de cobre, denominada aqui como *e-etching*. Uma vez não observada qualquer corrente faradaica residual associada às impurezas, obtiveram-se os bioeletrodos com a GDh e a BOx. Para a imobilização enzimática, utilizou-se a ligação covalente via funcionalização com o ácido 4-aminobenzóico. As curvas de polarização de estado quase-estacionário obtidas com os bioeletrodos em tampão fosfato pH 7,0 revelaram correntes de *onset* para oxidação de glicose em -0,13 V e redução de oxigênio em 0,45 V. Por fim, os eletrodos foram utilizados em uma BC sem membrana, operando no microchip de Si/SiO₂, em eletrólito tampão fosfato saturado com O₂ e glicose 8,0 mmol L⁻¹. A BC apresentou um potencial de circuito aberto em 0,55 V, com densidade de potência volumétrica igual a 1,7 W cm⁻³, o maior valor reportado até os dias de hoje para uma BC.

Palavras-chave: grafeno, deposição química em fase vapor, remoção eletroquímica, enzimas oxidoredutases, biocélulas a combustíveis.

Abstract

The miniaturization of a glucose/O₂ enzymatic biofuel cell (BFC) for application in implantable bioelectronic devices is a challenge in electrochemistry. For this purpose, the necessity of bioelectrodes development with high biocatalytic activity such as enzymes strongly attached to electrode surfaces is a current trend. Moreover, the micromanipulation procedure itself is a challenge since the obtention of BFCs with high power density is desirable. Then, the present study shows the partial results obtained in the development of a glucose/O₂ BFC with the characteristics exemplified. For the later, bioanodes and biocathodes were obtained with single graphene flakes modified with the enzymes glucose dehydrogenase (GDh) and bilirubin oxidase (BOx), respectively. Graphene flakes electrodes with area of about 10⁻³ cm² and thickness of 0,9 ± 0,2 nm were used in a Si/SiO₂ microchip. It was observed that transferred graphene to the microchip remained with copper/copper oxide contamination even after the use of conventional methodologies for the remotion of the metal from single graphene foils. The presence of the remaining copper is due to the fabrication process of graphene by chemical vapor deposition (CVD). For the remotion of remaining impurities from graphene, the electrochemical remotion of copper from graphene was carried out in acidic media by the so called *e-etching* procedure. Since no residual faradaic current was observed due to metal/metal oxide impurities in graphene electrodes, the bioelectrodes were obtained with the enzymes GDh and BOx. The covalent functionalisation of graphene with 4-aminobenzoic acid via diazonium coupling reaction was used for the enzymatic immobilization. The quasi-stationary polarization curves obtained with the bioelectrodes in phosphate buffer pH = 7.0 showed onset oxidation current for glucose at -0.13V and reduction of molecular oxygen starting at +0.45V. Finally, the bioelectrodes were used in a membraneless BFC operating in a Si/SiO₂ microchip under saturated oxygen and glucose 8 mmol L⁻¹ in the electrolyte media. The BFC showed an open circuit potential at 0.55V and volumetric power density of 1.7 W cm⁻³, the highest value reported for an enzymatic BFC so far.

Keywords: graphene, chemical vapor deposition, *e-etching*, oxidoreductase enzymes, biofuel cells.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação de uma BC sem membrana. O esquema mostra o combustível oxidando no anodo e o agente oxidante reduzindo no cátodo.....	18
Figura 2 - a) Representação cristalográfica da enzima GDh (RCSB PDB) e b) a formula química estrutural do grupamento prostético NAD localizado na estrutura proteica da GDh.....	21
Figura 3 - Representação da estrutura cristalográfica da enzima BOx (<i>Myrothecium Verrucaria</i> , from [EC 1.3.3.5]). Em destaque, o sitio ativo da enzima BOx com os átomos de cobre T1 com o aglomerado T2/T3 (esferas azuis).....	22
Figura 4 - a) Mecanismo de TME e b) da TDE.....	23
Figura 5 - Representação da imobilização enzimática em suporte sólido. a) adsorção física, b) reação de cruzamento intercadeia, c) em monocamadas auto-organizadas (SAMs), d) membrana bilipídica e e) aprisionamento em matriz polimérica.	25
Figura 6 – Reação de formação do íon de diazônio. Após a reação, N ₂ molecular é formado e a superfície é modificada covalentemente com o grupamento arila.....	27
Figura 7 – Representação esquemática do a) grafeno funcionalizado com grupos (–COOH) e após reação com b) EDC e c) NHS.....	28
Figura 8 – Representação esquemática do processo de adsorção de CH ₄ na folha de Cu e difusão para formação das folhas de grafeno, como proposto por Li e colaboradores ⁷²	32
Figura 9. Representação esquemática do procedimento de remoção do cobre (I), com posterior realização do procedimento de lavagem adicional (II a IV).....	40
Figura 10 – a) Fotografia do chip de Si/SiO ₂ /grafeno. b) Imagem óptica do chip de Si/SiO ₂ /grafeno com um aumento de 40x.	41
Figura 11 – Fluxograma representativo do procedimento utilizado para a obtenção dos eletrodos de grafeno CVD e posterior transferência em Si/SiO ₂ para a obtenção da BC enzimática.....	47
Figura 12 - a) Voltamogramas lineares do (I) grafeno transferido para o substrato de Si/SiO ₂ pelo procedimento de lavagem do cobre com solução de HCl:H ₂ O ₂ , (II) folha grafeno/cobre/grafeno como obtida e (III) grafeno transferido para o substrato de Si/SiO ₂ com imersão adicional em solução de HCl:H ₂ O ₂ por uma hora. Inset: Zoom da região da curva III. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 7,0. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . T = 25° C em condições ambiente. b) Diagrama de Pourbaix simplificado para o sistema Cu : H ₂ O mostrando o comportamento redox do cobre em função do potencial e do pH do meio eletrolítico.....	49
Figura 13 – Imagens de microscopia óptica mostram o eletrodo de grafeno antes (a) e após a eletrodeposição de cobre (b) . As figuras mostram a superfície do eletrodo após 11 ciclos (c) e 25 ciclos (d) em meio eletrolítico de KCl 0,1 mol L ⁻¹ . As figuras mostram a superfície do eletrodo após 11 ciclos (e) e 25 ciclos (f) em meio eletrolítico de HCl 0,1 mol L ⁻¹	51
Figura 14 – Diagrama de Pourbaix para o equilíbrio Cu : Cl ⁻ : H ₂ O. T = 25° C, condições ambientes.....	53
Figura 15 – Voltametria de eletro-dissolução do cobre remanescente das amostras de grafeno CVD a) com imersão adicional de uma hora do eletrodo de grafeno na solução de HCl:H ₂ O ₂ e b) sem imersão adicional, utilizando-se somente o processo de remoção do cobre convencional. Faixa de potencial utilizada: +/- 1,0V (vs. Ag/AgCl). Eletrólito suporte: HCl 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ . T = 25° C, condições ambientes.....	55
Figura 16 – Voltametria cíclica mostrando a diminuição do pico referente a eletrodissolução do cobre depositado sobre os eletrodos de FCF após 42 ciclos voltamétricos. Eletrólito suporte: HCl 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ . T = 25° C, condições ambientes.....	57

Figura 17 – Imagens de AFM obtidas da mesma posição do eletrodo de grafeno antes (a) e após o e-etching (b). Perfis de altura relativa obtidos da região na qual a barra em branco é indicada nas imagens antes (c) e após o e-etching (d). A barra de escala na figura (a) mostra a altura relativa de -1,1 a 0,6 nm enquanto que na figura (b) mostra uma altura relativa de -1,1 a 0,7 nm.....	59
Figura 18 – Espectro Raman para o eletrodo de grafeno.....	60
Figura 19 – a) Fotografia da solução de sal de diazônio. b) Voltametria cíclica do chip de Si/SiO ₂ /grafeno na solução de sal de diazônio. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T = 5^\circ \text{ C}$	61
Figura 20 – Representação esquemática do (a) substrato Si/SiO ₂ , (b) folha de grafeno transferido, (c) funcionalização do grafeno com íon de diazônio, (d) acoplamento com EDC/NHS e posterior exposição dos eletrodos com soluções das enzimas GDh e BOx para obtenção do bioânodo (e) e biocátodo (f).....	62
Figura 21 – Representação esquemática da estrutura molecular da BOx (E.C. 1.3.3.5, dimensões da cela unitária 52Å x 83Å x 143Å) pela representação em bola e palito (em branco) com destaque para os resíduos de Lys em laranja e os centros de cobre T1 e T2/T3 em azul. Para a enzima GDh (E.C. 1.1.1.47, dimensões 120Å x 66Å x 119Å), destaque é dado para os resíduos de Lys em laranja e o NAD ⁺ em vermelho.....	64
Figura 22 - Imagens de AFM dos eletrodos de grafeno a) Inicial, b) após o e-etching e c) após a funcionalização e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS. Os gráficos mostram a diferença na altura relativa do eletrodo d) inicial, e) após o e-etching e f) após a funcionalização e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS. A barra de escala na figura (a) mostra a altura relativa de 0,03 a 1,0 nm, (b) 3,8 a -1,9 nm e (c) 6,0 a 7,2 nm. O zoom da figura mostra os spots associados a presença das enzima no eletrodo com barra de escala de 50 nm.....	65
Figura 23 - a) Imagem de AFM do eletrodo de grafeno após a funcionalização e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS. O zoom da região em linha pontilhada mostra algumas partes da borda da folha de grafeno modificadas. O gráfico da figura b) mostra a altura relativa de -3,8 a 1,1 nm obtido da região indicada na figura pela barra em branco.....	66
Figura 24 - a) Voltametria cíclica do bioânodo de grafeno com a enzima GDh na ausência (em preto) e na presença de glicose 8 mmol L ⁻¹ (em vermelho). b) Estudo de estabilidade do bioeletrodo de GDh após o 1 ^a (em preto) e 20 ^a ciclo (em vermelho). Velocidade de varredura: 2 mV s ⁻¹	67
Figura 25 - Voltametria cíclica do bioeletrodo grafeno/GDh após adições sucessivas de glicose 1 mmol L ⁻¹ no meio eletrolítico. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio pH = 7,0, 0,1 mol L ⁻¹ . T = 25° C. Velocidade de varredura: 2 mV s ⁻¹	69
Figura 26 - a) Cronopotenciometria do grafeno em presença de glicose 8,0 mmol L ⁻¹ (em preto), do bioânodo na ausência (linha pontilhada em vermelho) e na presença de glicose 8,0 mmol L ⁻¹ (linha sólida vermelha). b) Cronoamperometria do eletrodo de grafeno na ausência (em preto) e na presença da enzima GDh (em vermelho) com adições sucessivas de glicose com eletrodo polarizado em 0,2 V (vs. Ag/AgCl). Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio pH = 7,0, 0,1 mol L ⁻¹ . T 25° C.....	70
Figura 27 - a) Voltametria cíclica do eletrodo de grafeno (em cinza), grafeno com a enzima BOx na presença de gás Ar saturado (em preto) e em O ₂ saturado. Velocidade de varredura: 2 mV s ⁻¹ . b) Medidas de potencial de eletrodo do grafeno na ausência da BOx, na presença da enzima imobilizada no eletrodo em Ar saturado (linha pontilhada azul) e em O ₂ saturado (linha sólida azul). c) A cronoamperometria do eletrodo de grafeno (em preto) e do eletrodo de grafeno com a enzima BOx imobilizada (em azul) mostra o comportamento da densidade de corrente após a injeção de gás oxigênio no meio eletrolítico e a estabilidade durante 40 minutos com o eletrodo polarizado em 0,0 V (vs. Ag/AgCl). d) Estabilidade do bioeletrodo após 20 ciclos em solução saturada com gás O ₂ . O tempo de saturação para o gás Ar foi de 60 minutos e para o gás O ₂ foi de 30 minutos. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio pH = 7,0, 0,1 mol L ⁻¹ . T = 25° C.....	72
Figura 28 – Representação esquemática da BC enzimática.....	74
Figura 29 - a) Curvas de polarização do bioânodo (em vermelho) e do biocátodo (em azul) em O ₂ saturado na presença dos respectivos substratos (linhas sólidas) e na ausência dos substratos (linhas pontilhadas). Velocidade de varredura: 2 mV s ⁻¹ . b) Voltagem registrada da BC enzimática (em azul escuro) e na ausência das enzimas (em cinza) na presença dos substratos glicose e O ₂ no meio eletrolítico. c) Curva E vs. J mostrando a corrente da BC	

enzimática (em azul) e na ausência das enzimas (em cinza). **d)** Curva de potência obtida da BC enzimática (em azul) e na ausência das enzimas (em preto) na presença dos substratos glicose e O_2 saturado.....75

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Reagentes.....37

Tabela 2 – Energia livre padrão de formação para as espécies de cobre ($\Delta \overline{G}_f^\ominus = -nFE^\ominus$)⁸⁶.....43

Tabela 3 – Tabela com valores comparativos de densidade de potência volumétrica para diferentes sistemas.....79

Lista de Abreviaturas e Siglas

BC.....	Biocélula a combustível
GDh.....	Glicose desidrogenase do fungo <i>Pseudomas sp.</i>
BOx.....	Bilirrubina oxidase do fungo <i>Myrothecium verrucaria</i>
EDC.....	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
NHS.....	N-hidroxisuccinimida
FCF.....	Fibra de carbono flexível
CVD.....	<i>Chemical vapor deposition</i>
PDMS.....	Poli(dimetil siloxano)
TDE.....	Transferência direta de elétrons
TME.....	Transferência mediada de elétron
PE.....	Poli(estireno)

Lista de Símbolos

E^0	Potencial padrão
OCP	Potencial de circuito aberto
T	Temperatura

Sumário

1.0 Introdução	16
1.1 Biocélulas a Combustíveis.....	16
1.1.1 Enzimas Redox	19
1.1.2 Mecanismos de Transferência de Elétrons	22
1.1.3 Estratégias de Imobilização Enzimática	24
1.1.4 Eletrodos de Carbono Funcionalizados	26
1.2 Dispositivos <i>on-Chip</i>	29
1.3 Grafeno	30
1.3.1 Obtenção do Grafeno	31
1.3.2 Transferência do Grafeno CVD para Substratos Sólidos	32
1.3.3 Efeito de Impurezas nas Propriedades do Grafeno.....	34
2.0 Objetivos.....	36
3.0 Parte experimental	37
3.1 Materiais	37
4.0 Equipamentos	38
4.1 Eletroquímica	38
4.2 Microscopia de Força Atômica.....	38
4.3 Espectroscopia Raman.....	38
4.4 Microscopia Óptica.....	39
5.0 Preparo dos Biodispositivos.....	39
5.1 Transferência do Grafeno CVD para o Chip de Si/SiO ₂	39
5.2 Deposição de Cobre Sobre Grafeno CVD e FCF	42
5.3 Remoção Eletroquímica de Cobre do Grafeno (<i>e-etching</i>)	42
5.4 Obtenção do Diagrama de Pourbaix Simplificado para o Sistema Cu:H ₂ O...	43
6.0 Preparo dos Bioeletrodos	45
6.1 Funcionalização dos Eletrodos via Reação com Íon de Diazônio.....	45
6.2 Bioânodo.....	46
6.3 Biocátodo.....	46
7.0 Resultados	48
7.1 Estudo Eletroquímico do Grafeno Transferido	48
7.2 Eletro-dissolução do Cobre em meio Ácido (<i>e-etching</i>)	50
7.2.1 Estudo por Microscopia Óptica.....	50
7.2.2 Estudo Eletroquímico de Dissolução do Cobre.....	52

7.2.3 Remoção de Cobre de Fibras Flexíveis de Carbono.....	56
7.2.4 Imagens de Microscopia de Força Atômica: Grafeno em Si/SiO ₂	58
7.2.5 Espectroscopia Raman.....	59
7.2.6 Funcionalização via Reação com Íon de Diazônio.....	61
7.2.7 Imobilização Enzimática	62
8.0 Imagens de AFM dos Bioeletrodos	64
8.1 Biocátodo Contendo BOx.....	64
8.2 Bioânodo Contendo GDh.....	66
9.0 Bioeletrocatalise	67
9.1 Oxidação de Glicose.....	67
9.2 Redução de Oxigênio.....	71
10.0 Biocélula a Combustível Enzimática de Glicose/O₂	74
11.0 Discussão	77
12.0 Conclusões	79
13.0 Referências	81
14.0 Publicações no Período do Doutorado	93
15.0 Prêmios e Trabalhos Destacados no Período de Doutorado.....	94

1.0 Introdução

A busca por fontes de energia é crescente. O tema em questão é em grande parte associado ao desenvolvimento da sociedade moderna. Paralelamente ao consumo energético, soluções alternativas ao uso de combustíveis não renováveis, como os combustíveis fósseis, tem sido buscadas e também variáveis de uso que causem menos agressões ao meio ambiente. Com isso, sistemas de conversão eletroquímica de energia, como as células a combustível, têm sido objeto de estudo devido principalmente ao rendimento energético superior a outras fontes de energia. Neste contexto, as biocélulas a combustíveis (BCs) também têm ganhado destaque principalmente no que concerne a possibilidade de aplicação em dispositivos miniaturizados como, por exemplo, em implantes médicos. No entanto, implantes médicos dependem da utilização de dispositivos em escala reduzida, portáteis e de fácil manuseio. Esta demanda abriu caminho para o desenvolvimento de técnicas de manipulação em micro e nanoescala, principalmente na utilização de materiais de componentes de carbono, como folhas de grafeno.

1.1 Biocélulas a Combustíveis

A observação do comportamento da corrente elétrica quando em contato com organismos vivos ocorreu em meados do século XIX por Luigi Galvani¹. A contração muscular foi observada quando dois terminais elétricos foram conectados nas pernas de uma rã. Esse estudo pioneiro deu impulso ao surgimento da bioeletroquímica associada aos organismos vivos. O estudo da transferência de carga em sistemas biológicos tem grandes implicações tanto na área de biosensores quanto na área de geração de energia em biocélulas a combustível uma vez que o elemento responsável pelo reconhecimento molecular é uma molécula biológica que pode ser uma enzima, uma proteína, DNA entre outros². O primeiro trabalho publicado na literatura sobre a geração de energia utilizando microorganismos foi relatado por Potter no começo do século XIX³, que mais tarde deu origem a uma classe de biodispositivos denominada de BCs. Existem duas classes de BCs, as enzimáticas e as microbiológicas. As microbiológicas envolvem a

utilização de bactérias e/ou fungos nas reações bioeletrocatalíticas, enquanto que as BCs enzimáticas utilizam enzimas redox como catalisadores de reações bioquímicas⁴.

Uma BC a combustível é caracterizada por dois compartimentos, sendo um anódico e outro catódico, onde todo o processo de interconversão de reagentes em produtos é acelerado pelos biocatalizadores. BCs são dispositivos bioeletroquímicos que convertem energia química em energia elétrica, onde enzimas e/ou microorganismos são utilizados como componentes dos eletrodos, catalisando as reações de oxidação de combustíveis (ex. glicose) e a redução de agentes oxidantes (ex. O_2)⁵. Alguns estudos mostram que as BCs enzimáticas podem ser, futuramente, aplicadas como "biobaterias" implantáveis, ou melhor, como conversores de energia para marca-passos, bombas de insulina, implantes neurais, bioestimuladores elétricos e liberação controlada de fármacos⁴, que operam com voltagens de até 1,0V.

De uma maneira geral, as BCs microbianas apresentam algumas vantagens quando comparadas as BCs enzimáticas em termos de operação, uma vez que podem ser alcançadas maiores densidades de potência em tempos maiores de operação. No entanto, algumas dificuldades como o controle operacional da imobilização dos microorganismos na superfície do eletrodo, o estudo detalhado da transferência de carga entre o catalisador biológico e o eletrodo utilizado ainda são fazer parte da utilização desses tipos de BCs. Já as BCs enzimáticas apresentam algumas vantagens devido ao controle de imobilização dos biocatalisadores na superfície eletródica e da transferência de carga entre a enzima e o eletrodo com máxima eficiência. Ainda, a possibilidade de obtenção de biodispositivos miniaturizados, característica almejada quanto a aplicabilidade, destaca a grande vantagem no estudo de BCs.

As BCs são definidas de acordo com a presença de uma membrana trocadora de prótons que separam os compartimentos anódico e catódico⁶. Outro fato interessante é a obtenção de BCs na ausência da membrana trocadora de prótons. A figura 1 mostra o funcionamento de uma BC enzimática operando na ausência de uma membrana trocadora de íons.

Figura 1. Representação de uma BC sem membrana. O esquema mostra o combustível oxidando no anodo e o agente oxidante reduzindo no cátodo.

Fonte: Autoria Própria

Alguns trabalhos merecem destaque no que concerne o estudo de BCs enzimáticas e os desafios para melhorar suas propriedades têm sido o estado-da-arte no desenvolvimento desses biodispositivos. Destaque tem sido dado para a utilização de materiais de carbono como plataformas para a imobilização enzimática. Nicolas Mano e colaboradores⁷, e Serge Cosnier e colaboradores⁸ utilizaram matrizes porosas de carbono para aumentar a densidade de corrente por área e a voltagem da BC. A estratégia adotada nos dois casos foi a utilização de eletrodos de carbono com altas áreas, para que uma grande quantidade de enzimas fosse imobilizada na superfície dos eletrodos. A utilização de uma matriz porosa de carbono pelo grupo de Cosnier permitiu que altas densidades de corrente fossem obtidas tanto para o bioânodo contendo as enzimas glicose oxidase e catalase quanto para o biocátodo contendo a enzima lacase. Grande destaque foi dado para a alta estabilidade do dispositivo durante trinta dias com a maior densidade de potência ($1,3 \text{ mW cm}^{-2}$ em $0,63\text{V}$) e voltagem de célula $0,95 \text{ V}$, em condições fisiológicas. Em um trabalho recente, Kwon e colaboradores⁹ utilizaram uma estratégia de aprisionamento das enzimas glicose oxidase e bilirrubina oxidase (BOx) entre camadas de eletrodos de carbono na presença de mediadores de transferência de

carga. A BC enzimática apresentou voltagem de 0,70 V e potência máxima de 2,8 mW cm⁻². Outra estratégia muito conhecida é a utilização de hidrogéis com propriedades redox como forma de aprisionamento das enzimas e sua utilização em eletrodos modificados. Plumeré e colaboradores¹⁰ mostraram a possibilidade do uso de hidrogéis redox como estratégia para obtenção de uma BC enzimática do tipo H₂/O₂ de alto desempenho. Uma vez que a presença de oxigênio molecular (O₂) que é utilizado como substrato para a reação biocatalizada no cátodo interfere na atividade biocatalítica da enzima hidrogenase utilizada no ânodo, a estratégia adotada pela utilização do hidrogel para o aprisionamento e imobilização da enzima no ânodo permitiu que a BC enzimática obtida apresentasse uma alta eficiência para esta configuração de eletrodos, com voltagem de 0,95 V e densidade de potência máxima de 178 μW cm⁻².

Esses exemplos mostram que a estratégia adotada para a obtenção dos biodispositivos desempenha uma etapa fundamental para a melhoria de suas propriedades como a densidade de corrente, a voltagem e a potência gerada pela BC. Uma das etapas mais importantes é a preservação, ao menos parcial, da atividade biocatalítica da enzima quando imobilizada sobre uma superfície sólida. Ainda, é almejado que após o procedimento de imobilização a comunicação eletrônica entre a enzima e o eletrodo seja tal que uma máxima eficiência de transferência de carga entre o cofator da enzima e a superfície do eletrodo seja uma das características alcançadas. Para isso, algumas informações a respeito da característica das enzimas utilizadas são de extrema importância.

1.1.1 Enzimas Redox

As enzimas são conhecidas como catalisadores biológicos e sua atividade catalítica é dependente da integridade da estrutura proteica do seu sítio catalítico. Enzimas podem apresentar cofatores na estrutura proteica, sendo esses íons (ex. Fe²⁺), moléculas orgânicas (grupos prostéticos) não aminoacídicas e grupos metalorgânicos. Os cofatores são também conhecidos como os grupos ativos das enzimas. Como as enzimas são responsáveis pela catálise específica de uma substância química, elas são classificadas de acordo com a reação que elas catalisam. Dentro das classes de enzimas,

destacam-se as enzimas oxidoredutases que catalisam a transferência de elétrons de uma molécula para outra em uma reação redox. As enzimas oxidases ou desidrogenases são enzimas responsáveis pela oxidação de substratos específicos e são utilizadas como catalisadores biológicos em bioeletrodos de BCs¹¹. A enzima glicose desidrogenase (GDh), por exemplo, catalisa a conversão de D-glicose em glucono-1-lactona por meio de um aceptor de elétrons como a flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou a fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH)¹². No caso da GDh-NAD⁺ dependente, a molécula de β-D-glicose se liga ao cofator reduzindo o NAD⁺ a NADH, formando gliconolactona, como representado pela reação representada em (1).

Diferentemente da enzima glicose oxidase (GOx), que também catalisa a conversão de glicose em ácido glicônico, o que torna a utilização da enzima GDh como componente biológico para obtenção de bioânodos é também o fato de que a atividade biocatalítica da enzima não ser influenciada pela presença de oxigênio molecular dissolvido no meio eletrolítico^{13, 14}. Essa característica a torna interessante, principalmente em dispositivos biológicos do tipo sem membrana trocadora de íons, fator que viabiliza também a miniaturização. A figura 2a mostra a estrutura cristalográfica da enzima GDh (RCSB PDB) e a figura 2b mostra a representação da fórmula química estrutural do grupo prostético NAD⁺ presente no interior de sua estrutura proteica.

Figura 2 - **a)** Representação cristalográfica da enzima GDh (RCSB PDB) e **b)** a fórmula química estrutural do grupamento prostético NAD⁺ localizado na estrutura proteica da GDh.

Fonte: RCSB PDB Jmol (*Protein Data Bank*), número de identificação IGCO.

As enzimas peroxidases são, também, pertencentes à classe das enzimas oxidoreduases. Estas enzimas são amplamente utilizadas como biocatalisadores em cátodos de BCs. Um exemplo de reações catalisadas pelas enzimas peroxidases é a reação de oxidação de substâncias químicas como compostos fenólicos na presença de oxigênio molecular (O₂). A reação de redução de oxigênio (RRO) catalisada pelas enzimas multicobre oxidases como as enzimas laccase (Lc) e bilirrubina oxidase (BOx) é amplamente discutida em trabalhos publicados na literatura e o estudo dessas enzimas desempenha um papel essencial para o desenvolvimento de BCs¹⁵. É conhecido que a RRO apresente várias etapas elementares¹⁶. No entanto, é proposto em alguns trabalhos que a RRO pela enzima BOx apresente o mecanismo direto de conversão direta de O₂ à água via quatro elétrons¹¹. A reação representada em (2) mostra a RRO catalisada pela enzima BOx. A figura 3 mostra a estrutura química BOx que apresenta quatro átomos de cobre do tipo T1, T2 e T3 em seu interior que são responsáveis pela redução biocatalítica do O₂.

Figura 3 - Representação da estrutura cristalográfica da enzima BOx (*Myrothecium Verrucaria*, from [EC 1.3.3.5]). Em destaque, o sítio ativo da enzima BOx com os átomos de cobre T1 com o aglomerado T2/T3 (esferas azuis).

Fonte: RCSB PDB Jmol (*Protein Data Bank*), número de identificação 2XLL.

1.1.2 Mecanismos de Transferência de Elétrons

Uma das principais características na obtenção de BCs enzimáticas é a comunicação eficiente entre a enzima e a superfície do eletrodo. A comunicação entre a enzima e o eletrodo permite que os elétrons envolvidos na reação biocatalizada sejam utilizados de forma a alimentarem o circuito da BC enzimática. As reações catalíticas envolvendo enzimas redox apresentam dois tipos de mecanismo^{17, 18}: (i) a transferência direta de elétrons (TDE) entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo e; (ii) a transferência mediada de elétrons (TME) entre o cofator da enzima e o eletrodo. É conhecido que a comunicação direta entre o cofator da enzima e a superfície do eletrodo não é alcançada facilmente, visto que a enzima é formada por uma estrutura proteica com o cofator presente no interior de sua estrutura. Com isso, algumas estratégias adotadas no preparo de bioeletrodos tem por objetivo “diminuir” a distância entre o cofator da enzima e a superfície do eletrodo.

No mecanismo de TME uma espécie redox ativa esta presente na superfície dos eletrodos^{19, 20} ou dissolvida em solução eletrolítica que age como um agente intermediário na transferência de elétrons (figura 4a), esteja ela presente na superfície do eletrodo ou na solução eletrolítica. Esses fatores estão diretamente relacionados com a metodologia utilizada na imobilização enzimática. Algumas características principais

dos mediadores de elétrons são desejáveis quando utilizados na obtenção de bioeletrodos, como moléculas de baixa massa molar e processo de transferência de elétrons eletroquimicamente reversível com relação ao eletrodo. Já é conhecido também que o uso de mediadores de transferência de carga também requer que o potencial termodinâmico do mediador seja o mais próximo possível do potencial do cofator enzimático, uma vez que a voltagem da cela será diretamente influenciada pelo potencial da molécula utilizada.

No mecanismo de TDE os elétrons são transferidos do cofator da enzima diretamente da superfície do eletrodo durante a reação biocatalizada (ou vice versa) pelo sítio catalítico da enzima, de forma que nenhuma espécie intermediária é utilizada na reação, (figura 4b). De acordo com esse mecanismo, a superfície do eletrodo age como um co-substrato para a reação. Nesse caso, o efeito catalítico está associado também a uma redução do sobrepotencial necessário para que a reação aconteça. Embora ainda muito discutido¹⁸, esses dois mecanismos são propostos quando estratégias de obtenção de BCs enzimáticas.

Figura 4 - a) Mecanismo de TME e b) da TDE.

Fonte: Adaptado de LUZ, R.A.S.; PEREIRA, A.R.; DE SOUZA, J.C.P.; SALES, F.C.P.F.; CRESPILO, F.N., Enzyme Biofuel Cells: Thermodynamics, Kinetics and Challenges in Applicability. *ChemElectroChem*, v.1, n.11, p. 1751-1777, 2014.

A observação desses dois tipos de mecanismos envolve a metodologia utilizada na imobilização da enzima e tem sido destacados como um dos fatores de extrema importância no desempenho de BCs enzimáticas^{21, 22}, uma vez que a otimização da comunicação entre a enzima e o eletrodo proporciona uma melhoria em algumas

propriedades da BC enzimática, como uma maior densidade de corrente e voltagens de cela unitária.

1.1.3 Estratégias de Imobilização Enzimática

Durante muitos anos, a atividade biocatalítica de enzimas foi estudada em soluções aquosas em condições de temperatura e composições controladas. Com isso, a atividade biocatalítica de enzimas na presença de substratos eram estudados com o objetivo de explicar a atividade da enzima para uma determinada reação e seu mecanismo. Considerando a atividade de uma enzima para uma determinada reação, alguns fatores como a reação catalisada em ambientes com um grande número de espécies, participantes de aglomerados, e também em ambientes confinados como reações biocatalisadas em superfícies são de grande relevância²³. Isso se deve ao fato de que a tentativa de reproduzir e controlar a atividade das enzimas fora de seu ambiente natural ou a reprodução de sua atividade em um ambiente desejado, como na superfície de um eletrodo, é interessante do ponto de vista científico e tecnológico. Ainda, a preservação da atividade biocatalítica dessas enzimas quando imobilizadas na superfície de eletrodos é importante em estudos de BCs, e é dependente da estratégia adotada para a imobilização enzimática.

Algumas estratégias adotadas para imobilização de enzimas em suportes eletródicos merecem destaque²⁴, como mostrado na figura 5. A imobilização enzimática em eletrodos tem sido investigado pelo nosso grupo de pesquisa pela utilização da adsorção simples da enzima no eletrodo²⁵ (a), pela utilização de agentes de cruzamento intercadeia²⁶ (b), por camadas auto-organizadas (c), imobilização em membrana bilipídica (d) e por aprisionamento em matrizes poliméricas^{5, 27} (e).

Figura 5 - Representação da imobilização enzimática em suporte sólido. **a)** adsorção física, **b)** reação de cruzamento intercadeia, **c)** em monocamadas auto-organizadas (SAMs), **d)** membrana bilipídica e **e)** aprisionamento em matriz polimérica.

Fonte: Autoria Própria

A adsorção física da enzima no eletrodo normalmente é realizada pela simples imersão do eletrodo na solução da enzima ou pelo gotejamento de uma solução da enzima sobre a superfície do eletrodo. Já a utilização de agentes de cruzamento intercadeia utiliza de espécies químicas reativas presentes na superfície do eletrodo como pela utilização de glutaraldeído, ou pela utilização de carbodiimida. A utilização de monocamadas auto-organizadas de moléculas orgânicas também é investigada na imobilização enzimática. Nesse caso, a modificação de uma superfície sólida com moléculas orgânicas auto-organizadas é feita anteriormente a imobilização da enzima no eletrodo, com exposição da solução da enzima por imersão na solução ou pelo gotejamento sobre a superfície. A modificação da superfície com camadas bilipídicas também faz parte da estratégia de imobilização de eletrodos que possuem uma extremidade polar e a outra apolar, que se auto organizam na interface água/ar. Um

exemplo é a transferência dessas camadas bilipídicas para substratos sólidos pela técnica desenvolvida por Langmuir e Blodgett. Outra metodologia utilizada é o aprisionamento de enzimas redox em matrizes poliméricas pelo preparo da solução do polímero orgânico com posterior dispersão das enzimas em solução. Como no caso da imobilização por adsorção física, a imersão do substrato na solução ou o gotejamento da solução polímero/enzima é feito sobre a superfície do eletrodo. Uma discussão detalhada a respeito das estratégias adotadas para imobilização de enzimas em superfícies de eletrodos também foi apresentada por Katz e Willner¹³ a fim de investigar as melhores estratégias em imobilização para aplicação em bioeletrônica, como o controle de grupos funcionais em superfícies sólidas.

1.1.4 Eletrodos de Carbono Funcionalizados

A funcionalização do carbono melhora as propriedades mecânicas de materiais, o que é interessante em aplicações tecnológicas²⁸. As estratégias adotadas para a modificação de superfícies de carbono podem ser oxidativas ou redutivas sendo que a presença de grupos funcionais podem estar presentes de forma não-covalente ou covalente na superfície²⁹. Uma estratégia interessante do ponto de vista de funcionalização de eletrodos é a utilização da reação com íons diazônio. Essa estratégia de funcionalização é simples e versátil uma vez que uma grande quantidade de compostos pode ser, a princípio, utilizados na obtenção de eletrodos com as características químicas desejadas e com alta estabilidade³⁰.

O íon diazônio contém o grupo N_2^+ e sua dissociação ocorre devido à sua decomposição produzir N_2 molecular^{31, 32}. Quando aminas primárias reagem com o $NaNO_2$ em meio ácido ocorre a formação de um íon de diazônio no qual o primeiro estágio da reação é a formação das espécies reativas do tipo NO^+ . Então, essas espécies participam de uma reação via mecanismo de substituição nucleofílica do tipo $SN1$. Se R é um grupo alquila o sal de diazônio formado é muito instável e imediatamente perde a molécula de N_2 formando o carbocátion planar. Por outro lado, se R é um grupo arila o carbocátion é muito menos estável tornando a perda da molécula de N_2 menos favorável. Em temperatura ambiente, o íon de diazônio formado na reação decompõe em compostos fenólicos, mas em temperaturas de tipicamente 0 - 5° C pode reagir com outros nucleófilos por meio de uma reação controlada. Uma vez que esses tipos de

reações são favoráveis e podem ser controladas em baixas temperaturas³³, a utilização desses intermediários reativos são atrativos do ponto de vista de modificação de superfícies eletródicas, como representado pela figura 6³⁴.

Figura 6 – Reação de formação do íon de diazônio. Após a reação, N₂ molecular é formado e a superfície é modificada covalentemente com o grupamento arila.

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

A reação de formação do íon de diazônio é feita a partir da reação com NaNO₂ em meio ácido. Assim, ocorre a formação do íon de diazônio que posteriormente pode ser ligado a superfície do eletrodo via formação de um radical, liberando a molécula de N₂. Estudos pioneiros envolvendo a funcionalização de superfícies de carbono vítreo foram estudados por Sevéant e colaboradores³⁵ pela utilização de radicais 4-nitrofenil e, uma vez que a funcionalização do eletrodo é alcançada, a imobilização de biomoléculas pode ser realizada. Cita-se a estratégia adotada por Blanford e colaboradores³¹ que utilizaram a reação de aminoantracenos e aminocrisenos para imobilização da enzima lacase em eletrodos de grafite pirolítico. Pellissier e colaboradores³⁶ mostraram um estudo sobre a estabilidade de bioeletrodos enzimáticos de glicose oxidase pela modificação eletroquímica prévia da superfície de eletrodos de carbono em uma solução contendo íons diazônio. Nesse caso, a estratégia adotada permitiu que a corrente e o potencial de eletrodo fossem monitorados durante seis semanas, mostrando que a estratégia de funcionalização de eletrodos com íon diazônio é interessante do ponto de vista de obtenção de bioeletrodos.

A utilização da modificação de eletrodos via reação com o íon diazônio também permite o controle e especificidade dos grupos funcionais covalentemente ligados à superfície eletródica. Outra estratégia muito interessante do ponto de vista prático é o uso do cruzamento intercadeia (ou *cross-linking*) que torna possível o controle da funcionalidade do eletrodo para reação com uma molécula em particular, ou grupos específicos presentes em moléculas biológicas, como em DNA e enzimas, como a reação com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) ou sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS), de acordo com o mecanismo já proposto na literatura³⁷. Na figura 7, tem-se a reação de acoplamento utilizando-se EDC/NHS.

Figura 7 – Representação esquemática do a) grafeno funcionalizado com grupos ($-\text{COOH}$) e após reação com b) EDC e c) NHS.

Fonte: Modificado de HERMANSON, G. **Bioconjugated techniques**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008, 1146 p.

Como representado na figura 7a, a superfície do eletrodo é funcionalizada com os grupos ($-\text{COOH}$). O EDC é um agente de cruzamento intercadeia capaz de acoplar grupamentos fosfato ou carboxílicos a aminas primárias. A figura 7b mostra a formação desses ésteres reativos na superfície após a reação com os grupos carboxílicos. Após o

acoplamento há a formação de ligações do tipo amida sendo que o excesso de reagente pode facilmente ser removido por lavagem, diálise ou gel-filtração. Embora esta reação possa ser realizada em água sem a necessidade de solventes orgânicos, a reação deve proceder rapidamente uma vez que os grupos éster podem ser hidrolisados facilmente. Para isto, uma estratégia adotada é o uso do NHS ou sulfo-NHS com o objetivo de aumentar a estabilidade do éster reativo, como representado na figura 7c. A grande vantagem também está na possibilidade de alto controle das características de superfície de eletrodos do tipo 2D, como por exemplo aqueles utilizados em dispositivos miniaturizados ou em um único chip.

1.2 Dispositivos *on-Chip*

A obtenção de dispositivos portáteis é muito interessante do ponto de vista científico e tecnológico³⁸⁻⁴⁰. O desenvolvimento de estratégias que permitam a obtenção de sistemas miniaturizados, como os dispositivos em um único chip, vem acompanhados da necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias^{41, 42}. Considerando a utilização de novas tecnologias aplicadas na miniaturização de dispositivos, o custo e a simplicidade são algumas das características almejadas. Destaque tem sido dado nos últimos anos para técnicas de detecção e biodetecção em um único chip, e de estudos em micro^{43, 44} e nanofluídica^{45, 46}, nos chamados laboratórios em um chip (dispositivos *lab-on-a-chip*). Dispositivos miniaturizados ganharam destaque também na obtenção de BCs, como em dispositivos implantáveis^{47, 48}. Para isso, o carbono tem recebido grande destaque como eletrodo ou como componente de eletrodos modificados, principalmente em sistemas de conversão de energia *in vivo*.

Estudos de biocélulas miniaturizadas tem sido destaque nos últimos anos⁴⁹⁻⁵². O grupo de Serge Cosnier⁵³ foi o pioneiro no estudo de biocélulas implantáveis do tipo glicose/O₂ em mamíferos. Em um trabalho recente, nosso grupo de pesquisa propôs o estudo de uma biocélula implantável operando em um único chip pela disposição de fibras flexíveis de carbono em um cateter de polipropileno. Para isso, as fibras de carbono foram modificadas com o mediador redox vermelho neutro contendo a enzima

GOx e, como cátodo, as FFC foram modificadas com nanopartículas de platina estabilizadas no polieletrólito poliamidoamina. Com isso, os bioânodo e o cátodo foram disponibilizados em um cateter de polipropileno sendo que a micro BC foi implantada na veia jugular de um rato (*Rattus norvegicus*)⁵⁴. A idéia foi o uso desta BC implantável para a conversão de energia pelo uso da glicose presente no fluido sanguíneo do rato, o que reflete a importância do desenvolvimento de novas plataformas miniaturizadas para o desenvolvimento de BCs enzimáticas.

Na última década, materiais do tipo 2D tem sido utilizadas no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos. Considerando-se o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, o grafeno tem permitido um grande avanço devido, principalmente, as suas propriedades eletrônicas e sua espessura, que são muito interessantes do ponto de vista de aplicação tecnológica⁵⁵. Também, grande destaque tem sido dado na fabricação de biodispositivos pela utilização de folhas individuais de grafeno⁵⁶.

1.3 Grafeno

De acordo com a definição da IUPAC, uma folha de grafeno é uma camada única de carbono da estrutura do grafite^{57, 58}. Na folha de grafeno cada átomo de carbono está covalentemente ligado a outros três átomos de carbono em uma rede hexagonal formando um ângulo de 120° e com comprimento de ligação 1,42 Å entre cada átomo⁵⁹. Os átomos de carbono no grafeno apresentam quatro elétrons de valência, caracterizando ligações do tipo π . Embora inicialmente discutido em alguns estudos como sendo improvável de ser obtido, o isolamento da folha de grafeno data do ano de 2004⁶⁰. Em 2007⁶¹, A. K. Geim e K. Novoselov mostraram o estudo de uma única folha de grafeno. De acordo com os autores, a estrutura eletrônica do grafeno “evolui” para a estrutura eletrônica do grafite com um número de dez camadas e a distinção entre as duas nomenclaturas pode ser definida de acordo com as propriedades observadas. Como sendo a base para a obtenção de dispositivos de carbono do tipo 2D, um grande destaque ainda tem sido dado à obtenção de folhas individuais de grafeno, visto que a

qualidade com que esse material é obtido é de extrema relevância em diversos estudos principalmente em eletroquímica.

1.3.1 Obtenção do Grafeno

A primeira metodologia para obtenção do grafeno consistiu na utilização de uma fita adesiva⁶⁰. Essa consiste na esfoliação mecânica gradual pelo contato do grafite pirolítico na fita adesiva de forma que as camadas de carbono são destacadas até a obtenção de uma folha de grafeno. Então, a fita é imersa em um solvente orgânico, como a acetona, onde o grafeno é encontrado na interface solvente/ar e é transferido para um substrato sólido, com subsequente lavagem com água e isopropanol. Embora seja o primeiro procedimento utilizado, a folha pode não ser obtida facilmente, uma vez que o procedimento de esfoliação mecânica pode levar a sua quebra, o que dificulta aplicações em grande escala. Outras metodologias desenvolvidas para a obtenção de grafeno com áreas maiores são relativamente recentes, como a síntese via rota química em substratos de carbetto de silício (SiC)^{62, 63}. No entanto, é almejada a utilização de rotas sintéticas químicas alternativas nas quais substratos não específicos são utilizados para a obtenção de grafeno.

O uso da deposição por vapor químico ou CVD (*carbon vapor deposition*) para obtenção de folhas de grafeno (grafeno CVD) é utilizada para a obtenção de áreas maiores depositadas sobre o substrato metálico. Entretanto, avanços são necessários uma vez que a transferência da folha para substratos alternativos como vidro, quartzo, substratos isolantes transparentes, como polímeros, e também substratos de silício é almejada⁶⁴. Com isso, dispositivos eletrônicos podem ser obtidos de modo que algumas características sejam necessárias como, por exemplo, a transparência do dispositivo⁶⁵. Outra metodologia que utiliza metais de transição como catalisadores como Ni⁶⁶, Cu⁶⁷, Co⁶⁸, Pt⁶⁹, Ir⁷⁰ e Ru⁷¹ são bem conhecidos e tem ganhado destaque na obtenção de folhas de grafeno com grandes áreas. A escolha de Cu ou Ni para obtenção do grafeno se resume no baixo custo quando comparado aos outros metais. No entanto, a solubilidade do carbono em Ni é maior quando comparada ao Cu, o que dificulta a transferência para outros substratos e obtenção de folhas de grafeno maiores⁷².

O crescimento da folha ocorre pela exposição da folha do metal catalisador policristalino sob fluxo de uma mistura gasosa de gás hidrogênio e outro gás precursor a baixa pressão, como, por exemplo, o metano, em temperaturas da ordem de 900-1000°C. Durante a exposição do metal no fluxo de gás H_2 e CH_4 ocorre a chamada precipitação do carbono na forma da folha de grafeno quando a amostra é resfriada, formando uma solução sólida cobre/carbono devido à solubilidade do carbono em metal ser dependente da temperatura. Li e colaboradores⁷² descreveram o mecanismo de crescimento da folha de grafeno em cobre baseado na decomposição do metano, como esquematizado na figura 8. Uma vez que a superfície é completamente recoberta com átomos de carbono o crescimento diminui em função do número de sítios catalíticos de cobre para a decomposição do gás precursor, sendo o processo denominado auto-limitante e direcionado pela adsorção do gás na superfície. A vantagem da utilização desta metodologia é a possibilidade de transferência do grafeno para outros substratos de interesse.

Figura 8 – Representação esquemática do processo de adsorção de CH_4 na folha de Cu e difusão para formação das folhas de grafeno, como proposto por Li e colaboradores⁷².

Fonte: Adaptado de LI, X. S.; CAI, W. W.; COLOMBO, L.; RUOFF, R. S., Evolution of Graphene Growth on Ni and Cu by Carbon Isotope Labeling. **Nano Letters**, v.9, n.12, p. 4268-4272, 2009.

1.3.2 Transferência do Grafeno CVD para Substratos Sólidos

Apenas recentemente a transferência fidedigna do grafeno para alguns substratos arbitrários foi mostrada por Song e colaboradores⁷³, o que inclui substratos com baixa

rigidez como superfícies poliméricas. O estudo faz uso da deposição de uma camada polimérica de auto-soltura (*self-releasing*) como o poli(metil metacrilato)(PMMA), poli(estireno)(PE) ou o poli(isobutileno)(PIB) depositados sobre o grafeno CVD. Sobre a camada do polímero uma estampa polimérica, como o poli(dimetil siloxano)(PDMS), é depositada de forma que a camada de polímero previne a contaminação do grafeno pelo material da estampa. Ainda, a escolha do polímero é tal que a força de adesão entre a camada do polímero e a folha de grafeno é menor do que a força de adesão entre o grafeno e o substrato sólido de interesse⁷³, o que permite a transferência do grafeno sem a ruptura ou quebra, ao mesmo tempo em que permite o controle da área de grafeno transferida para o substrato sólido. O uso da estampa tem como objetivo de facilitar a manipulação do grafeno após a remoção do substrato catalisador metálico uma vez que a flexão durante o procedimento de transferência do (grafeno/polímero) pode ocasionar a ruptura da folha.

A obtenção de folhas de grafeno obtidas por CVD permite que a remoção do catalisador metálico seja feita por rota úmida (do inglês *wet-etching*)⁷⁴. Após a deposição da matriz polimérica, o metal é removido por uma solução de lavagem que pode ser formada por uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou cloreto de ferro(III) (FeCl₃) e H₂O₂. Com isso, o metal é removido pela solução de lavagem e transferido manualmente para um substrato sólido de interesse com posterior remoção do polímero com um solvente orgânico apropriado, como a acetona ou o tolueno. Assim, a folha de grafeno é mantida em substratos como vidro, Si/SiO₂ ou substratos de polímeros flexíveis via interação de van der Waals⁶⁴. A vantagem em se utilizar substratos de Si/SiO₂ se resume no fato da folha de grafeno suportar procedimentos de tratamentos ácidos com eficácia, mantendo a folha aderida ao substrato sólido. Apesar de avanços na obtenção e manipulação de folhas de grafeno, algumas dificuldades ainda são encontradas, uma vez que o grafeno CVD é obtido utilizando um metal como catalisador, o que pode dificultar sua utilização em dispositivos eletroquímicos devido a contaminação.

1.3.3 Efeito de Impurezas nas Propriedades do Grafeno

Um dos aspectos fundamentais na utilização do grafeno é assegurar que a área ativa está livre, ou pelo menos sob influência minoritária de impurezas, como resíduos de polímeros e metais/óxidos de metais. A obtenção de grafeno CVD permite a obtenção de grandes áreas de grafeno. No entanto, impurezas remanescentes no grafeno oriundas dessa metodologia são comuns de serem observadas, como resíduos de polímeros da transferência do grafeno e partículas remanescentes do suporte metálico.

A presença de resíduos de polímero após o procedimento de obtenção do grafeno CVD já é conhecida uma vez que afeta de maneira significativa suas propriedades eletrônicas⁷⁵. O papel do recozimento (*annealing*) ou uma etapa de aquecimento adicional após a transferência da folha de grafeno no substrato de interesse sob fluxo de argônio/nitrogênio é o de auxiliar na vaporização de impurezas orgânicas remanescentes, uma vez que elevadas temperaturas (400 a 600° C) são utilizadas⁷⁶. Além disso, o efeito de impurezas nas propriedades eletroquímicas de materiais derivados de carbono já é conhecida desde a última década⁷⁷. Grande destaque tem sido dado na literatura para a presença de materiais metálicos oriundos do processo de obtenção de nanomateriais por CVD, como os nanotubos de carbono.

O primeiro estudo que mostrou experimentalmente a evidencia de impurezas metálicas nos nanomateriais foi o grupo de Richard Compton⁷⁸. Nesse trabalho, os pesquisadores demonstraram a contribuição eletrocatalítica de redução de peróxido de hidrogênio e outros compostos⁷⁹⁻⁸¹ pela presença de óxido de ferro(III) oriundo da síntese de nanotubos de carbono por CVD. Anteriormente, acreditava-se que esses nanomateriais apresentassem propriedades eletrocatalíticas devido ao defeito inerente de sua estrutura, como a presença de “efeitos de borda” do nanomaterial. Embora algumas metodologias fossem reportadas como alternativas para a minimização dos efeitos dessa impurezas pela sua remoção em meio fortemente ácido, a presença de traços destas impurezas ainda se faziam presentes e influenciaram as propriedades eletroquímicas, como na redução de oxigênio molecular⁸². A presença de impurezas em amostras de grafeno também é oriunda do processo CVD⁷⁷.

O efeito de impurezas nas propriedades eletrocatalíticas de grafeno obtido por esfoliação mecânica do grafite pirolítico foi mostrado por Pumera e colaboradores⁸³. A base para este argumento vem do fato de que grafeno obtido de fontes de grafite apresentam traços de metais contaminantes que são regiões ativas do eletrodo para que determinados processos eletrocatalíticos ocorram⁸³. Como o grafeno também é obtido pelo uso de substratos metálicos como o cobre, a presença de impurezas também é devido ao seu processo de obtenção. Já que para a obtenção de uma única folha de grafeno utiliza-se um suporte metálico, como o cobre, é comumente utilizado o procedimento rigoroso de lavagem em meio ácido para sua remoção. Embora seja considerado que o procedimento seja eficaz na remoção do de remoção do suporte metálico em menos de dez minutos de lavagem⁷⁷, é possível mostrar claramente a presença de cobre remanescente, por exemplo, pelo simples estudo eletroquímico das folhas de grafeno após a transferência para um substrato sólido⁸⁴. Esse é um passo crucial para o desenvolvimento de dispositivos em eletroquímica e também em biodispositivos. Também, a obtenção de biodispositivos é diretamente dependente da minimização desses traços de impurezas metálicas, como será abordado detalhadamente na tese.

2.0 Objetivos

O objetivo desta tese de doutorado foi a obtenção de uma BC enzimática de glicose/O₂ com a espessura de uma única folha de grafeno, visando a obtenção de altas densidades de corrente e potência volumétrica (Watts por cm³), operando em chips de Si/SiO₂. Dado a dificuldade de obtenção de biodispositivos de carbono do tipo 2D devido a propriedades de interface, o desenvolvimento de uma metodologia para a transferência do grafeno em chips de Si/SiO₂ e para a remoção das impurezas de cobre remanescentes na folha de grafeno foram necessárias. A razão para tal foi o controle da imobilização das enzimas GDh e BOx nas folhas de grafeno CVD, sem a presença de resíduos de metal na interface eletrodo/eletrólito, para os estudos de BC enzimática *on-chip*.

3.0 Parte experimental

3.1 Materiais

As vidrarias utilizadas nos procedimentos experimentais passaram por um processo de limpeza, utilizando uma solução de (H₂SO₄:H₂O₂ na proporção 3:1) e água ultrapura (sistema Milli-Q, Milipore). Após este procedimento, todas as soluções empregadas neste trabalho foram preparadas usando água ultrapura, cuja resistividade é de 18 MΩ cm⁻¹ a 25° C. Os materiais e reagentes empregados encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes.

Reagente	Marca
Ácido Clorídrico 36%	Roth
Ácido Sulfúrico 97-99%	Roth
Ácido Nítrico 65%	Roth
Peróxido de Hidrogênio 30%	Roth
Cloreto de potássio	Sigma-Aldrich®
Fosfato de potássio monobásico	Sigma-Aldrich®
Fosfato de potássio dibásico	Sigma-Aldrich®
Tolueno	Sigma-Aldrich®
Isopropanol	Sigma-Aldrich®
Poli(estireno)(M=10000)	Sigma-Aldrich®
Grafeno em folha de cobre	Graphene Supermarket/Graphenea/Göttingen
Glicose desidrogenase from <i>Pseudomonas sp.</i>	Sigma-Aldrich®
Bilirrubina oxidase from <i>Myrothecium verrucaria</i>	Sigma-Aldrich®

Para a realização dos estudos com os eletrodos de grafeno CVD, três tipos de amostras foram utilizadas: grafeno CVD obtido da empresa Graphene Supermarket, Graphenea e grafeno CVD sintetizado no grupo do professor Alec M. Wodtke do Instituto Max Planck for Biophysical Chemistry⁸⁵. O objetivo foi a verificação da influência de tipos diferentes de amostras de grafeno e suas propriedades eletroquímicas antes do preparo dos bioeletrodos.

4.0 Equipamentos

4.1 Eletroquímica

Para o estudo eletroquímico utilizou-se uma cela eletroquímica com capacidade de 15 mL em um sistema convencional de três eletrodos: o eletrodo de Si/SiO₂/grafeno como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl como eletrodo de referência e um fio de platina com comprimento de 1,0 cm e diâmetro de 0,5 mm. O potenciostato utilizado foi o Compactstat Ivium. Em alguns experimentos, eletrodos de fibras de carbono flexíveis (FCF) foram utilizados com o objetivo de verificar a metodologia de remoção do Cu dos eletrodos de grafeno.

4.2 Microscopia de Força Atômica

As imagens de AFM foram obtidas utilizando-se o equipamento Digital Instruments Veeco Dimension III no modo contato, varredura de 20 $\mu\text{m s}^{-1}$, área de 15 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, resolução máxima de 75 μm^2 e mínima de 50 nm^2 , frequência de ressonância de 40Hz e passo de ponteira de 0,5 linhas por segundo. As ponteiras de AFM foram obtidas da empresa Veeco. As imagens foram tratadas pelo uso do software Gwyddion.

4.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman das amostras de grafeno em Si/SiO₂ forma obtidas utilizando-se o equipamento NT-MDT NTEGRA system, com laser de comprimento de onda de 632 nm e potência de 2,7 mW. O sistema é equipado com um monocromador de 520 mm e grade de 600l/mm. O tempo de aquisição foi de 5 segundos.

4.4 Microscopia Óptica

As imagens ópticas das folhas de grafeno CVD previamente transferidas para o substrato de Si/SiO₂ foram obtidas utilizando-se o microscópio LEICA M680. O objetivo foi avaliar a morfologia das folhas de grafeno transferidas antes dos experimentos eletroquímicos.

5.0 Preparo dos Biodispositivos

5.1 Transferência do Grafeno CVD para o Chip de Si/SiO₂

Os substratos de Si/SiO₂ com dimensões de 1,3 cm x 0,5 cm foram preparados pelo depósito de um contato elétrico de Ti/Pt (espessuras de 10 nm / 20 nm) em uma câmara de alto vácuo utilizando-se um feixe de elétrons de alta energia com voltagem de 2-10 kV em uma câmara de baixo vácuo (tipicamente de 10⁻³ a 10⁻⁵ Torr) em temperaturas da ordem de 250° C, de forma que os substratos foram recobertos com papel de forma a delimitar a área na qual o contato elétrico foi depositado. Os substratos de Si/SiO₂ (SiO₂ com espessura de 300 nm) foram previamente limpos em uma solução de H₂SO₄:H₂O₂ (3:1) pelo tempo de 10 a 30 minutos e lavada com água ultrapura e isopropanol antes da transferência da folha de grafeno. Para a obtenção dos eletrodos de grafeno CVD, uma folha de cobre de aproximadamente 20,3 x 20,3 cm com grafeno depositado em ambos os lados (grafeno/Cu/grafeno). A primeira etapa foi realizada pelo preparo da folha com o polímero PE.

Os eletrodos foram obtidos pela deposição do polímero PE (5 mg mL⁻¹ em tolueno) gota a gota com auxílio de uma micropipeta de 200 µL de forma que toda a folha de cobre/grafeno fosse coberta. A configuração final foi Cu/grafeno/PE. A folha Cu/grafeno/PE foi então mantida em estufa a temperatura de 75° C por 10 minutos para evaporação do solvente. Após a deposição do PE, a folha Cu/grafeno/PE foi cortada manualmente com uma tesoura em pedaços de 0,4cm x 0,4cm. De acordo com a metodologia de transferência de folhas de grafeno já reportada⁷³, uma estampa de poli(dimetil siloxano)(PDMS) foi colocada sobre a folha de Cu/grafeno/PE com o

objetivo de facilitar a transferência manual para a solução de lavagem. No entanto, a estampa de PDMS não foi utilizada nesse trabalho como forma de evitar quebras no grafeno CVD devido à estampa ser colocada manualmente sobre a folha de Cu/grafeno/PE. Após a secagem do PE, uma solução aquosa de HCl e H_2O_2 foi preparada para a remoção da folha de cobre do grafeno. A figura 9 mostra a representação esquemática do procedimento de remoção do cobre da placa grafeno/PE.

Figura 9. Representação esquemática do procedimento de remoção do cobre (I), com posterior realização do procedimento de lavagem adicional (II a IV).

Fonte: Autoria própria

A remoção do cobre da folha de grafeno foi realizada pelo preparo de solução aquosa contendo $1,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl} + 0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ em tubo falcon com capacidade total de 50 mL. Essa é a solução de lavagem convencional para remoção de cobre do grafeno, e será descrita no texto por $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2$. Com auxílio de um sistema de homogeneização automático, 10 mL da solução de $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2$ foram transferidas para cada uma das placas de petri onde as folhas de Cu/grafeno/PE foram colocadas utilizando-se uma pinça metálica, de forma que a pinça estivesse em contato somente com uma das extremidades da folha. Com isso, a folha de cobre foi removida de quatro amostras de grafeno por vez, com auxílio de um sistema de homogeneização. A rotação do sistema foi de 58 rpm e a lavagem foi realizada por ao menos 15 minutos (I). Assim, o grafeno/PE foi transferido manualmente para outro sistema de lavagem com auxílio de uma lamina de vidro nas dimensões de 10,0 cm x 5,0 cm. O sistema de lavagem foi formado por três cubas de vidro sem tampa com capacidade de 150 mL onde duas das três cubas foram preenchidas com água ultrapura (II e IV) e uma com solução aquosa de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (III). A folha de grafeno/PE foi transferida para a primeira cuba de

vidro com água, mantida por 30 segundos (II), e transferida para a segunda cuba de vidro contendo a solução aquosa de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ por um minuto (III). Então, a lavagem adicional foi feita em uma terceira cuba de vidro contendo água ultrapura e mantida por mais 30 segundos (IV), onde se fez a transferência do grafeno/PE para o substrato de Si/SiO_2 . Para isso, o ajuste da placa grafeno/PE sobre o contato elétrico foi feito manualmente. O posicionamento da placa de grafeno/PE foi feito com auxílio de uma ponteira de micropipeta sobre o contato elétrico e mantidos em estufa a 95°C por dez minutos. Este procedimento teve por objetivo a fixação do grafeno/PE no substrato, uma vez que a tentativa de remoção direta do PE pela imersão no solvente tolueno provoca a lixiviação do grafeno/PE do substrato de Si/SiO_2 . Após o tempo de secagem, o PE foi removido pela imersão do eletrodo por cinco minutos em tolueno com agitação manual da cuba de vidro. A configuração final foi $\text{Si/SiO}_2/\text{grafeno}$. O procedimento de recozimento foi feito a 585°C em atmosfera de argônio por 40 segundos com o objetivo de melhorar o contato entre o grafeno e o substrato. Então, o contato elétrico dos eletrodos foi delimitado com resina epóxi de forma que somente a área do eletrodo de grafeno fosse exposta na solução eletrolítica nos estudos eletroquímicos. Após todo o procedimento de transferência do grafeno CVD para o Si/SiO_2 , a imagem óptica do eletrodo foi feita com o objetivo de verificar a característica estrutural e a integridade da folha transferida antes dos estudos eletroquímicos, como mostrado na figura 10.

Figura 10 – **a)** Fotografia do chip de $\text{Si/SiO}_2/\text{grafeno}$. **b)** Imagem óptica do chip de $\text{Si/SiO}_2/\text{grafeno}$ com um aumento de 40x.

A figura 10a mostra a fotografia do eletrodo de $\text{Si/SiO}_2/\text{grafeno}$, e a figura 10b a imagem óptica do eletrodo com aumento de 40x. Nesse caso, observa-se claramente

pela imagem óptica que a folha foi transferida de uma maneira eficaz, como descrito pela metodologia de transferência utilizando-se o polímero PE, sem a presença de imperfeições de grande magnitude como a presença de buracos.

5.2 Deposição de Cobre Sobre Grafeno CVD e FCF

A deposição de cobre sobre o chip de Si/SiO₂/grafeno com dimensões da ordem de 0,5 x 2,0 cm teve como objetivo a avaliação da metodologia de remoção de cobre do grafeno e das FCF. A deposição de cobre foi realizada em uma metalizadora utilizando-se um feixe de elétrons de alta energia com voltagem de 2-10 kV em uma câmara de baixo vácuo (tipicamente de 10⁻³ a 10⁻⁵ Torr) em temperaturas maiores que 250 °C. O feixe de elétrons perpendicular a uma fonte de cobre é responsável pela evaporação sendo que o chip de Si/SiO₂/grafeno é colocado em uma calota circular que garante a distribuição homogênea do filme metálico sobre a amostra. A câmara de vácuo cria uma “nuvem” que condensa sobre a amostra onde ocorre o crescimento do filme. A espessura do filme foi controlada utilizando-se um oscilador elétrico com velocidade de deposição de 2 Å s⁻¹ ou menos, resultando em um filme de cobre depositado de 100 Å de espessura.

5.3 Remoção Eletroquímica de Cobre do Grafeno (*e-etching*)

Para a remoção eletroquímica do cobre remanescente dos eletrodos de grafeno CVD, utilizou-se uma solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹. A escolha do HCl para a remoção do cobre foi feita com base em uma maior estabilidade das folhas de grafeno uma vez que a varredura cíclica em outras soluções aquosas ácida, como H₂SO₄ e HNO₃, levou a observação da formação de danos na estrutura do grafeno, como buracos e quebras adicionais⁸². Ainda, a utilização de íons cloreto em solução favorece o processo de corrosão do cobre pela formação de espécies solúveis, como será abordado em detalhes nos resultados e discussões. A eletrodissolução (*e-etching*) dos traços de cobre/óxidos de cobre presentes no grafeno CVD foi feita pela varredura cíclica no intervalo de potenciais -1,0 V a +1,0 V (vs. Ag/AgCl). Após esse procedimento, os

eletrodos foram lavados pelo menos três vezes com água ultrapura e secos a temperatura ambiente ($T = 25^\circ \text{C}$).

5.4 Obtenção do Diagrama de Pourbaix Simplificado para o Sistema Cu:H₂O

O diagrama de Pourbaix para o sistema Cu:H₂O foi obtido com o objetivo de identificar as reações envolvidas na eletroquímica do grafeno CVD com traços remanescentes de cobre do processo de lavagem química. Para isso, as reações no equilíbrio foram utilizadas como uma aproximação na identificação das espécies de cobre. É conhecido que a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG^0) esta correlacionada com a variação do potencial padrão de uma determinada espécie de acordo com (3).

$$(\Delta \bar{G}_f^0 = -nFE^0) \quad (3)$$

onde ΔG^0 é a variação de energia livre de Gibbs padrão de reação (298,15 K, 1 atm de pressão), n o número de elétrons envolvidos na reação, F a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹) e E^0 o potencial padrão de reação no equilíbrio. A tabela 2 mostra os valores de energia livre padrões de formação ($\Delta \bar{G}_f^0$) para as espécies de cobre.

Tabela 2 – Energia livre padrão de formação para as espécies de cobre. ($\Delta \bar{G}_f^0 = -nFE^0$)⁸⁶.

Espécies	Energia livre de formação das espécies (kJ mol ⁻¹)
Cu	0
Cu ₂ O	-146,0
CuO	-129,7
Cu ⁺	49,9
Cu ²⁺	65,5
H ₂ O	-237,1

As equações de (4) a (7) mostram os respectivos potenciais padrões de reação, vs. eletrodo padrão de hidrogênio (*Standard hydrogen electrode*, SHE) para cada reação de formação no equilíbrio.

Para a obtenção dos respectivos potenciais de reação, as reações eletroquímicas foram equacionadas utilizando-se a equação de Nernst, como mostrado em (8).

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln(Q) \quad (8)$$

onde Q é o quociente entre as espécies oxidadas e reduzidas ($[a_{\text{Ox}}]/a_{\text{Red}}$), R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura em Kelvin. As equações (9) a (12) foram obtidas de acordo com as reações no equilíbrio de (4) a (7), respectivamente.

$$E = E^0 + \frac{0,059}{2} \log(a_{\text{H}^+})^2 \quad (9)$$

$$E = E^0 + \frac{0,059}{2} \log\left(\frac{a_{\text{Cu}^{2+}}}{a_{\text{H}^+}}\right)^2 \quad (10)$$

$$E = E^0 + \frac{0,059}{2} \log(a_{\text{H}^+})^2 \quad (11)$$

$$E = E^0 + \frac{0,059}{2} \log \left(\frac{a_{Cu^{2+}}}{[a_{H^{2+}}]^2} \right) \quad (12)$$

Para a estimativa do diagrama de Pourbaix, a atividade iônica de 10^{-4} foi assumida com o objetivo de obter uma aproximação com os picos de oxidação observados na voltametria cíclica para o eletrodo de Cu/grafeno e Si/SiO₂/grafeno. O gráfico de E vs. pH foi obtido pelo software Origin 8.1® pela utilização das equações (9) a (12), sendo que os valores de potenciais para cada reação foram corrigidos para o meio pH = 7,0, meio eletrolítico onde os experimentos foram realizados, e para o valor correspondente ao eletrodo de referência de Ag/AgCl, utilizando-se a equação $E_{RHE} = E_{Ag/AgCl} + 0,059pH + E^0_{Ag/AgCl}$.

6.0 Preparo dos Bioeletrodos

6.1 Funcionalização dos Eletrodos via Reação com Íon de Diazônio

Após a remoção dos traços de cobre/óxidos de cobre remanescentes do grafeno CVD, o eletrodo foi funcionalizado pela utilização da molécula precursora ácido 4-aminobenzóico via reação com íon de diazônio. O objetivo foi a funcionalização do eletrodo de grafeno CVD com os grupos (-COOH). Em um frasco com tampa e capacidade de 10 mL, 5 mL de uma solução aquosa do ácido 4-aminobenzóico com concentração de 20 mmol L⁻¹ foi preparada em meio de H₂SO₄ 20 mmol L⁻¹. Em outro frasco com tampa e capacidade de 10 mL, uma solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO₂) com concentração de 8 mmol L⁻¹ foi preparada. Após o preparo das soluções, ambas foram mantidas em banho de gelo até temperatura de 7° C. A temperatura foi controlada com termômetro de mercúrio (110° C). Após alcançar essa temperatura, a solução contendo NaNO₂ 8 mmol L⁻¹ foi adicionada a solução ácida de ácido 4-aminobenzóico 20 mmol L⁻¹, e mantida sob agitação mecânica com barra magnética por 20 a 25 minutos. Após esse tempo, a solução apresentou coloração amarelada, um indicativo da formação do sal de diazônio em solução. Para a funcionalização do

eletrodo de grafeno CVD, utilizou-se a voltametria cíclica no intervalo de potenciais de 0 V a -0,60 V (vs. Ag/AgCl) por três ciclos voltamétricos.

6.2 Bioânodo

Após a reação de funcionalização do grafeno CVD a partir da reação com íon de diazônio, a reação de acoplamento com EDC/NHS foi realizada como segue³⁷: (i) soluções aquosas de NHS com concentração de 0,4 mol L⁻¹ pH = 6,0 0,1 mol L⁻¹ e EDC 0,2 mol L⁻¹ com concentração de 0,4 mol L⁻¹ foram preparadas em tampão fosfato de sódio pH = 6,0 0,1 mol L⁻¹ e; (ii) uma mistura das duas soluções na proporção 1:2:1 foi feita e gotejada com auxílio de uma micropipeta de 200 µL sobre o chip Si/SiO₂/grafeno previamente modificado eletroquimicamente com o sal de diazônio. Após um período de 15 a 30 minutos, o eletrodo foi lavado em tampão fosfato de sódio pH = 8,0 na concentração 0,1 mol L⁻¹ e, (iii) 20 µL da solução de GDh 5-10 mg mL⁻¹ foi depositada sobre os eletrodo e armazenado em baixa temperatura (7° C) por pelo menos uma hora em uma placa de petri antes dos estudos de bioeletroquímica. Os eletrodos que não foram usados após o tempo de exposição da solução de enzima com o eletrodo de grafeno foram cobertos e armazenados a 7° C.

6.3 Biocátodo

O biocátodo contendo a enzima BOx foi obtido pela mesma metodologia descrita no tópico anterior para a obtenção do bioânodo de GDh. A reação de acoplamento da enzima foi realizada pelo preparo das soluções de EDC 0,2 mol L⁻¹ e NHS 0,2 mol L⁻¹ em pH = 6,0. Após 25 minutos de reação, o eletrodo foi lavado em tampão fosfato de sódio pH = 8,0 e, após esse procedimento, 20 µL da solução da enzima BOx 5-10 mg mL⁻¹ foi depositada sobre os eletrodo e armazenado a 7° C por pelo menos uma hora em uma placa de petri antes dos estudos de bioeletroquímica. O fluxograma da figura 11 mostra toda a etapa experimental descrita anteriormente.

Figura 11 – Fluxograma representativo do procedimento utilizado para a obtenção dos eletrodos de grafeno CVD e posterior transferência em Si/SiO₂ para a obtenção da BC enzimática.

7.0 Resultados

7.1 Estudo Eletroquímico do Grafeno Transferido

Uma das necessidades fundamentais quando se utiliza o grafeno como eletrodos é assegurar que impurezas como metais/óxidos metálicos não tenham influência nos estudos eletroquímicos. De fato, essas impurezas estão presentes no grafeno CVD devido ao metal catalisador utilizado em sua obtenção, como discutido anteriormente. A presença de resíduos de metais influenciam nas propriedades eletroquímicas de materiais de carbono sendo que alguns estudos reportam a utilização de uma solução aquosa de lavagem contendo HCl e cloreto de ferro(III)⁸⁷ para a remoção do suporte metálico do grafeno CVD. No entanto, com o objetivo de evitar uma possível contaminação adicional da folha de grafeno pela utilização de uma solução de lavagem com íons ferro, utilizou-se a solução aquosa de HCl:H₂O₂ para a remoção de cobre/óxidos de cobre do grafeno CVD.

A voltametria linear foi utilizada para avaliar o comportamento eletroquímico das folhas de grafeno. A figura 12a mostra os voltamogramas lineares obtidos das amostras de grafeno transferidos para o substrato de Si/SiO₂ pelo procedimento de lavagem do cobre com solução de HCl:H₂O₂, (linha preta sólida, voltamograma I), folha grafeno/Cu/grafeno como obtida (vermelho pontilhado, voltamograma II) e grafeno transferido para o substrato de Si/SiO₂ com lavagem adicional pela imersão em solução de HCl:H₂O₂ por uma hora adicional (linha azul sólida, voltamograma III). O procedimento de lavagem adicional foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia da etapa de remoção do cobre da folha de grafeno CVD, visto que um tempo maior de exposição da solução de lavagem sobre a amostra também poderia, a princípio, ser utilizado para a remoção do cobre remanescente. O *inset* mostra o zoom da curva em azul e as setas indicam a posição aproximada dos processos de oxidação do cobre (Cu⁰ / Cu⁺ e Cu⁺ / Cu²⁺) em pH = 7,0. A figura 12b mostra o diagrama de Pourbaix simplificado para o sistema Cu:H₂O mostrando o comportamento redox do cobre no intervalo de potenciais utilizado e do pH do meio eletrolítico. A linha vertical tracejada indica o pH = 7,0 utilizado no estudo eletroquímico.

Figura 12 - a) Voltamogramas lineares do (I) grafeno transferido para o substrato de Si/SiO₂ pelo procedimento de lavagem do cobre com solução de HCl : H₂O₂, (II) folha grafeno/cobre/grafeno como obtida e (III) grafeno transferido para o substrato de Si/SiO₂ com imersão adicional em solução de HCl:H₂O₂ por uma hora. *Inset*: Zoom da região da curva III. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹. T = 25° C em condições ambiente. b) Diagrama de Pourbaix simplificado para o sistema Cu : H₂O mostrando o comportamento redox do cobre em função do potencial e do pH do meio eletrolítico.

A voltametria da folha de grafeno/cobre/grafeno (II) é mostrada em comparação com os voltamogramas (I) e (III). Na figura 12a, dois processos de oxidação são observados para as curvas I e II. Para a curva III os processos são observados, porém, com uma menor intensidade de corrente. O zoom da região do voltamograma revela que traços de cobre estão presentes no eletrodo de grafeno, que mostra que mesmo após uma segunda imersão do eletrodo na solução de lavagem pelo período de uma hora não é suficiente para que a remoção do cobre remanescente seja alcançada. Suporte para esta observação foram obtidos do diagrama de Pourbaix simplificado mostrando a relação pH - potencial de equilíbrio do cobre, como mostrado na figura 12b. O diagrama foi obtido pela consideração das espécies em estado sólido: cobre, óxido de cobre (I) e óxido de cobre (II) e; duas espécies em solução aquosa: os íons Cu⁺ e Cu²⁺. As energias livres de formação para todas as espécies são mostradas na tabela 2. Para a estimativa do diagrama, a equação $\text{pH} = -\log(a_{\text{H}^+})$ e a atividade iônica de 10^{-4} foi assumida com o objetivo de obter uma aproximação com os picos de oxidação observados na voltametria cíclica. Em $\text{pH} = 7,0$ é observado claramente dois equilíbrios de reação, (Cu⁰/Cu⁺) $E = 0,01$ V (vs. Ag/AgCl) e (Cu⁺/Cu²⁺) $E = 0,18$ V (vs. Ag/AgCl). Ainda, observa-se um deslocamento dos processos de oxidação quando comparados ao processo observado na folha de cobre para valores negativos de potencial.

A formação das espécies para o sistema considerado é apresentada pelas equações (13) a (16), com os respectivos potenciais padrões de formação, *vs.* Ag/AgCl.

7.2 Eletro-dissolução do Cobre em meio Ácido (*e-etching*)

7.2.1 Estudo por Microscopia Óptica

Com o objetivo de avaliar a eficácia da remoção do cobre da superfície do eletrodo de grafeno CVD em Si/SiO₂ pela metodologia desenvolvida nesse trabalho (*e-etching*), realizou-se dois estudos de remoção eletroquímica de cobre previamente eletrodepositado em meio contendo íons Cl⁻ utilizando-se KCl 0,1 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Realizou-se a eletrodeposição de cobre na superfície do grafeno utilizando-se uma solução de CuSO₄ 0,5 mol L⁻¹ por cronopotenciometria, com corrente de -1 mA por 30 segundos. A figura 13 mostra o eletrodo de Si/SiO₂/grafeno antes (a) e após a eletrodeposição de cobre (b). Assim, a varredura cíclica foi realizada como descrito anteriormente na parte experimental. Para a realização do *e-etching* e remoção de cobre/óxidos de cobre presentes no grafeno, a varredura cíclica foi feita no intervalo de potenciais -1,0 V a +1,0 V (*vs.* Ag/AgCl). As figuras 13c e d mostram a superfície do eletrodo após a varredura em solução aquosa de KCl após 11 ciclos e após 25 ciclos voltamétricos, respectivamente. Já as figuras 13e e f mostram a superfície do eletrodo após a varredura em solução aquosa de HCl após 11 ciclos e após 25 ciclos voltamétricos, respectivamente.

Figura 13 – Imagens de microscopia óptica mostram o eletrodo de grafeno antes (a) e após a eletrodeposição de cobre (b). As figuras mostram a superfície do eletrodo após 11 ciclos (c) e 25 ciclos (d) em meio eletrolítico de KCl 0,1 mol L⁻¹. As figuras mostram a superfície do eletrodo após 11 ciclos (e) e 25 ciclos (f) em meio eletrolítico de HCl 0,1 mol L⁻¹.

É observado que o eletrodo de grafeno é completamente recoberto após a eletrodeposição do cobre, como mostram as figuras 13a e b. Após a eletrodeposição de cobre, a varredura voltamétrica inicialmente realizada em meio eletrolítico de KCl 0,1

mol L⁻¹ mostra que mesmo após 11 ciclos (c) e 25 ciclos (d) a superfície do eletrodo de grafeno ainda permanece com traços de cobre eletrodepositado. Já a varredura em HCl mostra ser uma estratégia mais eficiente na remoção de cobre da folha de grafeno, visto que após 11 ciclos (e) e 25 ciclos (f) a superfície do eletrodo mostrou que o cobre foi removido da superfície do eletrodo de grafeno. Assim, esses resultados mostram que a metodologia de *e-etching* em meio ácido de HCl 0,1 mol L⁻¹ é mais eficaz na remoção eletroquímica do cobre das folhas de grafeno, uma vez que o cobre foi removido da superfície do eletrodo com um menor número de ciclos voltamétricos.

7.2.2 Estudo Eletroquímico de Dissolução do Cobre

O processo de dissolução de metais em meio ácido é bem conhecido na literatura. O estudo da dissolução do cobre em meio eletrolítico contendo íons cloreto (Cl⁻) também é muito estudado, como já mostrado em alguns trabalhos³². Alguns métodos foram utilizados para remover o cobre dos eletrodos de grafeno CVD, como pela utilização dos ácidos H₂SO₄ e HNO₃. Porém, somente a metodologia utilizada para remoção do cobre remanescente das folhas de grafeno em meio HCl 0,1 mol L⁻¹ se mostrou eficaz, como também mostrado por microscopia óptica em outros meios contendo íons Cl⁻ (figura 13).

A remoção do cobre dos eletrodos formados por folhas únicas de grafeno via eletroquímica foi feita pelo monitoramento da supressão dos picos associados às espécies de cobre com o número de ciclos voltamétricos. A remoção do cobre foi realizada em uma solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹ em condições ambientes (T = 25° C). Para isso, utilizou-se como referência um diagrama mais elaborado para o cobre, uma vez que diagrama de Pourbaix esta relacionado com o equilíbrio Cu : Cl⁻ : H₂O⁸⁸, como mostrado na figura 14.

Figura 14 – Diagrama de Pourbaix para o equilíbrio Cu : Cl⁻ : H₂O. T = 25° C, condições ambientes.

Fonte: Tromans, D.; Sun, R. H., Anodic Polarization Behavior of Copper in Aqueous Chloride Benzotriazole Solutions. **Journal of Electrochemical Society**, v.138, n.11, 3235-3244, 1991.

Com o objetivo de superar esse problema, a metodologia utilizada de eletrodissolução (ou *e-etching*) do cobre/óxidos de cobre foram realizadas em meio aquoso ácido. Em concentrações de HCl 0,1 mol L⁻¹, a dissolução anódica do cobre ocorre com formação de cloreto de cobre(I) que é subsequentemente convertido a CuCl₂⁻_(aq)⁸⁹. O equilíbrio da dissolução do cobre em solução aquosa ácida contendo íons Cl⁻ é representado pelas equações (17) e (18) como segue.

onde as constantes de equilíbrio apresentam os valores $k_1 = 3,0 \times 10^{-7}$ e $k_2 = 6,6 \times 10^{-2}$ para a formação das espécies CuCl₂⁻_(aq)⁹⁰. É também considerado que para concentrações altas de íons Cl⁻ em solução espécies CuCl₃²⁻ também devem participar no sistema mas não em concentrações significativas como no caso da concentração utilizada no sistema em questão. De acordo com o mecanismo proposto⁸⁸, a formação das espécies CuCl é

governada pelo equilíbrio entre $\text{CuCl}_2^-_{(\text{aq})}$ e Cl^- (reação 18). Nessa reação, CuCl adsorvido reage com os íons Cl^- formando a espécie solúvel $\text{CuCl}_2^-_{(\text{aq})}$. Ainda, o complexo formado pode se oxidar, de acordo com $\text{Cu}^{2+} + \text{Cl}^- + \text{e}^-$ ⁹⁰. A formação dessas espécies é dependente com o potencial externo aplicado no eletrodo. Lee e colaboradores⁸⁹ mostraram a polarização anódica do cobre em um meio eletrolítico contendo íons Cl^- . De acordo com as reações (17) e (18) a cinética de formação das espécies $\text{CuCl}_2^-_{(\text{aq})}$ pode ser representada pelas equações (19) a (21), como segue.

$$v_{\text{CuCl}_2^-} = k_2[\text{CuCl}][\text{Cl}^-] - k_{-2}[\text{CuCl}_2^-] \quad (19)$$

A reação pode ser rearranjada e escrita na forma da equação (20).

$$v_{\text{CuCl}_2^-} = K_0[\text{Cl}^-]^2 - k_{-2}[\text{CuCl}_2^-] \quad (20)$$

onde K_0 pode ser representado na forma da equação de Arrhenius (21).

$$K_0 = \frac{k_2 k_1}{k_{-1}} \exp\left(\frac{F(E - E_0)}{RT}\right) \quad (21)$$

A equação 21 mostra que a constante de equilíbrio de formação das espécies $\text{CuCl}_2^-_{(\text{aq})}$ esta relacionada com o potencial do eletrodo. De acordo com o equilíbrio apresentado, é observado que o valor de k_2 é maior que o valor de k_1 , o que favorece a formação das espécies em solução pelo deslocamento do equilíbrio de reação para o lado direito da equação. Outra consideração importante é a presença de oxigênio molecular dissolvido no meio eletrolítico que favorece o deslocamento do equilíbrio para a formação de espécies $\text{CuCl}_2^-_{(\text{aq})}$ ⁹⁰, aumentando consequentemente o processo de corrosão do cobre em solução. Assim, com o objetivo de remover o cobre/óxido de cobre das amostras de grafeno, a varredura cíclica foi realizada em meio eletrolítico

contendo HCl 0,1 mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹, no intervalo de potenciais -1,0 V a 1,0 V (vs. Ag/AgCl), como mostrado na figura 15.

A figura 15a mostra os voltamogramas lineares durante o primeiro, décimo e décimo sexto ciclo. Para a primeira, o pico de oxidação é nítido, porém, com baixa magnitude de corrente devido ao procedimento de remoção do cobre pela imersão do eletrodo em solução aquosa de HCl:H₂O₂. Esse processo de oxidação é atribuído às espécies CuCl₂⁻(aq), consistente com o diagrama de Pourbaix do sistema Cu : Cl⁻ : H₂O mostrado na figura 14. Com o objetivo de favorecer a dissolução eletroquímica do cobre remanescente, vinte varreduras cíclicas foram realizadas no intervalo de -1,0 V a +1,0 V (vs. Ag/AgCl).

Figura 15 – Voltametria de eletro-dissolução do cobre remanescente das amostras de grafeno CVD **a)** com imersão adicional de uma hora do eletrodo de grafeno na solução de HCl:H₂O₂ e **b)** sem imersão adicional, utilizando-se somente o processo de remoção do cobre convencional. Faixa de potencial utilizada: +/- 1,0V (vs. Ag/AgCl). Eletrólito suporte: HCl 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹. T = 25° C, condições ambientes.

Observa-se que a corrente de oxidação diminui de intensidade com o número de ciclos voltamétricos até o décimo sexto ciclo. Neste caso, não mais do que vinte ciclos voltamétricos foram utilizados para a remoção eletroquímica do cobre, visto que um aumento significativo no número de ciclos, na mesma velocidade de varredura, acarretou em buracos adicionais no eletrodo de grafeno para algumas amostras possivelmente devido ao início da oxidação do eletrodo na faixa de potencial utilizada. A remoção do cobre das amostras de grafeno também foram feitas no caso da não imersão adicional da amostra em solução aquosa de HCl:H₂O₂, ou seja, somente

utilizando-se a remoção de cobre pela metodologia convencional, como mostrado na figura 15b. Assim, observa-se o processo de oxidação com magnitude de corrente maior no primeiro clíco voltamétrico do que o observado na figura anterior, associado a maior concentração de cobre não removido da folha de grafeno. Após o vigésimo clíco de varredura o processo desaparece completamente, um indicativo da dissolução do cobre na solução eletrolítica de HCl 0,1 mol L⁻¹. Esses resultados confirmam que o procedimento de dissolução eletroquímica ou o *e-etching* do cobre é uma etapa importante para o desenvolvimento de eletrodos baseados em grafeno.

7.2.3 Remoção de Cobre de Fibras Flexíveis de Carbono

Com o objetivo de avaliar os resultados obtidos da eletro-dissolução do cobre do eletrodo de grafeno, a mesma metodologia foi realizada pela deposição de cobre sobre eletrodos de fibras de carbono flexíveis (FCF). As FFCs são obtidas de uma variedade grande de precursores como a poli(acrilonitrila) e dependendo do material precursor propriedades distintas podem ser alcançadas, como uma melhora nas propriedades mecânicas, o que é interessante do ponto de vista de aplicações práticas. Do ponto de vista de utilização de FFCs como eletrodos em eletroquímica, a FFC oriunda da poli(acrilonitrila) é muito interessante visto que diâmetros da ordem de 6 a 7 µm são obtidos. No geral, a obtenção das FFCs envolve três etapas. A primeira etapa é a estabilização por oxidação em ar atmosférico em temperaturas de 200 a 300° C. A segunda etapa envolve a carbonização a temperaturas ≤ 1600° C, processo onde ocorre a eliminação de outros elementos como hidrogênio e oxigênio, de modo que o material restante seja principalmente o elemento carbono. A última etapa envolve a grafitização que envolvem temperaturas da ordem de 2000° C onde ocorre o processo de orientação das camadas de grafite da FFC e também do aumento da rigidez do material.

Como o processo de obtenção das FFCs não envolve a utilização de precursores metálicos como no caso de folhas de grafeno, esses materiais são, a princípio, livres de contaminação com materiais metálicos uma vez que são obtidas pelo processo de eletrofiação de precursores orgânicos. O objetivo desta etapa do trabalho foi a investigação dos processos eletroquímicos observados pela presença de cobre

remanescente em materiais de carbono. Também, a metodologia de remoção eletroquímica do cobre remanescente, como no caso dos eletrodos de grafeno, pela utilização do *e-etching*. Para isso, o processo de deposição do cobre sobre as FFCs foi realizado. A presença do cobre depositado nas FCF foi confirmada pelo perfil voltamétrico em meio eletrolítico ácido HCl 0,1 mol L⁻¹, como mostrado na figura 16.

Figura 16 – Voltametria cíclica mostrando a diminuição do pico referente a eletrodissolução do cobre depositado sobre os eletrodos de FCF após 42 ciclos voltamétricos. Eletrólito suporte: HCl 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹. T = 25° C, condições ambientes.

Um processo de oxidação é observado na mesma região de potencial como observado para os eletrodos de grafeno devido a formação de CuCl_2^- . No entanto, a magnitude da corrente de pico é maior devido a uma maior quantidade de cobre dissolvido durante os vários ciclos voltamétricos utilizados para sua remoção. Devido a grande quantidade de cobre depositado, é possível observar claramente a presença do segundo processo de oxidação pela formação de Cu^{2+} a partir dos íons Cu^+ , em regiões de potencial mais positivas. Neste caso, um maior número de ciclos voltamétricos foi necessário para a completa supressão dos picos associados às espécies de cobre em solução, diferente de traços de cobre remanescentes nos eletrodos de grafeno.

7.2.4 Imagens de Microscopia de Força Atômica: Grafeno em Si/SiO₂

Obtiveram-se as imagens de AFM com o objetivo de avaliar possíveis mudanças na morfologia do grafeno antes e após a eletro-dissolução de cobre. A figura 17a e b mostram as imagens de grafeno antes e após o procedimento de eletro-dissolução em meio eletrolítico contendo HCl 0,1 mol L⁻¹.

A utilização de alguns ácidos como HNO₃ e H₂SO₄ levou a alterações na estrutura do grafeno como a abertura de buracos na folha após a varredura cíclica. Assim, o uso da solução de HCl permitiu a remoção do cobre sem alteração em sua estrutura. Entretanto, a redução não foi observada em todas as amostras estudadas devido a presença de resíduos de PE associados aos pontos brancos sobre o substrato de Si/SiO₂ e o eletrodo de grafeno. A barra em cores indica a região da amostra onde a altura relativa foi determinada e a ao lado as figuras indicam as diferenças de altura associadas à imagem de AFM. Também, é possível observar uma região de possível dobra da folha que pode estar associada ao processo de transferência do grafeno no substrato indicada pelas regiões mais claras na borda do eletrodo. A altura relativa das amostras também foi obtida antes e após a eletro-dissolução de cobre, como mostrado nos gráfico de altura relativa (em nm) x posição selecionada para a determinação da altura (em μm). Assim, observa-se um aumento na altura relativa após a eletro-dissolução do cobre. Das figuras (c,d) foram extraídas as alturas relativas de $1,5 \pm 0,2$ nm to $1,7 \pm 0,2$ nm, respectivamente. Essa diferença entre as alturas relativas pode ser atribuído a remoção de impurezas do próprio substrato após longo período de exposição à solução aquosa contendo HCl. As imagens de AFM mostram que o processo de eletro-dissolução não leva a alteração da estrutura da folha de grafeno, resultado interessante do ponto de vista de estudos em eletroquímica, inclusive na obtenção de eletrodos contendo moléculas biológicas como enzimas oxidoredutases.

Figura 17 – Imagens de AFM obtidas da mesma posição do eletrodo de grafeno antes (a) e após o *e-etching* (b). Perfis de altura relativa obtidos da região na qual a barra em branco é indicada nas imagens antes (c) e após o *e-etching* (d). A barra de escala na figura (a) mostra a altura relativa de -1,1 a 0,6 nm enquanto que na figura (b) mostra uma altura relativa de -1,1 a 0,7 nm.

7.2.5 Espectroscopia Raman

O espectro Raman de amostras de carbono apresenta bandas características entre 1000 e 1800 cm^{-1} ⁹¹, referente as bandas G, D, D' e D''. A quantificação de defeitos em uma única folha de grafeno foi proposta pelo bombardeamento da amostra por íons Ar^+ em função da energia do feixe incidente⁹². Com isso, a densidade de defeitos estruturais da amostra foi controlada pela variação do comprimento de onda do laser utilizado⁹³. Aqui, o espectro Raman foi coletado para o eletrodo de grafeno com o objetivo de mostrar que nenhuma alteração na estrutura do grafeno foi feita após a remoção do cobre da folha de grafeno pelo procedimento de *e-etching*. A figura 18 mostra o espectro Raman obtido para a amostra de grafeno.

Figura 18 – Espectro Raman para o eletrodo de grafeno.

O grafeno possui dois átomos por cela unitária e, portanto, seis modos normais de vibração⁹³. A representação da simetria dos modos normais de vibração do grafeno é mostrada de acordo com a simbologia de Mulliken⁹⁴, como para os modos de vibração de simetria do tipo E_{2g} e B_{2g} . No entanto, somente o modo de vibração duplamente degenerado do tipo E_{2g} é ativo e observado no espectro Raman do grafeno⁹³, que corresponde ao modo de vibração ótico no plano. O espectro Raman da folha de grafeno mostra quatro picos característicos em 1329 cm^{-1} (banda D), 1588 cm^{-1} (banda G), 2462 cm^{-1} (banda D + D'') e em 2646 cm^{-1} (banda 2D)^{92, 93}. A banda D corresponde a oscilação simétrica radial ou *breathing mode* do anel de seis átomos de carbono e está associada a quantidade de defeitos ou uma estrutura de carbono mais desordenada. Essa banda apresenta baixa intensidade no caso do grafeno visto que uma folha de grafeno não possui defeitos estruturais o bastante para serem vistos com alta intensidade no espectro Raman. A banda G corresponde ao modo vibracional de simetria de fônon E_{2g} ⁹³. A banda D + D' é correspondente ao modo vibracional da banda D e do fônon correspondente ao movimento oscilatório simétrico longitudinal da cadeia zig-zag estendida do carbono (longitudinal acústico, ou LA). A banda 2D é caracterizada como de segunda ordem do pico D e não requer a presença de defeitos para sua observação no espectro Raman. Assim, essa banda está sempre presente no espectro Raman da folha de grafeno. Ela é originada de valores de frequências múltiplas inteiros da banda D, chamado *overtone*s. Assim, a relação das bandas (I_D/I_G) fornece uma indicação do grau de desordem estrutural do grafeno CVD, apresentando um baixo grau de desordem em sua estrutura^{92,93}.

7.2.6 Funcionalização via reação com Íon de Diazônio

O objetivo da etapa de reação de redução do íon de diazônio nos eletrodos de grafeno CVD foi a funcionalização com os grupos (-COOH). A figura 19 mostra a fotografia da solução após a formação do íon diazônio (a). Os voltamogramas cíclicos mostram a reação de redução do sal diazônio (b).

Figura 19 – **a)** Fotografia da solução de sal de diazônio. **b)** Voltametria cíclica do chip de Si/SiO₂/grafeno na solução de sal de diazônio. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T = 5^\circ \text{ C}$.

A solução após a reação de formação do íon diazônio apresentou a coloração amarelada, como mostrado na fotografia da figura 19a. A voltametria cíclica da figura 19b mostra o processo de redução do sal de diazônio em -0,27 V (vs. Ag/AgCl) conduzida sobre o eletrodo de grafeno CVD. A reação de redução durante três ciclos voltamétricos é observada na faixa de potencial de 0,3V a -0,6V (vs. Ag/AgCl) na velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . É observado que a corrente de redução do íon diazônio é da ordem de duas vezes quando os três ciclos voltamétricos são comparados, o que esta associado a diminuição dos sítios de ligação disponíveis no grafeno CVD para a reação de redução do íon de diazônio. Em um estudo pioneiro³⁵, a reação de redução do íon diazônio no eletrodo é conduzida pela formação de uma ligação covalente entre o átomo de carbono do anel, que inicialmente estava ligado á molécula de N_2^+ , ao átomo de carbono da folha de grafeno CVD, como já mostrado na figura 6.

7.2.7 Imobilização Enzimática

O acoplamento de enzimas em superfícies eletródicas e sua orientação com relação ao eletrodo é um fator importante na obtenção de bioeletrodos⁹⁵. Neste trabalho, a estratégia de imobilização enzimática adotada tanto para o bioânodo contendo a enzima GDh quanto para o biocátodo contendo a enzima BOx foi pela ligação cruzada covalente entre enzima e eletrodo. Como já descrito no tópico anterior, a primeira etapa de funcionalização foi a de reação de redução do íon de diazônio pela utilização do ácido 4-aminobenzóico como molécula precursora da reação. Como etapa correspondente ao acoplamento das enzimas no eletrodo, a reação de formação do éster reativo pela utilização da carbodiimida EDC e da molécula NHS foi feita antes da exposição dos eletrodos com a solução das enzimas GDh e BOx.

A figura 20 mostra a representação esquemática desde o procedimento de transferência da folha de grafeno para o substrato de Si/SiO₂, modificação e controle químico da superfície dos eletrodos até a imobilização das enzimas GDh e BOx. A figura 20 (a) mostra a representação do substrato de Si/SiO₂ já com o contato elétrico de Pt, utilizados como plataforma para as folhas de grafeno. Primeiro, as folhas foram transferidas para o substrato de Si/SiO₂ de forma que uma parte da folha foi disposta sobre o contato elétrico de Pt (b). O contato elétrico foi isolado de forma que somente a folha de grafeno fosse exposta na solução eletrolítica durante os experimentos eletroquímicos. As folhas individuais de grafeno CVD foram então modificadas eletroquimicamente a partir da reação de acoplamento com íon de diazônio (c) pelo uso do precursor ácido 4-aminobenzóico. Após a reação de modificação por voltametria cíclica, uma solução aquosa contendo uma mistura das espécies EDC/NHS em pH = 6,0 (d) foi gotejada sobre o eletrodo. Então, as soluções de enzimas GDh e BOx em pH = 8,0 foram depositadas por gotejamento sobre os eletrodos previamente modificados resultando no bioânodo (e) e biocátodo (f), respectivamente.

Figura 20 – Representação esquemática do (a) substrato Si/SiO₂, (b) folha de grafeno transferido, (c) funcionalização do grafeno com íon de diazônio, (d) acoplamento com EDC/NHS e posterior exposição dos eletrodos com soluções das enzimas GDh e BOx para obtenção do bioânodo (e) e biocátodo (f).

Fonte: Autoria Própria

O acoplamento das enzimas na superfície do eletrodo pela metodologia de ligação covalente proposta nesse trabalho pode ser entendida pela presença de alguns resíduos de aminoácidos presentes na estrutura amino acídica dessas enzimas, como os resíduos de lisina (Lys)²⁴ que podem favorecer a ligação covalente entre a enzima e a superfície do eletrodo funcionalizado com grupos carboxílicos (-COOH). Embora a estrutura da enzima GDh do fungo *Penicilium sp* não esteja presente no banco de dados RCSB PDB Jmol (*Protein Data Bank*), a figura 21 mostra a representação da estrutura da enzima GDh com o cofator enzimático NAD⁺ e da enzima BOx do fungo *Myrothecium verrucaria*, ambas mostradas pela representação de bola e palito (em branco) com destaque para os resíduos do aminoácido Lys (em laranja). Ainda, o sítio ativo da enzima formado pelos átomos de cobre do tipo T1 na estrutura periférica e pelo cluster triatômico T2/T3 localizado no interior da estrutura proteica da enzima destacados em azul e da enzima GDh do fungo *Bacillus Megaterium* obtidos do site RCSB PDB Jmol (*Protein Data Bank*).

Figura 21 – Representação esquemática da estrutura molecular da BOx (E.C. 1.3.3.5, dimensões da cela unitária 52Å x 83Å x 143Å) pela representação em bola e palito (em branco) com destaque para os resíduos de Lys em laranja e os centros de cobre T1 e T2/T3 em azul. Para a enzima GDh (E.C. 1.1.1.47, dimensões 120Å x 66Å x 119Å), destaque é dado para os resíduos de Lys em laranja e o NAD⁺ em vermelho.

Fonte: RCSB PDB Jmol (*Protein Data Bank*), números de identificação 2XLL (BOx) e IGCO (GDh).

8.0 Imagens de AFM dos Bioeletrodos

8.1 Biocátodo Contendo BOx

Após o preparo do bioeletrodo contendo a enzima BOx, obtiveram-se as imagens de AFM como mostrado na figura 22.

Figura 22 - Imagens de AFM dos eletrodos de grafeno **a)** Inicial, **b)** após o *e-etching* e **c)** após a funcionalização e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS. Os gráficos mostram a diferença na altura relativa do eletrodo **d)** inicial, **e)** após o *e-etching* e **f)** após a funcionalização e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS. A barra de escala na figura (a) mostra a altura relativa de 0,03 a 1,0 nm, (b) 3,8 a -1,9 nm e (c) 6,0 a 7,2 nm. O zoom da figura mostra os spots associados a presença das enzima no eletrodo com barra de escala de 50 nm.

O procedimento utilizado para eletro-dissolução do cobre dos eletrodos de grafeno não altera a sua estrutura como mostra as imagens a) da folha inicial e b) após a eletro-dissolução de cobre em meio aquoso ácido. As linhas em cores mostram a posição onde a altura relativa foi obtida na amostra em cada etapa de modificação do eletrodo. Neste caso, a altura relativa antes e após o procedimento de eletro-dissolução do cobre apresentou uma diferença de altura relativa de $1,0 \pm 0,2$ nm (de $0,9 \pm 0,2$ nm a $1,9 \pm 0,2$ nm) como indicado nos gráficos em d) e e), respectivamente. Como mostrado nos tópicos anteriores, a diferença de altura relativa antes e após a eletro-dissolução do cobre pode estar associada a remoção de impurezas do substrato de Si/SiO₂. Após a eletro-dissolução do cobre, a modificação covalente com sal de diazônio e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS não mostrou uma diferença significativa de altura relativa de acordo com a mesma posição escolhida para

comparação. No entanto, a modificação da superfície da folha de grafeno é clara de forma que neste caso é observado a presença da enzima na forma de aglomerados, indicados na cor branca na imagem. Essa imagem mostra que a imobilização da enzima BOx sobre as folhas de grafeno foi realizada com sucesso.

8.2 Bioânodo Contendo GDh

As imagens de AFM também foram obtidas após a modificação dos bioeletrodos de grafeno com a enzima GDh, como mostrado na figura 23.

Figura 23 - **a)** Imagem de AFM do eletrodo de grafeno após a funcionalização e imobilização da enzima BOx por acoplamento com EDC/NHS. O zoom da região em linha pontilhada mostra algumas partes da borda da folha de grafeno modificadas. O gráfico da figura **b)** mostra a altura relativa de -3,8 a 1,1 nm obtido da região indicada na figura pela barra em branco.

As imagens de AFM mostram uma altura relativa de $4,9 \pm 0,2$ nm obtido da região indicada na figura pela barra em branco. A escala é indicada pela barra em branco no lado inferior direito da figura. Diferente da modificação obtida para os bioeletrodos da enzima BOx, a modificação dos bioeletrodos com a enzima GDh apresentou modificação somente próximo as bordas do eletrodo. Essa observação pode ser avaliada com base em dois motivos: (i) a funcionalização do eletrodo com sal de diazônio ocorreu somente nas bordas do eletrodo e; (ii) a imobilização enzimática ocorreu preferencialmente nessa região, como indicado pelas regiões mais claras na imagem e da diferença de altura relativa das regiões do eletrodo, da região mais próxima da borda do eletrodo com a região do plano basal.

9.0 Bioeletrocatalise

9.1 Oxidação de Glicose

O estudo bioeletroquímico de oxidação de glicose pela enzima GDh foi avaliado em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ $T = 25^\circ \text{C}$. A figura 24 mostra as voltametrias cíclicas do bioeletrodo de GDh.

Figura 24 - **a)** Voltametria cíclica do bioânodo de grafeno com a enzima GDh na ausência (em preto) e na presença de glicose 8 mmol L^{-1} (em vermelho). **b)** Estudo de estabilidade do bioeletrodo de GDh após o 1^a (em preto) e 20^a ciclo (em vermelho). Velocidade de varredura: 2 mV s^{-1} .

O comportamento voltamétrico do bioeletrodo de grafeno com a enzima GDh foi avaliado com a adição de glicose no meio eletrolítico no intervalo de potencial de -0,20 V a 0,80 V (vs. Ag/AgCl)(figura 24a). A voltametria foi iniciada após a homogeneização da solução eletrolítica uma vez que o eletrodo de grafeno utilizado possui área superficial da ordem de 10^{-3} cm^2 , área estimada com auxílio do software do microscópio óptico. As setas indicam a direção da varredura voltamétrica. Observou-se que há um aumento nos valores de corrente de oxidação com a adição de glicose no meio eletrolítico (curva em vermelho) quando comparado com a voltametria na ausência de glicose (em preto), resultado que mostra que a atividade biocatalítica da enzima foi mantida após a imobilização nas folhas de grafeno.

Após a adição de glicose no meio eletrolítico, observa-se claramente o *onset* para a reação biocatalizada pela GDh que tem início na região de -0,12 V (vs.

Ag/AgCl)⁹⁶ e atinge uma magnitude de aproximadamente $30 \mu\text{A cm}^{-2}$, valor observado em 0,8V. Resultados similares foram obtidos com eletrodos utilizando-se outras estratégias de imobilização da enzima GDh em eletrodos de carbono na presença de mediadores de transferência de carga^{96, 97}. O perfil voltamétrico mostra que a reação biocatalizada pela GDh não apresenta limitação por transporte de massa, visto que um platô não foi observado na janela de potencial utilizada para o estudo do bioeletrodo. Nesse caso, o processo indica uma limitação por transferência de carga entre a enzima e o eletrodo de grafeno. Alguns trabalhos da literatura mostram a resposta biocatalítica da enzima GDh pela utilização de matrizes de carbono porosas com o objetivo de aumentar a eficiência de imobilização enzimática^{98, 99}. Mano e colaboradores¹⁰⁰ mostraram a utilização de matrizes porosas de carbono como plataformas para imobilização da enzima GDh-PQQ dependente. Com isso, altas densidades de corrente para oxidação de glicose foram observadas, com onset de potencial muito próximo dos resultados obtidos com os eletrodos de grafeno CVD. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente uma estratégia para a imobilização da enzima GDh-NAD⁺ dependente em eletrodos de FCFs esfoliadas em meio ácido¹⁰¹. Essa estratégia permitiu que altos valores de densidade de corrente para oxidação de glicose com onset em valores negativos de potencial, o que é favorável para utilização como bioeletrodos.

A estabilidade do bioeletrodo de GDh também foi avaliada após 20 ciclos voltamétricos na mesma janela de potencial e velocidade de varredura (figure 24b). Foi possível observar que o bioeletrodo apresentou um decaimento de densidade de corrente de aproximadamente $0,4 \mu\text{A cm}^{-2}$ em maiores sobrepotenciais devido ao consumo de glicose no meio eletrolítico. A voltametria foi realizada por um período de aproximadamente 6 horas, o tempo após 20 ciclos voltamétricos na velocidade de varredura de 2 mV s^{-1} . A figura 25 mostra o estudo do bioeletrodo de GDh com adições sucessivas de glicose no meio eletrolítico.

Figura 25 - Voltametria cíclica do bioeletrodo grafeno/GDh após adições sucessivas de glicose 1 mmol L^{-1} no meio eletrolítico. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $\text{pH} = 7,0$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25^\circ \text{ C}$. Velocidade de varredura: 2 mV s^{-1} .

A figura 25 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes concentrações de glicose. Para isso, realizaram-se várias adições de $10 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de glicose 1 mol L^{-1} em 10 mL de eletrólito suporte tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A velocidade de varredura foi de 2 mV s^{-1} e o valor da concentração final de glicose no meio eletrolítico foi de 10 mmol L^{-1} . O registro de cada varredura voltamétrica foi realizado de forma que entre cada adição sucessiva fez-se a homogeneização da solução eletrolítica. É observado um aumento da densidade de corrente de oxidação de glicose, como é observado após a adição de glicose na concentração de 8 mmol L^{-1} . Com uma adição de glicose até a concentração de 9 mmol L^{-1} o perfil voltamétrico e a corrente de oxidação de glicose não varia significativamente. Já para uma adição sucessiva da solução de glicose no meio eletrolítico, para a concentração final de 10 mmol L^{-1} , a corrente de oxidação diminui, possivelmente devido a saturação da enzima pela quantidade de glicose adicionada no meio eletrolítico. A cronopotenciometria e a cronoamperometria para o bioeletrodo contendo a enzima GDh também foram obtidos, como mostrado na figura 26.

Figure 26 - **a)** Cronopotenciometria do grafeno em presença de glicose $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (em preto), do bioânodo na ausência (linha pontilhada em vermelho) e na presença de glicose $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha sólida vermelha). **b)** Cronoamperometria do eletrodo de grafeno na ausência (em preto) e na presença da enzima GDh (em vermelho) com adições sucessivas de glicose com eletrodo polarizado em $0,2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl). Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio $\text{pH} = 7,0$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $T 25^\circ \text{ C}$.

O potencial do eletrodo de grafeno apresentou valor de aproximadamente $-0,03 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) (em preto). Após a imobilização enzimática o potencial foi de $-0,11 \text{ V}$ (curva pontilhada em vermelho) e a adição de glicose 8 mmol L^{-1} no meio eletrolítico mostra o deslocamento dos potenciais de eletrodo para o valor de $-0,13 \text{ V}$ (figura 26a), valor próximo do observado para o onset de potencial na voltametria cíclica.

A figura 26b mostra o perfil cronoamperométrico do bioeletrodo de GDh com eletrodo polarizado em $0,2 \text{ V}$. O cronoamperograma do eletrodo de grafeno é mostrado em preto sendo que o perfil cronoamperométrico para o bioeletrodo com a enzima GDh é mostrado em vermelho com adições sucessivas de glicose no meio eletrolítico até a concentração total de 8 mmol L^{-1} . O *inset* mostra a região em maiores adições de glicose. O aumento de corrente de oxidação é mostrado pelo aumento do patamar de oxidação de glicose ocorre até $0,10 \mu\text{A cm}^{-2}$ (figura 26a). Este resultado está em concordância com os resultados de corrente de oxidação de glicose com valores muito próximos dos obtidos por cronoamperometria.

9.2 Redução de Oxigênio

O estudo da RRO pela utilização de enzimas como catalisadores é bem conhecida, como as enzimas oxidases de cobre azul ou multicobre oxidases (*blue copper oxidases*), porque possuem alta capacidade de catalisar as reações de redução de O_2 .

As multi cobre oxidases são enzimas que possuem quatro átomos de cobre em seu núcleo, o cluster chamado de T2/T3 localizado no interior da estrutura proteica da enzima e um átomo de cobre T1 periférico¹⁰². É conhecido que o átomo de cobre T1 esta diretamente ligado a duas moléculas do aminoácido histidina (Hys) sendo que um aminoácido de cisteína (Cys) está ligado ao cluster T2/T3 e desempenham um papel importante na transferência de elétrons entre os átomos de cobre e estão diretamente associados ao potencial de redução observado para a redução de oxigênio molecular pela enzima BOx. Ainda, essa enzima apresenta a característica reduzir O_2 a H_2O ¹⁰²⁻¹⁰⁴ pelo mecanismo direto que envolve quatro elétrons e quatro prótons (H^+), o que as torna interessantes em estudos de BCs enzimáticas. A enzima BOx é um exemplo de enzima multicobre oxidase muito estudada, sendo que sua capacidade de redução de O_2 em maiores valores de pH (pH = 7) é atrativa para sua utilização como componentes de biocátodos de BCs. Além disso, essa enzima apresenta alta estabilidade, fator de extrema importância no desenvolvimento de BCs enzimáticas. Como no caso da enzima GDh, o estudo da atividade bioeletrocatalítica utilizando-se materiais de carbono é bastante conhecido, mas nenhum trabalho foi realizado até hoje envolvendo a utilização de folhas individuais de grafeno como eletrodos. Assim, o desempenho do bioeletrodo de grafeno com a enzima BOx foi avaliado em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,0 a 25°C .

A figura 27a mostra a voltametria cíclica na faixa de potencial de -0,20 V a 0,80 V (vs. Ag/AgCl) na velocidade de varredura de 2 mV s^{-1} , o potencial do bioeletrodo e a cronoamperometria em eletrodo polarizado em 0,0 V (vs. Ag/AgCl) com o sistema saturado com gás argônio ou oxigênio a fim de avaliar a atividade biocatalítica da enzima. As setas em preto indicam a direção da varredura voltamétrica.

Figura 27 - **a)** Voltametria cíclica do eletrodo de grafeno (em cinza), grafeno com a enzima BOx na presença de gás Ar saturado (em preto) e em O₂ saturado. Velocidade de varredura: 2 mV s⁻¹. **b)** Medidas de potencial de eletrodo do grafeno na ausência da BOx, na presença da enzima imobilizada no eletrodo em Ar saturado (linha pontilhada azul) e em O₂ saturado (linha sólida azul). **c)** A cronoamperometria do eletrodo de grafeno (em preto) e do eletrodo de grafeno com a enzima BOx imobilizada (em azul) mostra o comportamento da densidade de corrente após a injeção de gás oxigênio no meio eletrolítico e a estabilidade durante 40 minutos com o eletrodo polarizado em 0,0 V (vs. Ag/AgCl). **d)** Estabilidade do bioeletrodo após 20 ciclos em solução saturada com gás O₂. O tempo de saturação para o gás Ar foi de 60 minutos e para o gás O₂ foi de 30 minutos. Eletrólito suporte: tampão fosfato de sódio pH = 7,0, 0,1 mol L⁻¹. T = 25° C.

A atividade bioeletrocatalítica para redução de O₂ é observada após a imobilização da enzima no eletrodo de grafeno pelo aumento das correntes de redução de O₂, com *onset* de potencial em aproximadamente +0,45 V (vs. Ag/AgCl), o que não é observado quando comparado com o eletrodo de grafeno na ausência da enzima imobilizada (em cinza). O início da reação biocatalizada de O₂ está próximo com os valores reportados para a TDE do cofator para a superfície do eletrodo¹⁰⁵. A figura 27b mostra o potencial do eletrodo de grafeno (em preto), após a imobilização da enzima

BOx em ar (linha pontilhada em azul) e em meio saturado com O₂ (linha sólida em azul). O potencial de circuito aberto (OCP) registrado para o eletrodo de grafeno foi de -0,03 V (*vs.* Ag/AgCl), sendo que após a imobilização da enzima BOx obteve-se um valor de 0,40 V (*vs.* Ag/AgCl). No meio eletrolítico saturado com gás oxigênio, observa-se o potencial de +0,45 V (*vs.* Ag/AgCl), resultado que está em concordância com os resultados obtidos na voltametria cíclica¹⁰⁵. Pelo fato do sítio ativo estar localizado na estrutura periférica da enzima BOx a transferência de elétron direta do cofator enzimático para a superfície do eletrodo é favorável, o que permite uma melhor comunicação eletrônica da enzima com a superfície do eletrodo¹⁰⁵. Embora a interpretação da TDE ainda seja muito discutida¹⁸, Shleev e colaboradores¹⁰⁶ mostraram a interpretação da TDE baseando-se na determinação do potencial do sítio T1 da enzima BOx¹⁰⁷, uma vez que a observação da oxidação/redução do centro de cobre de multicobre oxidases seja de difícil observação experimental¹⁰⁶. De acordo com os resultados observados em eletrodos de grafeno CVD, o potencial de *onset* para a redução bioeletrocatalítica de O₂ pela enzima BOx tem valor próximo do cofator enzimático T1, observado também para outros tipos de bioeletrodos de carbono contendo a enzima BOx¹⁰⁵.

A figura 27c mostra os cronoamperogramas com eletrodos polarizados em 0,0 V (*vs.* Ag/AgCl). O cronoamperograma em preto mostra o comportamento do eletrodo de grafeno com valores próximos de zero de densidade de corrente. Com o eletrodo enzimático, a densidade de corrente atinge valores de 37 $\mu\text{A cm}^{-2}$ quando na presença de solução com argônio saturada. Após a injeção de gás O₂, a densidade de corrente aumenta até atingir um valor máximo de 48 $\mu\text{A cm}^{-2}$, onde o patamar de densidade de corrente está em concordância com patamar de densidade de corrente obtido por voltametria cíclica em 0,0V (*vs.* Ag/AgCl). Este experimento mostra a estabilidade de corrente do bioeletrodo de BOx após aproximadamente 30 minutos. A estabilidade voltamétrica dos bioeletrodos de grafeno também foi avaliada durante vinte ciclos em 2 mV s⁻¹, como mostrado na figura 27d. Neste caso a densidade de corrente não varia significativamente após vinte ciclos (voltamograma em vermelho). Esses resultados de imobilização da BOx em eletrodos de grafeno CVD se mostram promissores do ponto de vista de estudos de BCs enzimáticas, como será discutido no próximo tópico.

10.0 Biocélula a Combustível Enzimática de Glicose/O₂

Após o estudo de meia-cela com as enzimas GDh e BOx, desenvolveu-se uma BC enzimática em chips de Si/SiO₂. A figura 28 mostra a representação esquemática da BC enzimática utilizada no experimento.

Figura 28 – Representação esquemática da BC enzimática.

Fonte: Autoria Própria

A obtenção de uma BC enzimática pela combinação dessas duas enzimas, GDh no ânodo e BOx no cátodo, pela utilização de folhas de grafeno CVD depositadas em chips de Si/SiO₂ apresenta algumas vantagens principais. Primeiramente, a imobilização da enzima GDh permite que a oxidação de glicose a gliconolactona seja realizada de forma eficiente, de forma que a presença de gás oxigênio dissolvido no meio eletrolítico não interfere na atividade biocatalítica da enzima (*crossover*), diferentemente do observado quando a enzima glicose oxidase é utilizada como componente de bioânodos. Assim, a combinação dessa enzima operando juntamente com a enzima BOx é viabilizada em BCs enzimáticas, não interferindo na performance da BC enzimática. Após o estudo de meia-cela para, cada bioeletrodo contendo as enzimas GDh e BOx foram imersos em uma cela eletroquímica contendo o eletrólito suporte em pH =7,0. Para a realização desse estudo, o biocátodo foi ligado no eletrodo de trabalho e o bioânodo ligado com o

eletrodo de referência, em curto circuito com o cabo de saída do potenciostato referente ao eletrodo auxiliar. Com isso, o estudo de BC enzimática em folhas de grafeno foi avaliado, como mostrado na figura 29.

Figura 29 - **a)** Curvas de polarização do bioânodo (em vermelho) e do biocátodo (em azul) em O_2 saturado na presença dos respectivos substratos (linhas sólidas) e na ausência dos substratos (linhas pontilhadas). Velocidade de varredura: 2 mV s^{-1} . **b)** Voltagem registrada da BC enzimática (em azul escuro) e na ausência das enzimas (em cinza) na presença dos substratos glicose e O_2 no meio eletrolítico. **c)** Curva E vs. J mostrando a corrente da BC enzimática (em azul) e na ausência das enzimas (em cinza). **d)** Curva de potência obtida da BC enzimática (em azul) e na ausência das enzimas (em preto) na presença dos substratos glicose e O_2 saturado.

A figura 29a mostra as curvas de polarização a 2 mV s^{-1} para a BC enzimática formada pelas enzimas GDh e BOx como componentes do bioânodo (em vermelho) e biocátodo (em azul), respectivamente. As linhas sólidas representam o sistema na presença do substrato e as linhas pontilhadas representam o sistema na ausência do

substrato no meio eletrolítico. Do ponto de vista de aplicabilidade de BCs enzimáticas utilizando-se áreas pequenas como no caso desse estudo, optou-se pela não utilização de mediadores de transferência de carga com o objetivo de estudo da real contribuição das enzimas para a atividade bioeletrocatalítica uma vez que baixas densidades de potência seriam esperadas. As curvas de polarização para o bioânodo e biocátodo mostram os respectivos *onsets* de potencial quando cada sistema individual esta na presença dos respectivos substratos.

Para o bioânodo de GDh, o *onset* de potencial para oxidação de glicose é observado em -0,13 V (*vs.* Ag/AgCl) o que mostra a atividade biocatalítica da enzima na presença de glicose após a imobilização na folha de grafeno. Já para o biocátodo de BOx, o *onset* de potencial é observado em +0,45 V (*vs.* Ag/AgCl). A diferença de potencial dos eletrodos em um experimento de cela unitária também foi registrado, como mostrado na figura 29b. Nesse caso, tem-se o valor de potencial de $+0,55 \pm 0,09$ mV, próximo da diferença entre os potenciais observados nas curvas de polarização, para o ânodo e para o cátodo. A partir dos resultados obtidos realizou-se uma distribuição estatística dos parâmetros termodinâmicos obtidos de 6 experimentos de BC enzimática com grafeno. Para um conjunto de seis experimentos de BC com grafeno realizados, obteve-se o erro de cada parâmetro das BCs de grafeno baseado no teste *t-student* com intervalo de confiança de 95% dos gráficos 29c e d.

A curva *E vs. J* da BC enzimática é observada pela varredura de potencial a 2 mV s^{-1} (em azul) com máximo de potencial de $+0,55 \pm 0,09$ V e corrente de $2,3 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,0 V (*vs.* Ag/AgCl)(figura 30c). A partir desta curva, a curva de densidade de potência foi obtida, como mostrado na figura 30d. A densidade de potência (em azul) obtida teve um máximo em $0,27 \pm 0,05$ V com valor de $0,18 \pm 0,09 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$. Esses resultados mostram que a estratégia adotada para imobilização enzimática foi eficaz nos experimentos de BC enzimática utilizando-se folhas de grafeno CVD como eletrodos, resultados iniciais e promissores para futuros estudos de conversão de energia em um único chip.

11.0 Discussão

A estratégia desenvolvida pela utilização do PE para o recobrimento da folha de grafeno CVD foi crucial para a obtenção dos eletrodos com grandes áreas. A metodologia permitiu que a transferência da folha de grafeno para o substrato de Si/SiO₂ fosse feita de forma que a integridade estrutural fosse mantida, sem quebras adicionais e de forma que o polímero fosse removido por completo da superfície do grafeno CVD.

Embora o uso da solução aquosa de lavagem contendo HCl:H₂O₂ assegure que a remoção da folha de cobre das folhas de grafeno em um tempo menor do que dez minutos, o estudo eletroquímico mostrou a presença de cobre/óxidos de cobre remanescente nas folhas de grafeno CVD, indicando um problema fundamental quando as folhas de grafeno são visadas para aplicação em eletroquímica e também em bioeletrodos enzimáticos. Os primeiros estudos voltamétricos feitos em tampão fosfato de sódio pH=7,0 mostraram a presença de cobre/óxidos de cobre remanescentes na superfície do eletrodo de grafeno CVD, sendo que as espécies formadas pelos processos eletroquímicos de oxidação identificadas pelo diagrama de Pourbaix do sistema Cu : H₂O. Assim, uma estratégia para a remoção do cobre remanescente das folhas de grafeno CVD foi necessária para a continuidade do trabalho.

A eletro-dissolução (*e-etching*) do cobre/óxidos de cobre do sistema Cu : H₂O : Cl⁻ na forma de espécies solúveis de CuCl₂⁻ pela varredura de potencial em meio aquoso contendo HCl foi eficaz, resultado observado pela supressão dos processos de oxidação inicialmente observados em meio tampão pH = 7,0. As imagens de AFM também mostram que, após a eletro-dissolução do cobre, a estrutura do eletrodo permaneceu a mesma, fato também evidenciado pela espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman permitiu uma análise da estrutura do eletrodo de grafeno CVD depositado sobre Si/SiO₂. Nesse caso, o espectro vibracional mostrou que a estrutura do eletrodo de grafeno não foi alterada mesmo após a utilização da metodologia de *e-etching* e, ainda, permitindo a remoção eletroquímica do cobre remanescente do grafeno obtido por CVD.

A funcionalização covalente das folhas de grafeno CVD com grupos (-COOH) pela reação do sal de diazônio foi eficiente na imobilização das enzimas GDh e BOx. O acoplamento das duas enzimas foi alcançado pela reação de formação do éster reativo pela utilização de uma solução da mistura de EDC/NHS. As imagens de AFM mostram que os eletrodos foram modificados com as enzimas, sendo que para a BOx foram observados aglomerados sobre a superfície do eletrodo de grafeno e para a enzima GDh observou-se que a modificação ocorreu preferencialmente nas bordas do eletrodo.

O estudo bioeletrocatalítico mostrou que a atividade das enzimas GDh e BOx foi mantida, ao menos parcialmente, após a imobilização nos eletrodos de folhas de grafeno. O estudo de voltametria cíclica para o bioânodo de GDh mostrou início para eletro-oxidação de glicose em $-0,13\text{ V}$ (*vs.* Ag/AgCl) com densidades de corrente atingindo valores de $30,0\text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ em maiores sobrepotenciais sendo que o eletrodo apresentou boa estabilidade voltamétrica após vinte varreduras a 2 mV s^{-1} , resultado promissor do ponto de vista de obtenção de bioânodos enzimáticos. Para o biocátodo com a enzima BOx, os resultados de voltametria mostraram que a atividade bioeletrocatalítica de redução de oxigênio molecular pode ser observada, com início em $+0,45\text{ V}$ (*vs.* Ag/AgCl), valor próximo de alguns estudos de bioeletrodos de GDh ($+0,50\text{ V}$ (*vs.* Ag/AgCl)), com densidades de corrente atingindo valores de $-48,0\text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ em maiores valores de sobrepotencial.

A BC enzimática em grafeno obtida com GDh como bioânodo e BOx como biocátodo apresentou densidade máxima de potência de $0,18 \pm 0,09\text{ }\mu\text{W cm}^{-2}$ com máximo em $0,27 \pm 0,05\text{ V}$, dado obtido após seis horas de experimento. Com o objetivo de comparar o resultado obtido com alguns estudos já publicados, a tabela 3 foi organizada de modo a comparar os valores de densidade de potência volumétrica para baterias obtidas a partir de diferentes sistemas. A partir de alguns valores coletados na literatura, pode-se observar que o valor obtido nesse trabalho de pesquisa apresentou o maior valor obtido para uma biocélula do tipo enzimática, com valor de $1,7 \pm 0,2\text{ W cm}^{-3}$.

Tabela 3 – Tabela com valores comparativos de densidade de potência volumétrica para diferentes sistemas.

Sistema	Densidade Volumétrica	Referência
Bateria íon Lítio	2,8 W cm ⁻³	<i>ACSAppMaterInterf.</i> ¹¹¹
Micro-FFC/MnO ₂	0,9 W cm ⁻³	<i>Adv. Mater.</i> ¹¹²
Micro-FFC glicose/O ₂	25,0 μW cm ⁻³	<i>JACS</i> ¹¹³
BC Enzimática grafeno	1,7 ± 0,2 W cm⁻³	<i>Estudo presente</i>

12.0 Conclusões

O primeiro grande desafio enfrentado no projeto foi toda a metodologia utilizada para a obtenção do chip de Si/SiO₂ contendo grafeno CVD.

A primeira etapa adotada foi a transferência da folha de grafeno CVD para o chip de Si/SiO₂ pelo recobrimento da folha com o polímero PE. A placa grafeno/PE formada após a remoção da folha de cobre na solução de lavagem contendo HCl:H₂O₂ permitiu a sua transferência para o chip. A presença de impurezas de metal em materiais de carbono é considerado um grande problema na obtenção de dispositivos eletroquímicos baseados em carbono. Assim, o desenvolvimento de uma metodologia adequada para a remoção das impurezas de cobre remanescentes do procedimento de lavagem química e remoção da folha de cobre do grafeno CVD foi crucial para a continuidade do projeto de pesquisa.

A estratégia eletroquímica utilizada para a remoção do cobre remanescente da folha de grafeno CVD envolvendo a utilização de uma solução ácida que removesse o cobre e ao mesmo tempo mantivesse a integridade estrutural do eletrodo foi feita pela varredura cíclica do eletrodo de grafeno em meio aquoso contendo HCl. A eletrodissolução do cobre remanescente, ou *e-etching*, satisfaz as condições necessárias para a obtenção dos chips de Si/SiO₂ com as folhas de grafeno CVD com grandes áreas.

O segundo desafio enfrentado foi a utilização de uma metodologia adequada para a imobilização das enzimas GDh e BOx na superfície dos eletrodos de grafeno CVD.

Para isso, a metodologia de funcionalização do eletrodo foi fundamental visto que a enzima permaneceu ligada a superfície do eletrodo de acordo com duas etapas de funcionalização. Primeiramente, a molécula de ácido 4-aminobenzóico permitiu que o eletrodo de grafeno CVD fosse funcionalizado com grupos (-COOH), etapa alcançada com a reação com sal de diazônio. Então, a reação de formação do éster reativo pela utilização da carbodiimida (EDC) foi realizado juntamente com a adição da molécula de NHS que permitiu o aumento da estabilidade do éster, anteriormente o gotejamento da solução das enzimas GDh e BOx nos eletrodos de grafeno. Com isso, o estudo bioeletrocatalítico das duas enzimas foi realizado com eficácia, mostrando um bom desempenho de densidade de corrente e potenciais de eletrodo.

A última etapa de desenvolvimento do projeto de pesquisa permitiu que a obtenção da BC enzimática fosse realizada em chips de Si/SiO₂. Mostrou-se a possibilidade de obtenção de BCs enzimáticas em superfícies do tipo 2D. A estratégia de desenvolvimento do chip de Si/SiO₂ com as folhas de grafeno permitiu a obtenção de uma BC enzimática com a menor espessura já reportada, com elevada densidade de potência volumétrica considerando a espessura da folha de grafeno.

13.0 Referências

1. PICCOLINO, M.; GALVANI, L. Animal electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology. **Trends in Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 443-448, 1997.

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

3. POTTER, M.C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 84, n. 571, p. 260-276, 1911.

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

5. LUZ, R.A.S.; PEREIRA, A.R.; DE SOUZA, J.C.P.; SALES, F.C.P.F.; CRESPILO, F.N. Enzyme biofuel cells: thermodynamics, kinetics and challenges in applicability. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 11, p. 1751-1777, 2014.

6. GAO, F.; YAN, Y.M.; SU, L.; WANG, L.; MAO, L.Q. An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 5, p. 989-996, 2007.

7. GAO, F.; VIRY, L.; MAUGEY, M.; POULIN, P.; MANO, N. Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells. **Nature Communications**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2010.

8. ZEBDA, A.; GONDRAN, C.; LE GOFF, A.; HOLZINGER, M.; CINQUIN, P.; COSNIER, S. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. **Nature Communications**, v. 1, n. 370, p. 1-6, 2011.

9. KWON, C.H.; LEE, S.H.; CHOI, Y.B.; LEE, J.A.; KIM, S.H.; KIM, H.H.; SPINKS, G.M.; WALLACE, G.G.; LIMA, M.D.; KOZLOV, M.E.; BAUGHMAN, R. H.; KIM, S.J. High-power biofuel cell textiles from woven bistructured carbon nanotube yarns. **Nature Communications**, v. 5, n. 3928, p. 1-7, 2014.

10. PLUMERE, N.; RUDIGER, O.; OUGHLI, A.A.; WILLIAMS, R.; VIVEKANANTHAN, J.; POLLER, S.; SCHUHMANN, W.; LUBITZ, W. A redox hydrogel protects hydrogenase from high-potential deactivation and oxygen damage. **Nature Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 822-827, 2014.
11. CRACKNELL, J. A.; VINCENT, K.A.; ARMSTRONG, F. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2439-2461, 2008.
12. YU, E.H.; SCOTT, K. Enzymatic biofuel cells-fabrication of enzyme electrodes. **Energies**, v. 3, n. 1, p. 23-42, 2010.
13. WILLNER, I.; KATZ, E. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 7, p. 1180-1218, 2000.
14. SALEH, F.S.; MAO, L.Q.; OHSAKA, T. A promising dehydrogenase-based bioanode for a glucose biosensor and glucose/O₂ biofuel cell. **Analyst**, v. 137, n. 9, p. 2233-2238, 2012.
15. PIZZARIELLO, A.; STREDANSKY, M.; MIERTUS, S. A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix. **Bioelectrochemistry**, v. 56, n. 1-2, p. 99-105, 2002.
16. TICIANELLI, E.A.; CAMARA, G.A.; SANTOS, L.G.R.A. Electrocatalysis of the hydrogen oxidation and oxygen reduction reactions. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 664-669, 2005.
17. KANO, K.; IKEDA, T. Fundamentals and practices of mediated bioelectrocatalysis. **Analytical Science**, v. 16, n. 10, p. 1013-1021, 2000.
18. GHUNDILIS, A.L.; ATANASSOV, P.; WILKINS, E. Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications. **Electroanalysis**, v. 9, n. 9, p. 661-674, 1997.

- 19.SCHUHMANN, W.; OHARA, T.J.; SCHMIDT, H.L.; HELLER, A. Electron-Transfer between glucose oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 4, p. 1394-1397, 1991.
- 20.PREVOTEAU, A.; MANO, N. Oxygen reduction on redox mediators may affect glucose biosensors based on "wired" enzymes. **Electrochimica Acta**, v. 68, n. 1, p. 128-133, 2012.
- 21.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.
- 22.GREGG, B.A.; HELLER, A. cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 258-263, 1990.
- 23.KUCHLER, A.; YOSHIMOTO, M.; LUGINBUHL, S.; MAVELLI, F.; WALDE, P. Enzymatic reactions in confined environments. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 5, p. 409-20, 2016.
- 24.BRENA, B.; GONZALES-POMBO, P.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, n. 1, p.15-31, 2013.
- 25.MARTINS, M.V.A.; PEREIRA, A.R.; LUZ, R.A.S.; IOST, R.M.; CRESPILO, F.N. Evidence of short-range electron transfer of a redox enzyme on graphene oxide electrodes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 33, p. 17426-17436, 2014.
- 26.CRESPILO, F.N.; GHICA, M.E.; FLORESCU, M.; NART, F.C.; OLLIVEIRA, O.N.; BRETT, C.M.A. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 10, p. 1665-1670, 2006.
- 27.OLIVEIRA, G.M.; KIM, J.H.; MARTINS, M.V.A.; IOST, R.M.; CHAUDHARI, K.N.; YU, J.S.; CRESPILO, F.N. Flexible carbon cloth electrode modified by hollow core-mesoporous shell carbon as a novel efficient bio-anode for biofuel cell. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 1, p. 356-360, 2012.

- 28.DELAMAR, M.; HITMI, R.; PINSON, J.; SAVEANT, J.M. Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 14, p. 5883-5884, 1992.
- 29.RODRIGUEZ-PEREZ, L.; HERRANZ, M.A.; MARTIN, N. The chemistry of pristine graphene. **Chemical Communications**, v. 49, n. 36, p. 3721-3735, 2013.
- 30.ANDRIEUX, C.P.; PINSON, J. The standard redox potential of the phenyl radical/anion couple. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14801-14806, 2003.
- 31.BLANFORD, C.F.; HEATH, R.S.; ARMSTRONG, F.A. A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface. **Chemical Communications**, v. 17, n. 1, p. 1710-1712, 2007.
- 32.BLANFORD, C.F.; FOSTER, C.E.; HEATH, R.S.; ARMSTRONG, F.A. Efficient electrocatalytic oxygen reduction by the 'blue' copper oxidase, laccase, directly attached to chemically modified carbons. **Faraday Discussions**, v. 140, p. 319-335, 2008.
- 33.GREEVES, N.C.J.; WARREN, S. **Organic chemistry**. 2 ed. Oxford, 2001, 1234 p.
- 34.SHUL, G.; RUIZ, C.A.C.; ROCHEFORD, D.; BROOKSBY, P.A.; BELANGER, D. Electrochemical functionalization of glassy carbon electrode by reduction of diazonium cations in protic ionic liquid. **Electrochimica Acta**, v. 106, n. 1, p. 378-385, 2013.
- 35.ALLONGUE, P.; DELAMAR, M.; DESBAT, B.; FAGEBAUME, O.; HITMI, R.; PINSON, J.; SAVEANT, J.M. Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 1, p. 201-207, 1997.
- 36.PELLISSIER, M.; BARRIERI, F.; DOWNARD, A.J.; LEECH, D. Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 6, p. 835-838, 2008.
- 37.HERMANSON, G. **Bioconjugated techniques**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008, 1146 p.

38. BALASUBRAMANIAN, K. Challenges in the use of 1D nanostructures for on-chip biosensing and diagnostics: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1195-1204, 2010.
39. BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Electrochemically functionalized carbon nanotubes for device applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 26, p. 3071-3083, 2008.
40. BALASUBRAMANIAN, K.; KERN, K. 25th anniversary article: Label-free electrical biodetection using carbon nanostructures. **Advanced Materials**, v. 26, n. 8, p. 1154-1175, 2014.
41. SORDAN, R.; MIRANDA, A.; TRAVERSI, F.; COLOMBO, D.; CHRASTINA, D.; ISELLA, G.; MASSERINI, M.; MIGLIO, L.; KERN, K.; BALASUBRAMANIAN, K. Vertical arrays of nanofluidic channels fabricated without nanolithography. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 11, p. 1556-1560, 2009.
42. ZUCCARO, L.; KRIEG, J.; DESIDERI, A.; KERN, K.; BALASUBRAMANIAN, K. Tuning the isoelectric point of graphene by electrochemical functionalization. **Scientific Reports UK**, v. 5, p. 1-13, 2015.
43. CINICIATO, G.P.M.K.; LAU, C.; COCHRANE, A.; SIBBETT, S.S.; GONZALES, E.R.; ATANASSOV, P. Development of paper based electrodes: From air-breathing to paintable enzymatic cathodes. **Electrochimica Acta**, v. 82, n. 1, p. 208-213, 2012.
44. MCDONALD, J.C.; WHITESIDES, G.M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 7, p. 491-499.
45. NAPOLI, M.; EIJKEL, J.C.T.; PENNATHUR, S. Nanofluidic technology for biomolecule applications: a critical review. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 8, p. 957-985, 2010.
46. ZEVENBERGEN, M.A.G.; WOLFRUM, B.L.; GOLUCH, E.D.; SINGH, P.S.; LEMAY, S.G. Fast electron-transfer kinetics probed in nanofluidic channels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 32, p. 11471-11477, 2009.
47. COSNIER, S.; LE GOFF, A.; HOLZINGER, M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. **Electrochemistry Communications**, v. 38, n. 1, p. 19-23, 2014.

48.KATZ, E. Biofuel cells with switchable power output. **Electroanalysis**, v. 22, n. 7-8, p. 744-756, 2003.

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

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

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

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

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

54.SALES, F.C.P.F.; IOST, R.M.; MARTINS, M.V.A.; ALMEIDA, M.C.; CRESPILOHO, F.N. An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 3, p. 468-474, 2013.

55.GEIM, A.K. Graphene: status and prospects. **Science**, v. 324, n. 5934, p. 1530-1534, 2009.

56.ZUCCARO, L.; TESAURO, C.; KURKINA, T.; FIORANI, P.; YU, H.K.; KNUDSEN, B.R.; KERN, K.; DESIDERI, A.; BALASUBRAMANIAN, K. Real-Time Label-free direct electronic monitoring of topoisomerase enzyme binding kinetics on graphene. **ACS Nano**, v. 9, n. 11, p. 11166-11176, 2015.

57.COMPTON, R.G. Saying what we mean. **Electrochemistry Communications**, v. 64, n. 1, p. A1, 2016.

58.IUPAC COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY - the Gold Book.

Graphene Layer. 1997. Disponível

em:<<http://goldbook.iupac.org/GO2683.html>>.Acesso em: 25 maio 2016.

59.CASTRO NETO, A.H.; GUINEA, F.; PERES, N.M.R.; NOVOSELOV, K.S.; GEIM, A.K. The electronic properties of graphene. **Review of Modern Physics**, v. 81, n. 1, p. 109-162, 2009.

60.NOVOSELOV, K.S.; GEIM, A.K.; MOROZOV, S.V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S.V.; GRIGORIEVA, I.V.; FIRSOV, A.A. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.

61.GEIM, A.K.; NOVOSELOV, K.S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.

62.PENG, T.; LV, H.F.; HE, D.P.; PAN, M.; MU, S.C. Direct transformation of amorphous silicon carbide into graphene under low temperature and ambient pressure. **Scientific Reports UK**, v. 3, n. 5777, p. 3, 2013.

63.BERGER, C.; SONG, Z.M.; LI, X.B.; WU, X.S.; BRWON, N.; NAUD, C.; MAYOU, D.; LI, T.B.; HASS, J.; MARCHENKOV, A.N.; CONRAD, E.H.; FIRST, P. N.; dE HEER, W.A. Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1191-1196, 2004.

64.REINA, A.; JIA, X.T.; HO, J.; NEZICH, D.; SON, H.B.; BULOVIC, V.; DRESSSELHAUS, M.S.; KONG, J. Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. **Nano Letters**, v. 9, n. 1, p. 30-35.

65.MATTEVI, C.; EDA, G.; AGNOLI, S.; MILLER, S.; MKHOYAN, K.A.; Celik, O.; MASTROGIOVANNI, D.; GRANOZZI, G.; GARFUNKEL, E.; CHHOWALLA, M. Evolution of electrical, chemical, and structural properties of transparent and conducting chemically derived graphene thin films. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 16, p. 2577-2583, 2009.

66.GOODMAN, D.W.; YATES, J.T. Co isotopic mixing measurements on nickel - evidence for irreversibility of Co dissociation. **Journal of Catalysis**, v. 82, n. 2, p. 255-260, 2004.

- 67.LI, X.S.; CAI, W.W.; AN, J.H.; KIM, S.; NAH, J.; YANG, D.X.; PINER, R.; VELAMAKANNI, A.; JUNG, I.; TUTUC, E.; BANERJEE, S.K.; COLOMBO, L.; RUOFF, R.S. Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1312-1314, 2009.
- 68.VAARI, J.; LAHTINEN, J.; HAUTOJARVI, P. The adsorption and decomposition of acetylene on clean and K-covered Co(0001). **Catalysis Letters**, v. 44, n. 2, p. 1-2, 1997.
- 69.UETA, H.; SAIDA, M.; NAKAI, C.; YAMADA, Y.; SASAKI, M.; YAMAMOTO, S. Highly oriented monolayer graphite formation on Pt(111) by a supersonic methane beam. **Surface Science**, v. 560, n. 1, p. 1-3, 2004.
- 70.GALL, N.R.; RUTKOV, E.V.; TONTEGOD, A.Y. Interaction of silver atoms with iridium and with a two-dimensional graphite film on iridium: Adsorption, desorption, and dissolution. **Physics Solid State**, v. 46, n. 2, p. 371-377, 2004.
- 71.SUTTER, P.W.; FLEGE, J.I.; SUTTER, E.A. Epitaxial graphene on ruthenium. **Nature Materials**, v. 7, n. 5, p. 406-411, 2008.
- 72.LI, X.S.; CAI, W.W.; COLOMBO, L.; RUOFF, R.S. Evolution of graphene growth on Ni and Cu by carbon isotope labeling. **Nano Letters**, v. 9, n. 12, p. 4268-4272, 2009.
- 73.SONG, J.; KAM, F.Y.; PNG, R.Q.; SEAH, W.L.; ZHUO, J.M.; LIM, G.K.; HO, P.K.H.; CHUA, L.L. A general method for transferring graphene onto soft surfaces. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 356-362, 2013.
- 74.LAVIN-LOPEZ, M.P.; VALVERDE, J.L.; GARRIDO, A.; SANCHEZ-SILVA, L.; MARTINEZ, P.; ROMERO-IZQUIERDO, A. Novel etchings to transfer CVD-grown graphene from copper to arbitrary substrates. **Chemistry Physics Letters**, v. 614, n. 4, p. 89-94, 2014.
- 75.CHEN, J.H.; JANG, C.; XIAO, S.D.; ICHIGAMI, M.; FUHER, M.S. Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on SiO₂. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 206-209, 2008.
- 76.MOSER, J.; BARREIRO, A.; BACHTOLD, A. Current-induced cleaning of graphene. **Applied Physics Letters**, v. 91, n. 16, p. 472-476, 2007.

77.AMBROSI, A.; PUMERA, M. The CVD graphene transfer procedure introduces metallic impurities which alter the graphene electrochemical properties. **Nanoscale**, v. 6, n. 1, p. 472-476, 2014.

78.SLJUKIC, B.; BANKS, C.E.; COMPTON, R.G. Iron oxide particles are the active sites for hydrogen peroxide sensing at multiwalled carbon nanotube modified electrodes. **Nano Letters**, v. 6, n. 7, p. 1556-1558, 2006.

79.SLJUKIC, B.; BANKS, C.E.; COMPTON, R.G. Iron oxide particles are the active sites for hydrogen peroxide sensing at multiwalled carbon nanotube modified electrodes. **Nano Letters**, v. 6, n. 7, p. 1556-1558, 2006.

80.JURKSCHAT, K.; JI, X.B.; CROSSLEY, A.; COMPTON, R.G.; BANKS, C.E. Super-washing does not leave single walled carbon nanotubes iron-free. **Analyst**, v. 132, n. 1, p. 21-23, 2007.

81.BANKS, C.E.; CRESSLEY, A.; SALTER, C.; WILKINS, S.J.; COMPTON, R.G. Carbon nanotubes contain metal impurities which are responsible for the "electrocatalysis" seen at some nanotube-modified electrodes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 16, p. 2533-2537, 2006.

82.MASA, J.; ZHAO, A.Q.; XIA, W.; SUN, Z.Y.; MEI, B.; MUHLER, M.; SCHUHMANN, W. Trace metal residues promote the activity of supposedly metal-free nitrogen-modified carbon catalysts for the oxygen reduction reaction. **Electrochemistry Communications**, v. 34, n. 1, p. 113-116, 2013.

83.WANG, L.; AMBROSI, A.; PUMERA, M. "Metal-Free" Catalytic oxygen reduction reaction on heteroatom-doped graphene is caused by trace metal impurities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 51, p. 13818-13821, 2013.

84.IOST, R.M.; CRESPILOHO, F.N.; ZUCCARO, L.; YU, H.K.; WODTKE, A.M.; KERN, K.; BALASUBRAMANIAN, K. Enhancing the electrochemical and electronic performance of CVD-Grown graphene by minimizing trace metal impurities. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 12, p. 2070-2074, 2014.

85.YU, H.K.; BALASUBRAMANIAN, K.; KIM, K.; LEE, J.L.; MAITI, M.; ROPERS, C.; KRIEG, J.; KERN, K.; WODTKE, A.M. Chemical vapor deposition of graphene on a "Peeled-Off" epitaxial Cu(111) foil: A simple approach to improved properties. **ACS Nano**, v. 8, n. 8, p. 8636-8643, 2014.

86. ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Physical chemistry**. 8 ed. Oxford: WH Freeman, 2006, 997 p.
87. YUAN, W.J.; ZHOU, Y.; LI, Y. R.; LI, C.; PENG, H. L.; ZHANG, J.; LIU, Z. F.; DAI, L. M.; SHI, G.Q. The edge- and basal-plane-specific electrochemistry of a single-layer graphene sheet. **Scientific Reports UK**, v. 3, p. 1-7, 2013.
88. TROMANS, D.; SUN, R.H. Anodic polarization behavior of copper in aqueous chloride benzotriazole solutions. **Journal of Electrochemical Society**, v. 138, n. 11, p. 3235-3244, 1991.
89. LEE, H.P.; NOBE, K. Kinetics and mechanisms of Cu-electrodissolution in chloride media. **Journal of Electrochemical Society**, v. 133, n. 10, p. 2035-2043, 1986.
90. BJORNDHAL, W.D.; NOBE, K. Copper corrosion in chloride media - effect of oxygen. **Corrosion**, v. 40, n. 2, p. 82-87, 2010.
91. TUINSTRA, F.; KOENIG, J.L. Raman spectrum of graphite. **Journal of Chemical Physics**, v. 53, n. 3, p. 1126-&, 2010.
92. CANÇADO, L.G.; JORIO, A.; FERREIRA, E.H.M.; STAVALE, F.; ACHETE, C.A.; CAPAZ, R.B.; MOUTINHO, M.V.O.; LOMBARDO, A.; KULMALA, T.S.; FERRARI, A.C. Quantifying defects in graphene via raman spectroscopy at different excitation energies. **Nano Letters**, v. 11, n. 8, p. 3190-3196, 2011.
93. FERRARI, A.C.; BASKO, D.M. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 4, p. 235-246, 2013.
94. HARRIS, D.B., BERTOLUCCI, M.C. **Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy**, 1 ed., New York, 1978, 550 p.
95. LUCCHESI, M.M.; STAVALE, F.; FERREIRA, E.H.M.; VILANI, C.; MOUTINHO, M.V.O.; CAPAZ, R.B.; ACHETE, C.A.; JORIO, A. Quantifying ion-induced defects and Raman relaxation length in graphene. **Carbon**, v. 48, n. 5, p. 1592-1597, 2010.

96. YEHEZKELLI, O.; TEL-VERED, R.; REICHLIN, S.; WILLNER, I. Nano-engineered flavin-dependent glucose dehydrogenase/gold nanoparticle-modified electrodes for glucose sensing and biofuel cell. **ACS Nano**, v. 5, n. 3, p. 2385-2391, 2011.

97. 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, 2014.

98. VILLARUBIA, C.W.N.; ARTYUSHKOVA, K.; GARCIA, S.O.; ATANASSOV, P. NAD(+)/NADH tethering on MWNTs-bucky papers for glucose dehydrogenase-based anodes. **Journal of Electrochemical Society**, v. 161, n. 13, p. H3020-H3028, 2014.

99. VILLARUBIA, C.W.N.; GARCIA, S.O.; LAU, C.; ATANASSOV, P. Biofuel cell anodes integrating NAD(+)-dependent enzymes and multiwalled carbon nanotube papers. **ECS Journal of Solid State Chemistry**, v. 2, n. 10, p. M3156-M3159, 2013.

100. WANG, J.Y.; NIEN, P.C.; CHEN, C. H.; CHEN, L.C.; HO, K. C. A glucose bio-battery prototype based on a GDH/(polymethylene blue) bioanode and a graphite cathode with an iodide/tri-iodide redox couple. **Bioresource Technology**, v. 116, n. 1, p. 502-506, 2012.

101. SCHERBAHN, V.; PUTZE, M.T.; DIETZEL, B.; HEINLEIN, T.; SCHNEIDER, J. J.; LISDAT, F. Biofuel cells based on direct enzyme-electrode contacts using PQQ-dependent glucose dehydrogenase/bilirubin oxidase and modified carbon nanotube materials. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 61, n. 1, p. 631-638, 2014.

102. FLEXER, V.; DURAND, F.; TSUJIMURA, S.; MANO, N. Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 14, p. 5721-5727, 2011.

103. DE SOUZA, J.C.P.; IOST, R.M.; CRESPILOHO, F.N. Nitrated carbon nanoblister for high-performance glucose dehydrogenase bioanodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 77, n. 1, p. 860-865, 2016.

104. SOLOMON, E.I.; AUGUSTINE, A.J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 30, p. 3921-3932, 2008.

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

106.CRACKNELL, J.A.; MCNAMARA, T.P.; LOWE, E.D.; BLANFORD, C.F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O-2 reduction. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 25, p. 6668-6675, 2011.

107.TONDA-MIKIELA, P.; HABRIOUX, A.; BOLAND, S.; SERVAT, K.; TINGRY, S.; KAVANAGH, P.; NAPPORN, T.W.; LEECH, D.; KOKOH, K.B. Oxygen electroreduction catalyzed by bilirubin oxidase does not release hydrogen peroxide. **Electrocatalysis**, v. 2, n. 4, p. 268-272, 2011.

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

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

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

111.MUKAI, K.; NAKANO, H. Factors affecting the volumetric energy density of lithium-ion battery materials: particle density measurements and cross-sectional observations of layered $\text{LiCo}_{1-x}\text{Ni}_x\text{O}_2$ with $0 \leq x \leq 1$. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 13, p. 10583-10592, 2014.

112.YU, D.; GOH, K.; ZHANG, Q.; WEI, L.; WANG, H.; JIANG, W.; CHEN, Y. Controlled functionalization of carbonaceous fibers for asymmetric solid-State micro-supercapacitors with high volumetric energy density. **Advanced Materials**, v. 26, n. 39, p. 6790-6797, 2014.

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

14.0 Publicações no Período do Doutorado

- [1] Iost, R.M.; Crespilho, F.N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 31, p. 1-10, 2012.
- [2] Sales, F.C.P.F.; Iost, R.M.; Martins, M.V.A.; Almeida, M.C.; Crespilho, F.N., **Lab on a Chip**, v. 13, p. 468-474, 2013.
- [3] Melo, A.F.A.A.; Luz, R.A.S.; Iost, R.M.; Nantes, I.L.; Crespilho, F.N., Highly Stable Magnetite Modified with Chitosan, Ferrocene and Enzyme for Application in Magneto-Switchable Bioelectrocatalysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 285-294, 2013.
- [4] Iost, R.M.; Crespilho, F.N.; Zuccaro, L.; Yu, H.K.; Wodtke, A.M.; Kern, K.; Balasubramanian, K. Enhancing the electrochemical and electronic performance of CVD-grown graphene by minimizing trace metal impurities, **ChemElectroChem**, v. 12, p. 2070-2074, 2014.
- [5] Lima, F.C.D.A.; Calzolari, A.; Caldas, M.J.; Iost, R.M.; Crespilho, F.N.; Petrilli, H.M. Electronic Structure of Self-Assembled Monolayers Modified with Ferrocene on a Gold Surface: Evidence of Electron Tunneling. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, p. 23111–23116, 2014.
- [6] Oliveira Jr., O.N.; Iost, R.M.; Siqueira Jr., J.R.; Crespilho, F.N.; Caseli, L. Nanomaterials for Diagnosis: Challenges and Applications in Smart Devices Based on Molecular Recognition. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 140709161410003, 2014.
- [7] de Souza, J.C.P.; Iost, R.M.; Crespilho, F.N.; Nitrated Carbon Nanoblister for high-performance glucose dehydrogenase bioanodes, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 77, p. 860-865, 2016.
- [8] Pereira, A.R.; de Souza, J.C.P.; Iost, R.M.; Sales, F.C.P.F.; Crespilho, F.N. Application of Carbon Fibers to Flexible Enzyme Electrodes, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, *in press*, 2016.

[9] Iost, R.M.; Crespilho, F.N.; Kern, K.; Balasubramanian, K. A primary battery-on-a-chip using monolayer graphene, **Nanotechnology**, v. 27, p. 29LT01, 2016.

15.0 Prêmios e Trabalhos Destacados no Período de Doutorado

[1] Prêmio Pós-Graduação, ano de 2013 - Publicação de maior fator de impacto na área de Físico-Química, IQSC-USP.

[2] Prêmio Pós-Graduação, ano de 2012 - Publicação de maior fator de impacto na área de Físico-Química, IQSC-USP.

[3] Prêmio American Chemical Society (ACS) como um dos melhores trabalhos apresentado na II USP Conference - Nanotechnology, American Chemical Society (ACS), 2012.

[4] Top 25 Hottest Articles from Science Direct “*Layer-by-Layer Self-assembly and Electrochemistry: Application in Biosensing and Bioelectronics*”, Iost, R.M.; Crespilho, F.N., Elsevier, 2013.