Gustavo Pio Marchesi Krall Ciniciato

Desenvolvimento de biocélulas a combustível de glicose/oxigênio em microfluídica

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Rafael Gonzalez

São Carlos - SP

2013

Dedico esta tese e todos os esforços nela depositados à minha melhor amiga, minha irmã Luciana Pio Marchesi Ciniciato. Sem a presença dela em minha vida, nada disto teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ernesto Rafael Gonzalez, meu orientador, por ter confiado e acreditado em meu potencial numa das fases mais difíceis da minha vida acadêmica, quando estava praticamente decidido a desistir da Ciência. Pela orientação desde a época de final de graduação, até aos níveis mais avançados no doutoramento. Por todos os valiosos conselhos que me presenteou, e que eu sei que me ajudarão muito pelo resto de minha vida pessoal e profissional. Por ter me dado a oportunidade de ingressar nesta fascinante área da ciência, chamada de bioeletroquímica;

Ao prof. Dr. Plamen Atanasov, por ter me aceito trabalhar como pesquisador visitante em seu grupo de pesquisa em biocélulas a combustível, no Departamento de Engenharia Química e Nuclear da Universidade do Novo México, Estados Unidos. Pela amizade, por todo o conhecimento que pudemos intercambiar e pelas valiosas aulas sobre política química;

Ao Dr. Luciano dos Santos (Tarzan) e a Dr.^a Carolin Lau, dois amigos e colegas de trabalho, que tiveram forte influência em minha formação pessoal e profissional; e na qualidade do trabalho desenvolvido;

Aos professores do Instituto de Física de São Carlos: Ana Paula Ulian de Araújo, Antonio Ricardo Zanatta, Otavio Henrique Thiemann, Maria Cristina Terrile e aos professores do Instituto de Química de São Carlos: Hamilton Varela, Elisabete Assaf, Albérico Borges Ferreira da Silva, pela grande contribuição na construção dos pilares de conhecimento que me sustentam;

Aos colegas do Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química de São Carlos. Em especial, merecem destaque alguns nomes: ao Dr. Luciano dos Santos, MSc. Adriano Gomes e Dr. Camilo de La Rotta, pela formação da equipe inicial de biocélulas a combustível do IQSC-USP. Também merecem destaques: MSc. Pietro Papa e ao MSc. Bruno Carreira Batista, pelas valiosas discussões científicas;

Aos colegas do grupo de biocélulas a combustível da Universidade do Novo México: Kristen Garcia, Akinbayowa Falase (Bayo), Claudia Narvaez, Jared Roy, Omar Garcia, Rosalba Rincón, Shayna Brocato, Ulises Martinez, Monica Padilla, Michelle Main e Alexey Serov. Também merecem destaques os amigos Alexandre Tacla, George Bezerra, Rafael Varaschin,

Erica Miranda, Nadiezda Oropeza (Nádia) e aos eternos “roomates” Olena Dziuba, Lacie Masi, Margaux Hale, Zackhary Tyler, Ashley Gonzales; e não posso me esquecer dos companheiros Frankie e Dinah, que permitiram um ambiente agradável durante todo o período de vivência nos Estados Unidos;

À minha amiga Dr.^a Saara Tuurala, pesquisadora do VTT Technical Research Centre of Finland, pelas discussões referentes às diferentes Laccases;

Ao meu amigo, prof. Dr. Ruy de Souza Júnior, pela ajuda com as simulações na parte mais inicial do projeto de doutorado;

À minha querida professora, prof.^a Dr.^a Mariângela Tassinari de Figueiredo que, desde os primeiros meses de graduação, já me dizia que eu tinha talento para a ciência e que deveria segui-lá;

Aos amigos da primeira república “Xing Ling”, Felipe Castilho (Mofo), Márcio Rotondo, Marcelo Pereira, Alexandre França (Carioca), Robson Costa (Capixaba) e Ederson Pinheiro (Tchuco);

À minha grande família da república universitária Vopoulos Nopopoulos, que tanto souberam lidar com o meu mau humor, durante o período de doutoramento: Leandro Job Neto (Job), Carlos Chagas (Carlão), Bruno Grill (Tico), Rubens Freires (Urso), Bruno Bertelli (Bruno), Murilo Cassimiro (Piriquito), Eduardo Lourenço (Barata), Diego Antonio (Therms), Caio Ferreira (Febem), Renato Bortolin (B1), Giácomo Righi (Pinça), Felipe Reis (Felipão), Pedro Guazzelli (Robocop), Fábio Fonseca (Fabião), Hystters Kovalski (Hystters), Plínio Santana (Babão), Matheus Marques (Çolói), Raniel Oliveira (Sombra);

À minha família; meus pais Luiz Ciniciato e Solange Pio Marchesi Ciniciato, minhas irmãs Flávia Marchesi Ciniciato e Luciana Pio Marchesi Ciniciato e o meu cunhado, Marco Aurélio de Moraes Fernandes, por terem me permitido um ambiente em que eu pudesse desenvolver toda a minha formação básica pessoal, intelectual, religiosa e profissional;

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento de uma bolsa de doutorado direto (Processo 2008/03414-2);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa PDDE, utilizada para o financiamento do estágio de doutoramento no exterior (Processo BEX 2924/10-2);

À National Science Foundation, na modalidade Research Exposure for Undergrads (REU), pelo financiamento de uma bolsa para o meu primeiro co-orientado, Andrew Cochrane, Engenheiro Mecânico e Elétrico da Universidade do Alaska em Anchorage;

Ao financiamento pelo Departamento de Defesa dos Estados Unidos na modalidade Multidisciplinary University Research Initiative DOD/AFOSR MURI FA9550-06-1-0264: *Fundamentals and Bioengineering of Enzymatic Fuel Cells*.

“Education shall be directed to the full development of the human personality and to the strengthening of respect for human rights and fundamental freedoms. It shall promote understanding, tolerance and friendship among all nations, racial or religious groups, and shall further the activities of the United Nations for the maintenance of peace.”

The Universal Declaration of Human Rights

RESUMO

CINICIATO, G. P. M. K. **Desenvolvimento de biocélulas a combustível de glicose/oxigênio em microfluídica**. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O objetivo principal desta tese foi o de se desenvolver uma biocélula a combustível enzimática em microfluídica, utilizando a glicose como combustível e o oxigênio como oxidante. Foram utilizadas as enzimas Glicose Oxidase ou Glicose Desidrogenase em um bioânodo, de forma a promover reações bioeletrocatalíticas de oxidação da glicose e as enzimas Lacase ou Bilirrubina Oxidase, de forma a promover reações bioeletrocatalíticas de redução do oxigênio molecular. O trabalho se procedeu por tentativas de imobilizar estas enzimas, de forma a promover o mecanismo de transferência eletrônica direta com um eletrodo. Nas situações as quais isso não foi possível, foram utilizados mediadores eletrônicos, de forma a promover o mecanismo de transferência eletrônica mediada. O melhor par de sistemas de bioeletrodos e mediadores foi escolhido para serem aplicados em uma biocélula a combustível. O trabalho se procedeu em adaptar este par de bioeletrodos desenvolvidos para um sistema de microfluídica em papel, sendo ambos biocátodo e bioânodo em papel. Como as condições de concentração de combustível e de cofatores foram otimizadas para o bioânodo, foi necessário trabalhar com os biocátodos, de forma a apresentar as características de um biocátodo respirador, para melhor utilizar o oxigênio presente no ar e a apresentar um desempenho tão bom quanto o dos bioânodos. A biocélula a combustível em papel possibilitou a geração de energia elétrica por até 18 dias, utilizando uma resistência de 1.7 k Ω , nas condições experimentais ideais. De forma a provar o conceito da tecnologia para aplicações reais, a biocélula a combustível em papel foi demonstrada a ter a capacidade de geração de energia elétrica suficiente para fazer um relógio funcionar por pelo menos 36 horas, utilizando a bebida isotônica Gatorade[®], como combustível.

Palavras chaves: Biocélulas a combustível. Bioeletrooxidação da glicose. Bioeletroredução de oxigênio. Microfluídica em papel.

ABSTRACT

CINICIATO, G. P. M. K. **Development of microfluidic glucose/oxygen biofuel cells.** Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The main objective of this thesis is to develop a microfluidic biofuel cell using glucose as the fuel and oxygen as the oxidant. The enzymes Glucose Oxidase or Glucose Dehydrogenase were used in a bioanode to promote the bioelectrocatalytic oxidation of glucose and the enzymes Laccase or Bilirubin Oxidase to promote the bioelectrocatalytic reduction of the molecular oxygen. The work was conducted by attempts to immobilize these enzymes in order to promote the mechanism of direct electron transfer with the electrode. For the situations where this was not observed, mediators were used in a way to promote the mechanism of mediated electron transfer. The best pair of bioelectrodes and mediators was chosen to be applied in a biofuel cell. The work was carried out to adapt this pair of developed bioelectrodes to a paper based microfluidic system, using both biocathode and bioanode in a paper-like design. As the conditions for concentration of fuel and cofactors were optimized for the bioanode, it was necessary to work on these biocathodes so as to have the characteristics of an air-breathing biocathode for a better use of the oxygen present in the air and to work with a performance as good as the bioanode. The paper based biofuel cell enabled the generation of electricity for up to 18 days using a resistance of 1.7 k Ω within the optimum experimental conditions. In order to prove the concept of this technology for real applications, the paper based biofuel cell was demonstrated to have the capacity for generation of enough electrical energy to power up a clock for at least 36 hours using the isotonic drink Gatorade[®] as fuel.

Keywords: Biofuel cells. Bioelectrooxidation of glucose. Bioelectroreduction of oxygen. Paper-based microfluidics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Matriz de Energia Elétrica Brasileira. Capacidade instalada.....	2
Figura 2: Esquema de funcionamento de uma célula a combustível do tipo PEMFC	5
Figura 3: Figura representando (a): mecanismo de transferência eletrônica direta e (b) mecanismo de transferência mediada.	10
Figura 4: Desenho da meia célula eletroquímica em papel. I representa o suporte eletródico, II e III representam os diferentes materiais que podem compor a camada catalítica, IV é a malha de platina utilizada como contra-eletrodo, V é o eletrodo de referência e VI é o filme plástico utilizado para manter as camadas unidas. A estrutura maior em branco representa a boma estática, utilizada também como separador entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo	27
Figura 5: Reação de oxidação da glicose catalisada pela enzima Glicose Oxidase	31
Figura 6: Estrutura de uma das subunidades da Glicose Oxidase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Glicose Oxidase de <i>Aspergillus niger</i> , com o número de identificação 1CF3	31
Figura 7: Estrutura química da quitosana apresentando as unidades desacetiladas (I) e acetiladas (II)	32
Figura 8: Reações do glutaraldeído com terminações amina presente na estrutura proteica de enzimas (Enz), em meio ácido e neutro.....	33
Figura 9: Estrutura da Glicose Oxidase apresentando as terminações lisina (em vermelho) e o cofator FAD (em azul).....	34
Figura 10: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de tecido de carbono modificado com os compósitos de quitosana e pó de grafite (quit-graf) e Carbono Vulcan (quit-CV), com e sem Glicose Oxidase, em solução 0,1 M tampão fosfato de sódio pH 5.5, desaerado, contendo 1 mM de glicose a 50 mV s ⁻¹	35

Figura 11: Estrutura e reações de oxirredução envolvendo o FAD.....	36
Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura dos compósitos quit-graf (A) e quit-CV (B).....	38
Figura 13: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de tecido de carbono modificado com os compósitos de quitosana, Carbon Vulcan e Glicose Oxidase (quit-CV-GOx), em solução 0,1 M tampão fosfato de sódio pH 5.5, aerada, contendo 1 mM de glicose a 50 mV s^{-1}	39
Figura 14: Esquema de uma reação eletrocatalítica heterogênea, envolvendo processos ocorrendo no seio da solução (bulk), na região interfacial (sup), um intermediário (int) e possíveis processos de adsorção (ads)	41
Figura 15: Estruturas e voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro em solução tampão fosfato de sódio desaerado, 0,1 M, pH 5,5, contendo 1 mM de: Azul de Bromofenol, Vermelho de Fenol, Azul de Bromotimol, Verde de Bromocresol e Vermelho de Metila. Experimentos eletroquímicos realizados a 50 mV s^{-1}	42
Figura 16: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M desaerado pH 5.5, contendo 1 mM de Verde de Bromocresol, variando-se a velocidade de varredura	46
Figura 17: Relação entre os valores de corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para o Verde de Bromocresol.....	47
Figura 18: Estrutura química do VBc: (i) totalmente protonado, (ii) parcialmente protonado e (iii) desprotonado.....	48
Figura 19: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro, em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M sob diferentes valores de pH, desaerado. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de VBc e a 50 mV s^{-1}	49
Figura 20: Possível processo total redox envolvendo o VBc	50
Figura 21: Espectros de infravermelho do Verde de Bromocresol depois de saltos potencioestáticos para reduzi-lo (-750 mV) e oxidá-lo (-500 mV)	51

Figura 22: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro com o sistema VBC/Glicose Oxidase/glicose, sob diferentes valores de concentração de Verde de Bromocresol, em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,5, desaerado e a 50 mV s^{-1}	53
Figura 23: Esquema do processo redox glicose/Glicose Oxidase/Verde de Bromocresol	54
Figura 24: Curvas de potência de diferentes mediadores para a Glicose Oxidase, estudados por LA ROTTA e colaboradores. BCG representa o Verde de Bromocresol	55
Figura 25: Estrutura química dos ferrocenos utilizados neste trabalho: (A) Ferroceno; (B) Ferroceno carboxaldeído e (C) Ferroceno ácido carboxílico	56
Figura 26: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro contendo FC em solução. Experimentos realizados em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1}	57
Figura 27: Mecanismo de oxidação do ferroceno para o cátion ferricínio (FC_{oxi})	58
Figura 28: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro, contendo FAC em solução. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FAC em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1}	59
Figura 29: Efeito de grupos funcionais na densidade de carga sobre o átomo de ferro da molécula de ferroceno, dimetil ferroceno e decametil ferroceno com o potencial de oxidação, segundo trabalhos de Makal e colaboradores; e Clegg e colaboradores	61
Figura 30: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro, contendo FCA em solução. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FCA em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1}	62
Figura 31: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FC, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1}	63
Figura 32: Mecanismo de reação anódica mediada do FC com a Glicose Oxidase	64

Figura 33: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FC, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 1 mV s^{-1}	65
Figura 34: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FAC, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1}	66
Figura 35: Estrutura de cargas superficiais de uma das subunidades da Glicose Oxidase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Glicose Oxidase de <i>Aspergillus niger</i> , com o número de identificação 1CF3. A seta indica o sítio ativo da GOx	67
Figura 36: Estruturas dos resíduos de aminoácidos carregados negativamente	67
Figura 37: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FCA, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1}	68
Figura 38: Mecanismo de competição entre o FC e o O_2 para a regeneração da Glicose Oxidase	69
Figura 39: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FC, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M aerado e desaerado e a 50 mV s^{-1}	70
Figura 40: Estrutura da Glicose Desidrogenase obtida do RCSB PDG. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Glicose Desidrogenase de <i>Bacillus megaterium</i> , com o número de identificação IWG3	73
Figura 41: Experimentos de voltametria cíclica do VMet em solução, fora da região de eletrodeposição. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0 desaerada, com 0,5 mM de VMet e 0,1 M de KNO_3 . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	75

Figura 42: Eletrodeposição do VMet sobre a superfície de carbono vítreo por voltametria cíclica. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0 desaerada, com 0,5 mM de VMet e 0,1 M de KNO ₃ . Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	76
Figura 43: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de uma fibra do papel Toray contendo o Verde de Metileno depositado	77
Figura 44: Espectro de EDS do aglomerado depositado sobre a fibra do papel Toray apresentado na Figura 43	77
Figura 45: Experimentos de voltametria de varredura linear para a oxidação do NADH utilizando PVMet em papel Toray. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0. Velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹	78
Figura 46: Reações de oxidação e de redução envolvendo o NAD.....	79
Figura 47: Reações em cascata envolvendo a oxidação da glicose pela GDh, o NADH e o VMet sobre a superfície do papel Toray	80
Figura 48: Imagens de microscopia eletrônica de varredura do (A) papel Toray e (B) papel Toray com a solução de quitosana.....	81
Figura 49: Resultado de cronoamperometria, adicionando glicose em solução. Experimentos realizados com a aplicação de um potencial de 0.2 V. Adição de 10 mM de glicose a cada 300 s, em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 100 µM de NAD ⁺	82
Figura 50: Resultado de cronoamperometria, adicionando NAD ⁺ em solução. Experimentos realizados com a aplicação de um potencial de 0.2 V. Adição de 100 µM de NAD ⁺ a cada 150 s, em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 100 mM de glicose	82
Figura 51: Voltamogramas cíclicos do papel Toray contendo PVMet eletrodepositada e Glicose Desidrogenase imobilizada em quitosana. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 desaerada com 900 µM de NAD ⁺ e 90 mM de glicose. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . I representa 10 ciclos e II representa 50 ciclos adicionais.....	83
Figura 52: Resultado de curva de polarização do bioânodo contendo GDh em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 µM de NAD ⁺	85

Figura 53: Posição e nomenclatura dos átomos de cobre (esferas azuis) presentes no sítio ativo da Lac. Entre os átomos de cobre T1 e T3 é apresentado o tripeptídeo His-Cys-His conectando o átomo de cobre T1 com o aglomerado T2/T3	87
Figura 54: Estrutura da Lacase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software Pymol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Lacase de <i>Trametes versicolor</i> , com o número de identificação 1GYC	88
Figura 55: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro inserido ao sistema de eletrodo rotatório. Solução de tampão acetado de sódio pH 4.5 aerada com 1 mg de Lacase e 0,15 mM ABTS. Velocidade de varredura de 2 mV s ⁻¹ a diferentes velocidades de rotação	90
Figura 56: Voltametria cíclica do eletrodo de ouro, com a adição de 0.15 mM de ABTS na solução em tampão acetado de sódio pH 4.5, a diferentes velocidades de varredura	91
Figura 57: Relação entre a corrente de pico catódico e anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para as reações em estudo envolvendo o ABTS	92
Figura 58: Voltamogramas cíclicos do ABTS em carbono vítreo, sob diferentes janelas de potencial. Experimentos em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M aerado.....	94
Figura 59: Processo redox envolvendo o ABTS, envolvendo um e dois elétrons, de acordo com Branchi e colaboradores	95
Figura 60: Estrutura da Bilirrubina Oxidase obtida do RCSB PDG. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Bilirrubina Oxidase de <i>Myrothecium verrucaria</i> , com o número de identificação 3ABG.....	96
Figura 61: Voltametria cíclica do papel Toray contendo 1 mg de BOx adsorvida. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0 aerada e desaerada. Velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ ..	97
Figura 62: Sítio T1 da BOx e os aminoácidos em suas redondezas	98
Figura 63: Resultados de curva de polarização do biocátodo contendo BOx. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7 aerada contendo 90 mM de glicose e 900 µM de NAD ⁺	99

Figura 64: Medidas de potencial de circuito aberto (OCV) para o biocátodo, bioânodo e diferença de potencial (ddp) para a biocélula a combustível. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerado contendo 90 mM de glicose e 900 μ M de NAD^+	102
Figura 65: Curvas de polarização para o biocátodo, bioânodo e para a biocélula a combustível. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerado contendo 90 mM de glicose e 900 μ M de NAD^+	103
Figura 66: Curvas de potência para a biocélula a combustível em solução. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerado contendo 90 mM de glicose e 900 μ M de NAD^+	105
Figura 67: Fotos demonstrando o fluxo de uma solução contendo verde de metileno concentrado (aqui utilizado como corante) sobre a célula em papel	106
Figura 68: Esquema e foto do biocátodo em papel no formato de cartão	108
Figura 69: Potenciais de circuito aberto do biocátodo no formato de cartão com e sem BOx.....	109
Figura 70: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel, no formato de cartão. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.....	110
Figura 71: Foto da biobateria funcionando com seis pares de bioeletrodos no formato de cartão e gerando energia a partir da oxidação de etanol e redução de oxigênio presente no ar, para o funcionamento de um relógio, como demonstração	111
Figura 72: Medidas de comprimento em cm e de área em cm^2 do suporte de papel Toray utilizado para preparação dos bioeletrodos em papel.....	112
Figura 73: Esquema dos biocátodos em papel XC35/HBL.....	113
Figura 74: Imagens de microscopia de um corte transversal do biocátodo em papel na configuração XC35/HBL.....	114

Figura 75: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel XC35/HBL. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.....	115
Figura 76: Esquema dos biocátodos em papel XC35	117
Figura 77: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.....	117
Figura 78: Experimento de estabilidade temporal do potencial de circuito aberto para o biocátodo em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0	118
Figura 79: Experimento de estabilidade temporal de corrente para o biocátodo em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0	119
Figura 80: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de (A) uma fibra única do papel Toray e (B) o material HcBP, em mesma magnitude de amplificação	121
Figura 81: Esquema dos biocátodos em papel XC35/HcBP	123
Figura 82: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel XC35/HcBP, em comparação com os biocátodos em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.....	123
Figura 83: Esquema de um biocátodo respirador mostrando a zona de contato de tripla fase e uma foto de microscopia mostrando uma partícula de XC35	125
Figura 84: Curvas de polarização para o biocátodo, bioânodo e para a biocélula a combustível em papel. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+	126
Figura 85: Curvas de potência para a biocélula a combustível em papel. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+	128

Figura 86: Experimento de tempo de vida da biocélula a combustível em papel funcionando com uma resistência de 1.7 k Ω . A solução adicionada sobre a placa de Petri foi uma solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μ M de NAD⁺. (i) indica quando a célula foi conectada a resistência, (ii) indica que mais solução foi adicionada na placa de Petri, (iii) indica que a bomba estática foi trocada e (iv) indica quando a resistência foi desligada da biocélula a combustível 129

Figura 87: Esquema da biocélula a combustível em papel com três pares de eletrodos, mostrando as conexões internas, as placas de plástico e a separação em três sessões 131

Figura 88: Experimento de tempo de vida da biocélula a combustível em papel, com três pares de eletrodos, funcionando com Gatorade® contendo 900 μ M de NAD⁺ e funcionando em um relógio com resistência de 1.7 k Ω . (i) indica quando o relógio foi conectado, (ii) indica quando mais solução foi adicionada a placa de Petri, (iii) indica quando a bomba estática secou e o (iv) indica quando o relógio foi desconectado 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de valores de potencial formal de redução de algumas meia-reações biológicas importantes, em pH 7,0 e 25°C	7
Tabela 2: Especificidade da Glicose Desidrogenase e Glicose Oxidase quanto a outros carboidratos, com relação à β -D-glicose. Os traços “-” indicam que o experimento com tal substrato e enzima não foi realizado.....	72
Tabela 3: Valores de corrente e potencial de pico, com relação a velocidade de varredura para as reações envolvendo o ABTS	93

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área superficial
ABf	Azul de Bromofenol
ABt	Azul de Bromotimol
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
BC	Biocélula a Combustível
BCE	Biocélula a Combustível Enzimática
BCM	Biocélula a Combustível Microbiana
BOx	Bilirrubina Oxidase
C	Concentração de uma espécie
Cp	Ciclopentadienílico
D	Coeficiente de difusão
EPH	Eletrodo Padrão de Hidrogênio
Ep	Potencial de pico
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FC	Ferroceno
FCA	Ferroceno carboxaldeído
FAC	Ferroceno ácido carboxílico
FC _{oxi}	Cátion ferricínio
GOx	Glicose Oxidase
GWh	Gigawatt-hora

HBL	Hydrophilic Biocatalytic Layer
ip	Corrente de pico
k_{cat}	Constante cinética catalítica
K_M	Constante de Michaelis
Lac	Lacase
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
$NADP^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
n	Número de elétrons
NP	Nanopartícula
PEMFC	Próton Exchange Membrane Fuel Cell
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PVMet	Poly-Verde de Metileno
quit-graf-GOx	Compósito de quitosana, pó de grafite e Glicose Oxidase
quit-CV-GOx	Compósito de quitosana, Carbono Vulcan e Glicose Oxidase
TED	Mecanismo de Transferência eletrônica direta
TEM	Mecanismo de Transferência eletrônica mediada
v	Velocidade de varredura
VBc	Verde de Bromocresol
VF	Vermelho de Fenol
VM	Vermelho de Metila
VMet	Verde de Metileno

SUMÁRIO

Prefácio

1 Introdução	1
1.1 Energia e meio ambiente no século 21	1
1.2 Células a combustível	3
1.3 Biocélulas a combustível	6
1.4 Mecanismos de transferência eletrônica	8
1.5 Biocélula a combustível de glicose/oxigênio	10
2 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 O surgimento das biocélulas a combustível	13
2.2 Imobilização enzimática via hidrogéis redox condutores	14
2.3 Imobilização enzimática via reconstituição de cofatores	15
2.4 Oxidação de desidrogenases por azinas	17
2.5 Biocélula a combustível de H ₂ /O ₂	18
3 Justificativa e Objetivos	21
4 Materiais e Métodos	23
4.1 Reagentes.....	23
4.2 Célula Eletroquímica	24
4.3 Preparações dos eletrodos de ouro e carbono vítreo.....	25
4.4 Preparação dos eletrodos de tecido de carbono contendo o compósito.....	25
4.5 Preparação dos bioeletrodos em papel.....	26
4.6 Experimentos com a célula eletroquímica em papel	26
5 Resultados e Discussão	29
5.1 Reações de bioeletrooxidação da glicose	29
5.1.1 Estudos bioeletroquímicos envolvendo a enzima Glicose Oxidase	29
5.1.2 Mediadores eletrônicos para a enzima Glicose Oxidase: Indicadores de pH.....	40
5.1.3 Mediadores eletrônicos para a enzima Glicose Oxidase: Ferrocenos	56
5.1.4 Envenenamento do bioânodo com a enzima Glicose Oxidase em O ₂	69
5.1.5 Estudos bioeletroquímicos envolvendo a enzima Glicose Desidrogenase	71

5.1.6 Eletrodeposição do Verde de Metileno e oxidação do NADH.....	74
5.2 Reações de bioeletroredução do oxigênio molecular	86
5.2.1 Estudos bioeletroquímicos envolvendo as enzimas Lacases.....	86
5.2.2 Estudos bioeletroquímicos envolvendo a enzima Bilirrubina Oxidase.....	95
5.3 Biocélula a combustível	100
5.4 Biocélula a combustível em papel	105
5.4.1 Biocátodo em papel no formato de cartão	107
5.4.2 Biocátodo em papel – XC35/HBL.....	112
5.4.3 Biocátodo em papel – XC35.....	116
5.4.4 Biocátodo em papel – XC35/HcBP	120
5.5 Biocélula a combustível em papel funcionando com Gatorade®	130
6 Conclusões	135
7 Referências Bibliográficas	149

1 Introdução

1.1 Energia e meio ambiente no século 21

O século 21 representa um período de grandes avanços tecnológicos para a humanidade. O uso de computadores e outros aparelhos eletrônicos deixaram de serem apenas objetos de uso pessoal e passaram a fazer parte ativamente na vida das pessoas, em todos os níveis da sociedade. Tais avanços são responsáveis por um crescente aumento na demanda de energia elétrica. O consumo de energia elétrica total no Brasil, por exemplo, foi de 42.594, 44.362 e 45.209 GWh, para o mês de Janeiro nos anos de 2010, 2011 e 2012, respectivamente. Houve um aumento de 6% do consumo de energia total em apenas três anos (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2012, p. 12). A geração e distribuição de energia elétrica de forma eficiente e de boa qualidade são pontos críticos e prioritários para uma sociedade que se tornou tão dependente da mesma.

A necessidade da utilização de novas formas de geração de energia elétrica segue não somente a crescente demanda energética, mas também uma forte tendência para que esta geração de energia seja renovável e verde. Problemas ambientais como a abertura na camada de ozônio, aquecimento global, efeito estufa e em alguns casos até o desmatamento e a desertificação de áreas florestais, incluindo também a geração de lixo e poluição, são temas que têm sido cada vez mais debatidos. Como resultado disso, tem-se o início de um processo de conscientização ambiental, onde as atitudes do homem com relação à natureza passam a ser de fundamental importância para a manutenção da mesma. Centenas de organizações não governamentais foram criadas com o objetivo de proteger e preservar o meio ambiente.

Considerando energia e meio ambiente como sendo temas de extrema importância a nível mundial, as Nações Unidas realizaram em junho de 2012, na cidade do Rio de Janeiro, a “United Nations Conference on Sustainable Development”, também conhecida como Rio+20, cujo objetivo era debater sobre a renovação do compromisso político dos países membros com o desenvolvimento sustentável. O parágrafo 125 do relatório final deste evento descreve

o reconhecimento e a preocupação pelos países membros com o tema “energia e meio ambiente” e a sua influência no cenário mundial, principalmente quanto à qualidade de vida:

We recognize the critical role that energy plays in the development process, as access to sustainable modern energy services contributes to poverty eradication, saves lives, improves health and helps provide for basic human needs. We stress that these services are essential to social inclusion and gender equality, and that energy is also a key input to production. We commit to facilitate support for access to these services by 1.4 billion people worldwide who are currently without them. We recognize that access to these services is critical for achieving sustainable development. (UNITED NATIONS, 2012, p. 24).

Existem atualmente várias formas de geração de energia limpa e renovável. As formas de geração de energia limpa que se têm mais destaque são as energias solar, eólica e hidráulica. A geração de energia por biomassa também poderia ser incluída nesta lista, mas, apesar de renovável, é uma forma de geração de energia bastante questionável, do ponto de vista ambiental. O Brasil é um país que apresenta um elevado grau de geração de energia limpa e renovável. A base da geração de energia nacional tem como fonte principal a via hidráulica, a partir de suas hidrelétricas (Figura 1).

Figura 1 – Matriz de Energia Elétrica Brasileira. Capacidade Instalada.

FONTE: MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2012.

Dentre estas formas de geração de energia apresentadas, a energia solar e eólica se apresentam como as formas de geração de energia com maior grau de renovabilidade. A energia vinda do sol e dos ventos pode ser considerada como vinda de “combustíveis” inesgotáveis. Apesar disto, estes dois sistemas requerem condições geográficas especiais para um bom funcionamento. A geração de energia solar é restrita a certos locais cuja latitude permita um ângulo de incidência solar ideal, além de um maior número de horas solares. Da mesma forma, a geração de energia eólica está restrita a locais onde a pressão frontal do vento apresenta uma velocidade alta suficiente para mover as pás do coletor de forma eficiente. A energia hidráulica pode ser considerada também uma forma de energia limpa, onde a fonte de geração de energia se dá pela força mecânica de rios e mares, mas no caso das hidrelétricas, o impacto ambiental resultante do desvio do curso de rios não pode ser desconsiderado.

Uma forma de geração de energia de alta eficiência, que independe de restrições geográficas ou climáticas, é reconhecida por ser uma tecnologia de geração de energia de forma limpa e por funcionar com combustíveis renováveis são as células a combustível.

1.2 Células a combustível

Células a combustível são sistemas de conversão de energia, tendo como princípio de funcionamento a combustão eletroquímica de um combustível e a redução eletroquímica de um oxidante. Diferente de outros dispositivos de geração de energia elétrica por via eletroquímica, o combustível é adicionado continuamente à célula eletroquímica e o oxigênio, geralmente presente no ar atmosférico, atua como oxidante.

Numa célula a combustível convencional, o combustível utilizado é o hidrogênio, que é oxidado no ânodo (i), produzindo elétrons que vão realizar trabalho útil externamente e prótons que são transportados pelo eletrólito. O oxigênio é reduzido no cátodo (ii), utilizando os elétrons provenientes deste circuito externo e os prótons formados no ânodo, produzindo água como produto final (KORDESH; SIMADER, 1996)

As células a combustível são tradicionalmente classificadas adotando-se o eletrólito como critério de referência. Assim, podemos encontrar atualmente as células de ácido fosfórico, alcalinas, de eletrólito polimérico, de carbonatos fundidos e de óxidos sólidos. Dentre estas, as células que mais se destacam quanto à aplicabilidade são as células a combustível de eletrólito polimérico, onde o eletrólito é uma membrana condutora de prótons (Próton Exchange Membrane Fuel Cell – PEMFC). O funcionamento operacional destas células se dá a baixas temperaturas (próximas de 80 °C), sendo utilizado hidrogênio com baixo teor de CO (menor que 10 ppm), como combustível, e o oxigênio presente no ar atmosférico como oxidante. Devido à capacidade de atingir elevadas densidades de potência, são as mais indicadas para utilização em veículos elétricos e estações de geração de eletricidade (TICIANELLI; GONZALEZ, 1989).

O esquema de uma célula a combustível do tipo PEMFC é apresentado na Figura 2, onde o hidrogênio é oxidado cataliticamente no ânodo, de acordo com a reação (i), prótons são transportados pela membrana condutora de prótons até o cátodo, onde o oxigênio é reduzido cataliticamente, de acordo com a reação (ii).

Figura 2: Esquema do funcionamento de uma célula a combustível do tipo PEMFC.

Existem vantagens ambientais que as células a combustível levam frente aos sistemas de geração de energia que funcionam por via de combustão direta, principalmente pela não necessidade de altas temperaturas para operação, o que evita a produção de compostos tóxicos tais como NO_x e SO_x. Além disso, células a combustível apresentam alta eficiência de operação (tipicamente 50-60%) em comparação a motores de combustão interna (20-25%) (RAO et al., 2004). Uma comparação mais direta foi feita por McDougall, onde foi demonstrado que uma célula a combustível convencional apresenta um desempenho superior a qualquer motor por aquecimento convencional a temperaturas abaixo de 850 °C, enquanto que acima deste valor de temperatura, células a combustível não apresentariam nenhuma vantagem e, de fato, estações de geração de eletricidade por via térmica seriam muito mais eficientes (McDOUGALL, 1976). A limitação, neste caso, fica na utilização de materiais que permitiriam a operação a altas temperaturas, enquanto que, as células a combustível convencionais funcionam a alta eficiência sem esse tipo de restrição, pelo fato de operarem a baixas temperaturas (LUTZ et al., 2002).

Para este sistema, geralmente são necessários catalisadores metálicos, envolvendo as reações (i) e (ii), apresentadas anteriormente. No caso da oxidação do hidrogênio, os catalisadores utilizados geralmente são ligas contendo Pt, pela sua capacidade de adsorver o reagente, aumentando assim a probabilidade de se atingir uma situação energética favorável à

transferência de carga, em temperaturas não muito acima da ambiente. No caso da redução do oxigênio, devido a cinética lenta desta reação, muito se tem trabalhando quanto a busca de catalisadores eficientes, envolvendo materiais contendo Pt, Pd e Co, por exemplo (LIMA, 2006).

1.3 Biocélulas a combustível

Uma alternativa às células a combustível convencionais são as biocélulas a combustível (BC). Neste caso, são utilizados sistemas biológicos de forma a promover reações bioeletroquímicas, as quais possam permitir a conversão de energia química em energia elétrica. Estes sistemas biocatalíticos são utilizados em substituição aos catalisadores metálicos convencionais. São várias as vantagens que as BC têm frente às células a combustíveis convencionais, como: a utilização de substratos de baixa toxicidade e vindos de fontes renováveis, como glicerina, a glicose ou alguns álcoois; o sistema pode ser construído sem o uso de metais nobres, diminuindo o custo final do dispositivo; geralmente funcionam em condições moderadas de pH e temperatura (pH próximo do neutro e temperatura ambiente); possuem alta seletividade quanto às reações de interesse, evitando produtos indesejáveis, além de evitar também o problema de crossover do combustível, fenômeno comumente observado em células a combustível de álcool direto (PAGANIN et al., 2005); e o sistema pode ser projetado de forma a promover reações em cascata, utilizando várias enzimas em série, de forma a aproveitar ao máximo o conteúdo energético do combustível primário.

A Tabela 1 apresenta uma lista dos valores de potencial formal de redução de algumas meia-reações biológicas a pH 7.0, 25°C e utilizando o Eletrodo Padrão de Hidrogênio (EPH) como referência. Pode-se observar que existe um grande número de reações que pode ser utilizadas para se desenvolver bioeletrodos para biocélulas a combustível que vão desde reações ideais para serem aplicadas a bioânodos, como as reações envolvendo os cofatores FAD, NAD⁺ ou NADP⁺, por apresentarem altos valores negativos de potencial formal de redução, e reações ideais para serem aplicadas a biocátodos, como as reações envolvendo a

ubiquinona (Coenzima Q10) ou os citocromos, por apresentarem altos valores de potencial formal de redução.

Tabela 1: Tabela de valores de potencial formal de redução de algumas meia-reações biológicas importantes, em pH 7.0 e 25°C

Half-reaction	E'° (V)
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.816
$\text{Fe}^{3+} + e^- \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$	0.771
$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	0.421
Cytochrome <i>f</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>f</i> (Fe^{2+})	0.365
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (ferricyanide) + $e^- \longrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	0.36
Cytochrome <i>a</i> ₃ (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>a</i> ₃ (Fe^{2+})	0.35
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0.295
Cytochrome <i>a</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>a</i> (Fe^{2+})	0.29
Cytochrome <i>c</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>c</i> (Fe^{2+})	0.254
Cytochrome <i>c</i> ₁ (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>c</i> ₁ (Fe^{2+})	0.22
Cytochrome <i>b</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ cytochrome <i>b</i> (Fe^{2+})	0.077
Ubiquinone + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol + H_2	0.045
Fumarate ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ succinate ²⁻	0.031
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ (at standard conditions, pH 0)	0.000
Crotonyl-CoA + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ butyryl-CoA	-0.015
Oxaloacetate ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ malate ²⁻	-0.166
Pyruvate ⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ lactate ⁻	-0.185
Acetaldehyde + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ ethanol	-0.197
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{FADH}_2$	-0.219*
Glutathione + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ 2 reduced glutathione	-0.23
$\text{S} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$	-0.243
Lipoic acid + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ dihydrolipoic acid	-0.29
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADPH}$	-0.324
Acetoacetate + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \beta$ -hydroxybutyrate	-0.346
α -Ketoglutarate + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ isocitrate	-0.38
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ (at pH 7)	-0.414
Ferredoxin (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ ferredoxin (Fe^{2+})	-0.432

FONTE: LENHINGER, A. L. **Lenhinger principles of biochemistry** 4th ed., New York: W. H. Freeman, 2005, p. 511.

Palmore e Whitesides definiram BC (ou células a combustível biológicas), como sendo células a combustível que dependem de um catalisador enzimático (ou biocatalisador) em pelo menos uma parte de sua atividade catalítica (PALMORE; WHITESIDES, 1994). Sua classificação geralmente se dá de acordo com o combustível e oxidante utilizado e também onde estão presentes estes biocatalisadores, se estão fora ou dentro de suas células de origem (BARTON et al., 2004). No caso destes biocatalisadores estarem localizados dentro de suas células de origem, a biocélula a combustível é considerada uma biocélula a combustível microbiana (BCM) e no caso destes biocatalisadores estarem localizados fora de suas células de origem, a biocélula a combustível é considerada uma biocélula a combustível enzimática (BCE). As BCM apresentam algumas vantagens frente às BCE, pelo fato de possuírem estabilidade por um tempo maior, além da capacidade de produzir diferentes enzimas, que podem atuar em reações acopladas. Em compensação, a densidade de potência associada a estes sistemas é geralmente muito baixa em comparação com as BCE, devido à resistência a transferência de massa através das membranas celulares e as suas limitações quanto à aplicabilidade para dispositivos eletrônicos em menor escala (BARTON et al., 2004). Pensando na aplicação destes sistemas biológicos para a produção de energia elétrica relacionada a dispositivos portáteis e miniaturizados, o essencial é se trabalhar com BCE.

1.4 Mecanismos de transferência eletrônica

As BCE têm como fundamento principal a utilização de enzimas que apresentam propriedades redox. Neste caso, as reações enzimáticas envolvem processos de transferência de elétrons diretamente em seu sítio ativo ou em seu cofator, quando presente, que é um componente químico não protéico, necessário para a atividade biológica destas enzimas. A estratégia em se trabalhar com bioeletroquímica é a de se aproveitar estes processos redox, de forma a se utilizar os elétrons envolvendo cada uma destas reações com a superfície de eletrodos conectados a um circuito externo. Pensando em BC, onde a produção de energia necessita não só de uma alta diferença de potencial entre os eletrodos, cátodo e ânodo, mas também de uma alta densidade de corrente elétrica, é necessária uma boa comunicação elétrica entre este sítio ativo ou cofator com a superfície eletródica de interesse. Basicamente existem duas metodologias utilizadas de forma a trabalhar com esta comunicação elétrica,

denominadas “Mecanismo de transferência eletrônica direta” ou TED e “Mecanismo de transferência eletrônica mediada” ou TEM.

No TED, algumas vezes chamado de mecanismo de tunelamento, as reações enzimáticas e eletródicas estão acopladas por uma transferência eletrônica direta. Neste caso, o sítio ativo ou cofator enzimático deve se localizar numa distância e posicionamento ideal, não muito maior do que $10\text{\AA}$, onde é possível esta transferência eletrônica. A superfície eletródica funciona como um co-substrato da enzima, e as reações enzimáticas e eletródicas não podem ser consideradas como separadas, mas como estágios formais de um mecanismo de reação bioeletrocatalítico. O efeito catalítico da enzima é a redução do sobrepotencial para a reação do substrato. O problema no caso do TED é o de que muitas enzimas possuem os seus sítios ativos localizados em posições desfavoráveis, geralmente na estrutura interna da enzima, ou recobertos por resíduos proteicos, os quais impedem esta comunicação eletrônica favorável com o meio externo, no caso, o eletrodo. Para estes casos, o mais indicado é o uso de mediadores.

No TEM, uma espécie redox de baixo peso molecular, referido como um mediador é introduzido ao meio, de forma a agir como um transportador de elétrons entre os sistemas enzimáticos envolvidos e o eletrodo (BARTLETT et al., 1991). Neste caso, a enzima catalisa a oxidação ou redução do mediador redox e a regeneração do mediador ocorre na superfície eletródica. Para este caso, o mediador age como um co-substrato para a reação enzimática e a transformação eletroquímica do mediador no eletrodo deve ser reversível. Portanto, os processos catalíticos envolvem tanto a transformação do primeiro substrato (combustível ou oxidante), quanto do segundo substrato (o mediador, neste caso). Esta transformação do segundo substrato deve ser tão rápida quanto a do primeiro, de forma que é necessário também uma afinidade redox do sistema enzimático com o mediador. Além disto, o mediador deve possuir algumas características físico-químicas e eletroquímicas favoráveis, como uma boa reversibilidade e, no caso de ser um mediador não imobilizado, este deve possuir um alto coeficiente de difusão, para evitar perdas devido à transferência de massa. Além disso, deve possuir características bioquímicas favoráveis, como um alto valor da constante cinética catalítica (k_{cat}), relacionada com a velocidade de regeneração do mediador pela enzima e um baixo valor da constante de Michaelis (K_M), relacionada com a afinidade da enzima com o mediador. Quanto menor o valor de K_M , maior será esta afinidade.

A Figura 3 apresenta uma ilustração feita por Barton e colaboradores (BARTON et al., 2004), sobre os dois possíveis mecanismos para a transferência de elétrons em um sistema bioeletroquímico. Pode-se observar o TED devido à distância favorável do sistema enzimático frente ao eletrodo, ali chamada de “distância de tunelamento eletrônico” e o TEM, para um mediador em solução, onde este sofre um processo redox com a enzima, difunde para a superfície eletródica e se regenera para o reinício do processo.

Figura 3: Figura representando (a): mecanismo de transferência eletrônica direta e (b) mecanismo de transferência mediada.

FONTE: BARTON, S. C.; GALLAWAY, J.; ATANASSOV, P. Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. **Chem. Rev.**, v. 104, p. 4867-4886, 2004.

1.5 Biocélula a combustível de glicose/oxigênio

Baseado nos dois mecanismos propostos envolvendo sistemas bioeletroquímicos, Barton e colaboradores apresentaram as três principais aplicações para biocélulas a combustível. A primeira seria relacionada a geração de energia para dispositivos implantáveis,

como células implantadas em tecidos ou vasos sanguíneos humanos ou animais, utilizando como reagentes alguns componentes presentes no meio biológico, como glicose, lactato e oxigênio. A segunda aplicação apresentada seria a de se utilizar combustíveis presentes em certos ambientes, como na seiva e sulcos presentes em estruturas vegetais ou até mesmo ambientes relacionados a estações de tratamento de esgoto. A terceira aplicação seria para a produção de energia a partir de combustíveis convencionais para células a combustível, como hidrogênio, metanol ou álcoois maiores. Na prática, as duas primeiras aplicações propostas estão relacionadas entre si, visto que os reagentes disponíveis para a produção de energia em dispositivos implantáveis são os componentes presentes naquele ambiente (BARTON et al., 2004).

A exploração de componentes ambientais é atrativa, visto que monossacarídeos, como a glicose ou frutose e dissacarídeos, como a sacarose, são os constituintes orgânicos primários presentes na seiva da maioria das plantas. Por exemplo, a seiva presente em carvalho silvestre é composta de 5% em massa de sacarose (150 mM) e 0,2% em massa de glicose (11 mM), enquanto que o sumo presente na maçã contém cerca de 12% em massa de açúcares, na taxa de 1:1:2 de sacarose/glicose/frutose (PRODOLLIET; HISCENHUBER, 1998). A disponibilidade e o grande potencial energético fazem destes açúcares possíveis candidatos a combustíveis, pensando na produção de energia limpa e renovável. A oxidação biocatalítica destes componentes é bem conhecida, sendo incluída a ação de enzimas como a Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4), Glicose desidrogenase (EC 1.1.1.47) e Piranose Oxidase (EC 1.1.3.10). Destas enzimas, a Glicose Oxidase é a enzima mais ativa, tendo como substrato primário a glicose, particularmente, a sua forma isomérica β -D-glicose. Vale destacar que existem oportunidades da bioreforma de açúcares maiores para a formação de glicose, utilizando enzimas da classe das invertases, aumentando ainda mais as oportunidades de se utilizar a glicose como combustível primário em BC (VOLPONI et al., 2004).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 O surgimento das biocélulas a combustível

A primeira biocélula a combustível enzimática é datada de 1964, a partir de trabalhos desenvolvidos por Yahiro e colaboradores, onde foi demonstrada pela primeira vez a utilização de um bioânodo enzimático contendo as enzimas Glicose Oxidase e D-Aminoácido Oxidase, acoplado a uma folha de platina, como cátodo. Apesar de a meia-biocélula a combustível ter apresentado um baixo desempenho, com valores de densidade de corrente na ordem de 30 nA cm^{-2} a 330 mV, foi demonstrada pela primeira vez a possibilidade de incorporar um sistema enzimático redox a um eletrodo (YAHIRO et al., 1964). O grande avanço na área de bioeletroquímica se deu entre os anos de 1980 e 1990 (CRACKNELL et al., 2008), quando surgiu um grande interesse pela comunidade científica em se desenvolver biossensores enzimáticos, particularmente, trabalhos desenvolvidos por Cass e colaboradores, resultaram no desenvolvimento de sensores de glicose amperométricos, que utilizavam a enzima Glicose Oxidase funcionalizada com ferroceno, como mediador eletrônico (CASS et al., 1984). Apesar do baixo desempenho eletroquímico, estes sensores tinham como grande vantagem a alta especificidade enzimática para a oxidação do substrato, a qual, vinculada a confiabilidade das técnicas eletroanalíticas, permitiram o desenvolvimento de glicosímetros comerciais que são utilizados até hoje, no monitoramento da taxa de glicose no sangue com alta precisão.

Por muito tempo as biocélulas a combustível ficaram esquecidas. O foco da comunidade científica na área bioeletroquímica ficou basicamente ao estudo e desenvolvimento de biossensores. O desinteresse se deu provavelmente devido ao baixo desempenho destes bioeletrodos para a geração de eletricidade e também ao mercado de sensores e de biossensores, que iniciava sua expansão naquela época. A pesquisa em biocélulas a combustível foi retomada com trabalhos desenvolvidos por Willner e Katz, onde foi reportada uma biocélula a combustível funcionando sem membrana e utilizando enzimas em ambos ânodo (Glicose Oxidase) e cátodo (Microperoxidase) (KATZ et al., 1999). A vantagem que este sistema trouxe foi a simplicidade na utilização de ambos biocátodo e

bioânodo em solução. Não era necessária uma membrana trocadora de prótons, visto que a própria solução tampão, utilizada para manter o pH da solução no valor desejado, era também utilizada como eletrólito e permitia a condução de prótons. Este trabalho representa a linha divisória temporal na área de bioeletroquímica, onde grupos de pesquisa antes focados em biossensores passaram a dar atenção a biocélulas a combustível.

2.2 Imobilização enzimática via hidrogéis redox condutores

Um dos primeiros grupos que deu grande contribuição para a área de biocélulas a combustível enzimáticas foi o grupo do prof. Adam Heller, professor do Departamento de Engenharia Química da Universidade do Texas em Austin. Suas contribuições se deram a utilizar as propriedades de cargas superficiais características de proteínas, resultado da grande quantidade de resíduos de aminoácidos e, em alguns casos, também resíduos glicosídicos, que dão forma a estrutura quaternária proteica, de forma a imobilizar estes biocatalisadores na superfície eletródica. Em um trabalho pioneiro, Degani e Heller mostraram que era possível eletrooxidar os sítios ativos da enzima Glicose Oxidase utilizando um copolímero redox policatiônico. O copolímero consistia de uma mistura de poly(cloreto de N-metilvinilpiridinium) e poly(vinilpiridina Os(bpy)₂Cl), que juntos formavam um complexo eletrostático com as enzimas polianiônicas, de forma que a distância para a transferência eletrônica era reduzida. Este complexo forma-se a baixa força iônica, onde o polímero policatiônico era “esticado” por repulsão eletrostática interna (DEGANI; HELLER, 1989).

Em um trabalho seguinte, Barton e colaboradores trabalharam neste segundo polímero, modificando-o de modo a apresentar características que o permitiam promover o mecanismo de transferência eletrônica mediada com a enzima Lacase, para promover a reação de redução bioeletrocatalítica do oxigênio molecular. Neste trabalho, eles utilizaram um polímero feito de poli-N-vinil imidazol, coordenando 1/5 dos anéis a uma estrutura de [Os(tpy)(dme-bpy)]²⁺³⁺, onde tpy = 2,2':6',2''-terpiridina; dme-bpy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina. Este material permitiu que a reação bioeletrocatalítica do oxigênio molecular ocorresse a baixo sobrepotencial com valores de densidades de corrente na ordem de grandeza de mA cm⁻² (BARTON, et al., 2001).

Gallaway e Barton também mostraram como o potencial redox deste polímero pode ser modificado, quimicamente, com a modificação de diferentes radicais ligados ao átomo central de Ósmio. Os valores de potencial de redução chegaram a variar desde altos valores de potencial de redução, na ordem de 0.85 V *vs* EPH, que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de biocátodos, até baixos valores de potencial de redução, na ordem de 0.11 V *vs* EPH, que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de bioânodos (GALLAWAY e BARTON, 2008).

De fato, o desenvolvimento destes polímeros redox levou a um número considerável de publicações, tanto para a aplicação em bioânodos, como em biocátodos. Atualmente, esta tecnologia é protegida por uma patente norte-americana, sobre o código US 2008/0118782 (HELLER, et al., 2008).

A imobilização de enzimas por este polímero redox de Os apresenta uma grande versatilidade, pelo fato de poder ser utilizado tanto para preparar bioânodos, como biocátodos. Apesar disto, têm-se a crítica de que o Os é um metal tão caro quanto a Pt, e a utilização do mesmo não traz, na prática, grandes avanços econômicos que uma biocélula a combustível independente de um metal nobre traria.

2.3 Imobilização enzimática via reconstituição de cofatores

Outro grupo que deu uma grande contribuição para a área de biocélulas a combustível enzimáticas foi o grupo coordenado pelos prof. Itamar Willner, professor do Instituto de Química da Universidade Hebráica de Jerusalém e prof. Evgeny Katz, atualmente professor do Departamento de Química e Ciências Biomoleculares da Universidade de Clarkson. Estes foram os primeiros a identificar que um dos pontos mais importantes em se desenvolver um bioeletrodo para biocélulas a combustível está no posicionamento das enzimas imobilizadas na superfície eletródica (WILLNER; KATZ, 2000). A taxa de transferência eletrônica obtida era geralmente muito baixa, devido à pequena quantidade de enzimas localizadas em posições favoráveis sobre a superfície eletródica, de forma que reações eletroquímicas ocorrendo entre

os cofatores localizado no sítio ativo redox enzimático e a esta superfície eletródica eram muito lentas, se não desprezíveis.

De forma a contornar o problema de falta de direcionamento das enzimas imobilizadas, o grupo destes pesquisadores trabalhou em remover o cofator enzimático, no caso da Glicose Oxidase, o cofator FAD, ligar este cofator quimicamente a uma nanopartícula de ouro (Au-NP) e reconstituir esta enzima apo-Glicose Oxidase (ou seja, a enzima Glicose Oxidase sem o seu cofator estar ligado na mesma) com este cofator contendo a nanopartícula de ouro. A enzima Glicose Oxidase contendo o seu cofator FAD modificado com a nanopartícula de ouro (GOx-Au-NP), foi então imobilizada sobre a superfície de um eletrodo de ouro utilizando uma ponte di-sulfeto (XIAO et al., 2003).

A reconstituição do cofator enzimático não só possibilitou que houvesse a transferência eletrônica entre o sítio ativo enzimático (via cofator) para a superfície eletródica, mas também mostrou que o número de turnover (o número de moléculas do substrato transformado por uma única molécula de enzima ou único sítio de ligação em um minuto, quando a enzima está em atividade máxima), responsável pela transferência eletrônica foi de aproximadamente 5000 s^{-1} para o biocatalisador reconstituído, em comparação com a mesma taxa para com o oxigênio molecular, seu receptor de elétrons natural, cujo valor de turnover é de aproximadamente 700 s^{-1} . A nanopartícula estaria funcionando como um nanofio, ligando e alinhando estas enzimas ao suporte condutor, de forma que os elétrons provenientes da reação do FAD com a glicose eram transferidos pelos nanofios para o suporte condutor, e não para a molécula de oxigênio, o que acontece naturalmente para a regeneração deste cofator. Em trabalhos recentes, o mesmo grupo de pesquisa utilizou também moléculas de outro cofator enzimático, o pirroloquinolina quinona (PQQ) e uma molécula de rotaxano, utilizada como centro de transferência eletrônica, sendo este último capaz de deslocar o potencial de oxidação para até 700 mV na direção de potenciais negativos, indicando um baixo valor de sobrepotencial para a reação de oxidação de glicose (KATZ, et al. 2004).

2.4 Oxidação de desidrogenases por azinas

As reações envolvendo as enzimas da classe das desidrogenases estão relacionadas com a oxidação e redução de um cofator NAD. A oxidação direta destes cofatores sobre a superfície de eletrodos não modificados, como a Pt, ocorre a sobrepotenciais muito altos (JAEGFELDT, 1980), valores que chegam a 1,0 V *vs* ECS, o que fez deste sistema inaplicável a biocélulas a combustível. Felizmente, a oxidação deste cofator pode ser catalisada por alguns corantes, moléculas da família das tiazinas, que apresentam a capacidade de oxidar o NADH cataliticamente e a reoxidação destes corantes pode ser feita eletroquimicamente e a baixo valor de sobrepotencial (TORTENSSON; GORDON, 1981) e (ADDO, et al., 2010).

Várias biocélulas a combustível enzimáticas utilizando desidrogenases foram utilizadas desde então, onde o foco principal foi em biocélulas a combustível utilizando álcoois como combustível (MOORE et al., 2005).

Em um trabalho bastante inovador, o grupo da profa. Shelley Minteer, antes professora da Universidade de Saint Louis e atualmente professora do Departamento de Química da Universidade de Utah, mostrou que é possível utilizar um sistema enzimático em cascata de forma a promover a oxidação completa de etanol. A adição de mais desidrogenases, de forma a completar o ciclo de oxidação completa do etanol, utilizando uma cascata de reações enzimáticas, que geralmente promovem as reações que acontecem no ciclo do ácido cítrico, todas estas utilizando a poliazina Verde de Metileno como mediador, promoveu um aumento na densidade de corrente, resultando em um aumento de potência que apresentou valores na ordem de grandeza de 1 mW (SOKIC-LAZIC; MINTEER, 2008).

2.5 Biocélula a combustível de H₂/O₂

Finalmente, trabalhos realizados pelo grupo do prof. Fraser Armstrong, professor do Departamento de Química da Universidade de Oxford, apresentaram o desenvolvimento de bioeletrodos para biocélulas a combustível utilizando o gás hidrogênio como combustível e o oxigênio presente no ar como oxidante. Sua linha de pesquisa envolve a utilização de hidrogenases que possuem complexos bi-metálicos como sítio ativo, geralmente átomos de ferro [FeFe] ou níquel e ferro [NiFe] em seu sítio ativo, que são responsáveis pela biocatálise e também pela transferência eletrônica direta com o eletrodo.

Um sistema experimental foi utilizado para demonstrar esta tecnologia, onde foi utilizada a enzima desidrogenase tolerante a O₂, *Rm* [Ni-Fe]-MBH, de forma a promover reações bioeletrocatalíticas de oxidação de H₂ presente em 3% em uma atmosfera controlada e a enzima Lacase de *Trametes Versicolor* foi utilizada em um biocátodo, de forma a promover reações bioeletrocatalíticas de redução de O₂ presente no ar (VINCENT et al., 2006).

Com este sistema experimental, foi possível manter um relógio digital funcionando por pelo menos 24 horas, utilizando uma atmosfera contendo 3% de hidrogênio (Figura 8). Apesar disto, o máximo de potência obtido foi de apenas 5 $\mu\text{W cm}^{-2}$. A baixa potência apresentada por esta biocélula a combustível se deve ao baixo desempenho dos biocátodos, em termos de potencial, e a inativação destas desidrogenase a altos potenciais, processo ainda desconhecido, mas que poderia ser revertido pela aplicação de condições de potencial de circuito aberto, por um curto período de tempo, onde a atividade destas desidrogenases era restaurada.

Em um trabalho seguinte, este mesmo grupo apresentou experimentos utilizando a enzima Bilirrubina Oxidase, em substituição as enzimas Lacase utilizadas anteriormente, obtendo valores de potencial de circuito aberto muito próximos do valor termodinâmico para a reação de redução de O₂.

O potencial de circuito aberto para uma célula contendo a Bilirrubina Oxidase e a desidrogenase foi de 990 mV e um máximo de potência de célula obtido foi de 63 $\mu\text{W cm}^{-2}$, em uma biocélula a combustível funcionando com uma resistência de 3,3 k Ω (WAIT et al.,

2010). Um valor de potência de uma ordem de grandeza maior do que o mesmo sistema operando com Lacase.

Dentre as vantagens que a enzima Bilirrubina Oxidase (neste trabalho, o autor usou a sigla MvBO), apresentava incluía: alto potencial de redução de O_2 , alta estabilidade e tolerância a Cl^- , e o biocátodo se apresentou como limitante para o funcionamento da célula apenas em situações onde a concentração de oxigênio era menor do que 4%, mostrando que um biocátodos contendo Bilirrubina Oxidase apresenta um alto desempenho, mesmo em condições de baixa concentração de O_2 .

3 Justificativa e Objetivos

O Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) é um grupo que tem dado grande contribuição ao desenvolvimento científico e tecnológico nacional, desde a sua criação, em 1973. Por muito tempo, o Grupo tem sido bastante ativo com o que se diz respeito à tecnologia eletroquímica, realizando projetos de pesquisa que envolve principalmente os temas: eletrocatalise em metais e ligas metálicas, estudo e desenvolvimento de sistemas para conversão eletroquímica de energia e auto-organização dinâmica (GRUPO DE ELETROQUÍMICA, 2012). O Grupo de Eletroquímica foi um dos primeiros grupos de pesquisa brasileiros a realizar pesquisas com células a combustível, apresentando artigos científicos publicados nesta linha de pesquisa já desde o começo da década de 80 (GONZALEZ; SRINIVASAN, 1984).

Uma das características principais do Grupo de Eletroquímica é a grande capacidade que o Grupo teve de se manter sempre atualizado quanto ao que é feito de eletroquímica a nível mundial, como o estudo e desenvolvimento de células a combustível de álcool direto e hoje, também incluindo o desenvolvimento de membranas para células a combustível e até mais recentemente, catalisadores para a oxidação de glicerol, subproduto da fabricação de biodiesel. Mantendo esta filosofia de pesquisa, o Grupo de Eletroquímica pretende também se inserir como um grupo ativo na linha de pesquisa de biocélulas a combustível. Apesar de que um trabalho exploratório foi publicado pelo grupo (COLMATI et al., 2007), foi com o trabalho de tese de doutorado do pesquisador Luciano dos Santos, envolvendo estudos da enzima Bilirrubina Oxidase para promover reações bioeletrocatalíticas de redução de O_2 , que esta linha de pesquisa oficialmente se inseriu ao Grupo (SANTOS, 2010). Paralelamente, um trabalho de mestrado envolvendo biocélulas a combustível microbianas também começava a ser desenvolvido (GOMES, 2011).

Considerando a importância de que representa a inserção do Grupo de Eletroquímica a esta nova linha de pesquisa de biocélulas a combustível, foi desenvolvido o trabalho apresentado nesta tese, de forma a complementar e a solidificar a pesquisa já existente no Grupo.

Dessa forma, são considerados os itens abaixo como os objetivos principais do trabalho, descritos em detalhes nas páginas que se seguem:

- Desenvolver bioânodos enzimáticos, funcionalizados pelas enzimas Glicose Oxidase ou Glicose Desidrogenase, de forma a promover reações bioeletrocatalíticas de oxidação da glicose;
- Desenvolver biocátodos enzimáticos, funcionalizados pelas enzimas Lacase ou Bilirrubina Oxidase, de forma a promover reações bioeletrocatalíticas de redução de oxigênio molecular;
- Avaliar a possibilidade de utilização de mediadores, para os casos em que não é observado o mecanismo de transferência direta;
- Identificar o melhor par de bioeletrodos, biocátodo e bioânodo e desenvolver uma biocélula a combustível que utilize a glicose como combustível e o oxigênio do ar como oxidante;
- Adaptar a tecnologia desenvolvida com os bioeletrodos para um sistema de microfluídica em papel;
- Realizar a prova do conceito da tecnologia desenvolvida, utilizando um combustível comercial e de fácil acesso.

4 Materiais e Métodos

4.1 Reagentes

As Lacases utilizadas foram de *Trametes versicolor* (≥ 10 UI por mg de sólido), compradas da empresa Fluka e as Glicose Oxidases utilizadas foram de *Aspergillus niger* do tipo II-S (15,000-50,000 UI por grama de sólido), compradas da empresa Sigma-Aldrich. As enzimas Glicose Desidrogenase de *Bacillus megaterium* e as enzimas Bilirrubina Oxidase de *Myrothecium verrucacia* foram compradas da empresa Amano Enzyme Inc. Todas as enzimas foram utilizadas da forma em que foram recebidas, sem posterior purificação.

O glutaraldeído utilizado foi de Grau I, na razão de 70% v/v em água, juntamente do 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ou ABTS; do Verde de Metileno e de todos os ferrocenos utilizados: ferroceno, ferroceno ácido carboxílico e ferroceno carboxaldeído, foram comprados da empresa Sigma-Aldrich. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) foi comprada da empresa Merck.

A quitosana de médio peso molecular utilizada foi a de grau de desacetilação de 75-85% e foi comprada da empresa Sigma-Aldrich. A solubilização da quitosana foi feita segundo o procedimento de Cooney e colaboradores, adicionando 500 mg de quitosana em pó, sem prévia modificação, a 15 ml de uma solução de ácido acético de concentração 0.17 M (COONEY et al., 2009). Os materiais carbonáceos utilizados para a preparação dos compósitos com quitosana foram pó de grafite do tipo “Degreased Crystalline Graphite Powder” – DCGP (Cocan Graphite Mill INC.) e carbono “Black Vulcan” – XC-72R (Cabot Carbon Corp.), preparados e adicionados sobre um tecido de carbono tipo A, 0,35 mm de espessura (E-TEK Inc.).

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore).

4.2 Célula Eletroquímica

Todos os experimentos eletroquímicos de meia célula, que não os realizados na configuração em papel, foram realizados em uma célula eletroquímica convencional de compartimento único, confeccionada em vidro Pyrex, com capacidade de aproximadamente 30 mL. A tampa é feita de PTFE, com orifícios para a introdução dos eletrodos e para o borbulhador.

Os eletrodos inseridos na célula eram conectados a um potenciostato Autolab PGSTAT 30, acoplado a um microcomputador. A temperatura da célula era controlada por banho termostático, a 25 °C, a não se que indicado outro valor, utilizando um sistema de refrigeração Haake K20 acoplado a um controlador eletrônico Haake DC 30.

O sistema eletroquímico para os experimentos de meia célula é composto de um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS ou SCE), ou um eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl/Cl⁻), um fio de Pt platinizada como contra-eletrodo, isolado por uma placa porosa de vidro e dois tubos de vidro que permitiam a passagem de gases, de modo a possibilitar a aeração e a desaeração no interior da célula. Para a aeração da célula, era borbuhlado O₂ no interior da solução por cerca de 20 minutos e, para a desaeração, era borbuhlado N₂ ou Ar no interior da solução por cerca de 20 minutos. Após esse tempo, era ligado um registro que deslocava os gases para a superfície da solução, de modo a garantir que não penetrasse oxigênio presente no ar atmosférico no interior da solução desaerada.

Em todos os experimentos contendo glicose solubilizada no eletrólito, esta solução foi preparada pelo menos 24 horas antes de se iniciar o experimento, de forma a permitir o equilíbrio de mutorrotação da glicose em solução.

Para os experimentos eletroquímicos de voltametria cíclica, as curvas apresentadas são todas do décimo ciclo e realizadas a velocidades de varredura de 50 mV s⁻¹, exceto quando indicado outro valor de ciclo e/ou de velocidade de varredura.

A temperatura utilizada foi de 25 °C e a célula era lavada com água Milli-Q antes de iniciar cada experimento.

4.3 Preparações dos eletrodos de ouro e carbono vítreo

Para os experimentos de meia célula, foram utilizados como eletrodos de trabalho um cilindro de ouro e um cilindro de carbono vítreo, prensados em um suporte de PTFE. O tratamento inicial para os eletrodos se deve com o polimento da superfície do eletrodo utilizando uma solução de alumina 9 μm , sobre um feltro fino para polimento, seguido de adição deste eletrodo a ultrassom por 10 minutos para remover as partículas de alumina que ficaram depositadas. Para a limpeza dos eletrodos de ouro e de carbono vítreo, estes eram previamente tratados por imersão a uma solução de KOH concentrado, por cerca de 5 minutos, sendo posteriormente lavados com água Milli-Q. Esta lavagem era feita pelo menos algumas horas antes do experimento ou preparação da camada biocatalítica.

4.4 Preparações dos eletrodos de tecido de carbono contendo o compósito quitosana-carbono

Para os eletrodos de tecido de carbono, um pequeno pedaço de tecido de carbono era cortado na forma de um quadrado, para se obter a área geométrica desejada. O corte geralmente era feito para se ter uma área geométrica de 1 cm^2 , exceto quando informado outro valor. Para a limpeza destes eletrodos, estes eram imersos a uma solução de isopropanol, para desengorduração, sendo lavados com água Milli-Q em seguida e deixados em repouso até secar. Estes procedimentos de limpeza eram realizados pelo menos 1 hora antes do experimento ou da metodologia de preparação.

Para a preparação do compósito quitosana-carbono, foi preparada uma mistura contendo quitosana e pó de grafite (300 mg/ml de gel) ou carbono Vulcan (100 mg/ml de gel). Esta mistura foi adicionada sobre a superfície do tecido de carbono de área geométrica de 1 cm^2 numa relação de 3 mg do compósito para cada 0,25 cm^2 , de forma a cobrir completamente o tecido de carbono como uma camada fina. Este tecido modificado foi então deixado secar por 8 horas. Após a secagem, este tecido modificado e seco foi adicionado a uma solução tampão sódio fosfato no pH da respectiva enzima a ser imobilizada, contendo 1% v/v de glutaraldeído e as enzimas a serem imobilizadas. O tecido de carbono modificado

com o compósito foi deixado em contato com a solução contendo 1 mg da enzima que será imobilizada e glutaraldeído por 24 horas, antes de ser utilizado para os experimentos eletroquímicos.

4.5 Preparação dos bioeletrodos em papel

Os biocátodos em papel foram desenvolvidos a partir da prensagem mecânica da camada catalítica e difusional sobre o suporte eletródico. O papel de carbono utilizado como suporte eletródico para os bioeletrodos em papel foi o papel Toray TG-H-60 (Fuel Cell Earth LLC), que era cortado na geometria e tamanho desejado, utilizando uma máquina de corte automatizada (Graphtec FC7000-75, Western Graphtec Inc., Irvine, CA), que foi programada para cortar o papel Toray nas dimensões desenhadas utilizando o software AutoCAD.

O material utilizado para desenvolver os biocátodos respiradores foi o XC35, que se trata de carbono “Black Vulcan” – XC72R com 35% w/w de Teflon. O Papel “Bucky” de alta condutividade (High conductivity Buckypaper – HcBP) foi comprado da empresa Buckeye Composites (Kettering, OH, EUA). As camadas biocatalíticas hidrofílicas (HBL, do inglês – Hydrophilic biocatalytic layer) foram preparadas utilizando Nitrocelulose Hi-Flow Plus HF 135 unbacked (Millipore) como material suporte para adsorção das enzimas misturadas com XC72R. Estas camadas foram prensadas sobre o suporte nas configurações utilizadas com a ajuda de uma prensa hidráulica, prensando-as a 1000 psi.

4.6 Experimentos com a célula eletroquímica em papel

A célula eletroquímica em papel foi utilizada na configuração apresentada na Figura 10. Para os experimentos eletroquímicos de meia célula, o eletrodo de trabalho foi adicionado em um dos lados da bomba estática, enquanto que uma malha de platina foi adicionada ao outro lado da bomba estática. A bomba estática era formada por papel de filtro comum (Whatman) e foi cortada de forma a acomodar uma área grande suficiente para se ter ambos

eletrodo de trabalho e contra-eletrodo em contato com o papel. Foi utilizado um filme plástico comercial (no. GDL-166-clear, G&L Precision Die Cutting Inc., San Jose, CA, EUA) para manter o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo em contato com a bomba estática.

Figura 4: Desenho da meia célula eletroquímica em papel. I representa o suporte eletródico, II e III representam os diferentes materiais que podem compor a camada catalítica, IV é a malha de platina utilizada como contra-eletrodo, V é o eletrodo de referência e VI é o filme plástico utilizado para manter as camadas unidas. A estrutura maior em branco representa a bomba estática, utilizada também como separador entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo.

FONTE: CINICIATO, G. P. M. K. C.; LAU, C.; COCHRANE, A.; SIBBETT, S. S.; GONZALEZ, E. R.; ATANASSOV, P. Development of paper based electrodes: From air-breathing to paintable enzymatic cathodes. **Electrochim. Acta**, v. 82, 2012, p. 208-213.

Depois de adicionados os eletrodos em volta da bomba estática, esta célula eletroquímica em papel foi adicionada com a sua parte inferior dentro de uma placa de Petri contendo o eletrólito, glicose e NAD, de forma que esta solução poderia fluir dentro das fibras do papel por ação capilar e o filme de solução entre ambos os eletrodos estaria fechando o circuito elétrico, servir de eletrólito. A célula eletroquímica em papel continha também, ao topo, uma região adicional aberta ao meio ambiente e de área superficial grande suficiente de forma com que a solução pudesse deixar a célula por evaporação. O constante movimento do eletrólito contendo o combustível se devia a situação de equilíbrio entre a evaporação da

solução ao topo da célula eletroquímica em papel e como consequência, se tinha a movimentação de mais solução por ação capilar. O eletrodo de referência foi imerso ao eletrólito e mantido em contato próximo a região de entrada do eletrólito, na célula eletroquímica em papel, de forma a diminuir possíveis perdas por queda ohmica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referencia.

Todos os experimentos eletroquímicos foram iniciados a partir do momento em que era observado que a região frontal da solução já tinha atingido por completo a superfície de ambos eletrodo de trabalho e contra-eletrodo.

5 Resultados e Discussão

5.1 Reações de bioeletrooxidação da glicose

5.1.1 Estudos bioeletroquímicos envolvendo a enzima Glicose Oxidase

A Glicose Oxidase (GOx), também relatada pelo nome β -D-glicose:oxigênio-1-oxireductase e pelo número de comissão EC 1.1.3.4, é uma enzima tipicamente bacteriana, mas é também encontrada em algumas algas ou frutas cítricas. É uma glicoproteína globular ligeiramente alongada, com um diâmetro médio de 8 nm e um volume específico de 0,75 ml g⁻¹. A enzima possui a estrutura dímica, sendo composta de duas subunidades unidas por pontes dissulfetos (WILSON; TURNER, 1992). O sítio ativo relacionado à ação da Glicose Oxidase é constituído por resíduos de aminoácidos, na forma de uma cavidade presente na superfície enzimática, sendo relacionado à orientação e ligação do substrato. No caso da β -D-glicose, a oxidação biocatalítica tem como produto final, a formação de gliconolactona (D-glicono-1,5-lactona) (Figura 5), que é normalmente hidrolisada, formando ácido glucônico (algumas vezes considerado o produto final da reação).

Figura 5: Reação de oxidação da glicose catalisada pela enzima Glicose Oxidase.

FONTE: LENHINGER, A. L. **Lenhinger principles of biochemistry** 4th ed., New York: W. H. Freeman, 2005, p. 244-245.

O processo redox de oxidação biocatalítica da glicose ocorre graças à presença de um cofator, chamado de flavina adenina dinucleotídeo, ou FAD, localizado e geralmente fortemente ligado dentro do sítio ativo enzimático. Cada subunidade da Glicose Oxidase contém um sítio ativo e um FAD. O processo todo envolve um acoplamento entre a glicose, este sítio ativo e o FAD, que funciona como um aceptor de elétrons e prótons provenientes desta reação. A regeneração do FAD reduzido geralmente se dá pelo oxigênio molecular e de água presente no meio, formando peróxido de hidrogênio como produto final.

Outra forma de se promover a regeneração do FAD é eletroquimicamente, em um meio livre de oxigênio molecular, de forma que o aceptor final de elétrons seja um mediador ou a superfície eletródica e não o oxigênio. Desta forma, os elétrons provenientes da reação da GOx podem ser aproveitáveis em um ânodo para uma biocélula a combustível. Um exemplo muito comum desta estratégia é o seu uso em biossensores amperométricos para a medição da glicose sanguínea, muito utilizado por pessoas diabéticas. Este sensor se baseia em um filme contendo Glicose Oxidase imobilizada, juntamente de algum componente derivado de ferroceno, que funciona como um mediador para esta enzima. Quando uma gota de sangue é adicionada sobre este filme, uma corrente elétrica é gerada e medida por técnicas eletroanalíticas, relacionada à reação do complexo bioeletroquímico glicose/GOx/ferroceno presente no filme, que pode ser interpretada como a concentração de glicose presente na amostra.

A estrutura resolvida de uma das subunidades da GOx encontrada no banco de dados de proteínas da RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank) é apresentada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura de uma das subunidades da Glicose Oxidase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Glicose Oxidase de *Aspergillus niger*, com o número de identificação 1CF3.

Pela Figura 6, é possível observar o FAD, representado como uma estrutura molecular em amarelo, localizado dentro da estrutura proteica e com o anel tricíclico isoaloxazina direcionado para a cavidade proteica, que é o sítio ativo onde se liga o substrato. As outras estruturas moleculares na forma de palito em verde, presentes na superfície enzimática, são terminações glicosídicas e as estruturas restantes são hélices- α e folhas- β , que dão a estrutura da proteína.

A primeira metodologia utilizada foi a de se tentar promover o mecanismo de transferência eletrônica direta com a enzima Glicose Oxidase (GOx). Desta forma, tem-se em mente que as enzimas devem ser imobilizadas em um suporte, de forma a permitir que as mesmas se localizem em uma distância curta suficiente para que ocorra o processo de transferência eletrônica entre o sítio ativo ou cofator enzimático e o eletrodo.

A estratégia inicial adotada foi utilizar um compósito feito de uma mistura de quitosana, pó de grafite (ou carbono Vulcan), glutaraldeído e as enzimas. O pó de grafite e o

carbono Vulcan melhoram a estabilidade mecânica e permitem a condução eletrônica (material reforço) do material compósito, enquanto que a quitosana dá estrutura (material matriz) ao material compósito, além de servir de suporte ligante para as enzimas, utilizando o glutaraldeído. Como apresentado na Figura 7, a quitosana possui algumas terminações amina que poderiam ser utilizadas para promover ligações covalentes com as enzimas, a partir da formação de bases de Schiff, promovidas por um ataque nucleofílico, utilizando glutaraldeído como ligante, por exemplo. Na Figura 7, é apresentada a estrutura da quitosana, composta por unidades de (I) β -(1-4) D-glicosamina (unidade desacetilada) e (II) N-acetil-D-glicosamina (unidade acetilada). A quitosana é classificada de acordo com o grau de desacetilação. No caso do trabalho presente, a quitosana utilizada apresentou uma taxa de 75-85% de desacetilação. Ou seja, a maior parte da estrutura da quitosana se apresenta com a unidade (I).

Figura 7: Estrutura química da quitosana apresentando as unidades desacetiladas (I) e acetiladas (II).

O interesse em se utilizar a quitosana também se deve a algumas propriedades físico-químicas interessantes. Esta forma um material bem compacto, mesmo com a adição das partículas de grafite em seu meio, pode ser facilmente adicionado sobre o suporte, tomando-se o controle da massa adicionada. Depois de seca, forma um material sólido, próprio para a imobilização das enzimas.

Depois de preparado este primeiro material sobre o eletrodo, no caso, o tecido (ou feltro) de carbono, este foi adicionado a uma solução contendo glutaraldeído e as respectivas enzimas. O glutaraldeído é uma molécula simples, mas que pode ser encontrado na forma de

dímeros e polímeros, e ambas as formas podem promover diferentes ligações com proteínas, de acordo com o pH do meio (MIGNEAULT, et al., 2004). No caso da utilização de um meio ácido ou mesmo neutro, a reação do glutaraldeído já é bem conhecida, envolvendo o ataque nucleofílico nos agrupamentos amina (-NH_2) dos resíduos de lisinas presentes nas estruturas moleculares das proteínas, o que permite a imobilização química destas enzimas (Figura 8).

Figura 8: Reações do glutaraldeído com terminações amina presente na estrutura proteica de enzimas (Enz), em meio ácido e neutro.

FONTE: MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C.

Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, 2004, 37, p. 790-802.

O glutaraldeído age como um agente entrecruzador, ligando duas estruturas contendo terminações amina. Neste caso, o glutaraldeído estará promovendo ligações entre enzima com enzima (pelo fato de apresentarem terminações Lisina, que funcionam como terminações amina) e também entre as enzimas e a quitosana, presente no suporte, por esta conter terminações amina nas unidades desacetiladas. Pela metodologia utilizada neste trabalho, não foi possível controlar a forma com que ocorrem estas ligações. Tem-se, portanto, os dois tipos de ligações ocorrendo no sistema.

A Figura 9 apresenta a estrutura da glicose oxidase, com destaque para os resíduos de lisinas (em vermelho) presentes na estrutura da enzima, bem como o cofator (em azul) presente dentro do sítio ativo enzimático. A seta representa a região de entrada e ligação do substrato, direcionado para o anel tricíclico de isoaloxazina, onde a reação de oxidação da glicose realmente acontece.

Figura 9: Estrutura da Glicose Oxidase apresentando as terminações lisina (em vermelho) e o cofator FAD (em azul).

Vale observar pela Figura 9 que a Glicose Oxidase apresenta resíduos dos aminoácidos de lisina localizados apenas na região superficial externa da mesma. Por um lado, isto é importante, de forma que o sítio ativo da enzima fica livre para a entrada do substrato. A presença destes resíduos nas proximidades da cavidade onde o substrato se liga poderia resultar no bloqueio da mesma, prejudicando ou até impossibilitando a ligação do substrato de forma eficiente. Por outro lado, o objetivo da imobilização da Glicose Oxidase para a aplicação como um bioânodo para biocélulas a combustível é o de ligar este cofator a superfície de um eletrodo, de forma a permitir que a transferência eletrônica direta seja possível.

A Figura 10 apresenta os voltamogramas cíclicos de um eletrodo de tecido de carbono de área geométrica de 1 cm^2 , modificado com o compósito de quitosana, pó de grafite e 1 mg de Glicose Oxidase (quit-graf-GOx) ou modificado o compósito de quitosana, Carbono Vulcan com 1 mg de Glicose Oxidase (quit-CV-GOx).

Figura 10: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de tecido de carbono modificado com os compósito de quitosana e pó de grafite (quit-graf) e Carbono Vulcan (quit-CV), com e sem Glicose Oxidase, em solução 0,1 M tampão fosfato de sódio pH 5.5 desaerado, contendo 1 mM de glicose a 50 mV s^{-1} .

É possível observar pela Figura 10 o aparecimento de um par de picos redox em potenciais próximos de -400 mV vs ECS , quando a enzima GOx foi adicionada ao compósito quit-CV. Da mesma forma, é observado também este par de picos para o material quit-graf-GOx. Este par de picos não é observado quando não foi adicionada GOx a nenhum dos compósitos.

O alto potencial de oxidação deste par de picos redox observado indica que este processo deve estar relacionado a reações de oxidação e de redução do cofator FAD, presente no sítio ativo da GOx. O valor esperado para o potencial de redução do FAD é de -0.219 V vs EPH e em pH 7.0, assim como mostrado na Tabela 1, apresentada anteriormente. Fazendo o cálculo de conversão deste valor de potencial padrão para as condições experimentais utilizadas: pH 5.5, utilizando o eletrodo de calomelano saturado ($+0.244 \text{ V vs. EPH}$) e considerando que a reação do FAD envolve 2 elétrons, é encontrado o valor de aproximadamente -419 mV , valor bastante aproximado ao obtido experimentalmente.

A estrutura do FAD e os processos de redução do FAD para o intermediário de semiquinona e para sua forma totalmente reduzida são apresentados na Figura 11, abaixo:

Figura 11: Estrutura e reações de oxirredução envolvendo o FAD.

FONTE: LENHINGER, A. L. **Lenhinger principles of biochemistry 4th ed.**, New York: W. H. Freeman, 2005, p. 516.

Pode-se observar pela Figura 11 que as reações de oxidação e de redução do FAD ocorrem diretamente no anel tricíclico iosaloxazina. O processo catalítico da GOx em oxidar glicose se deve à ligação da glicose na cavidade onde está localizado o FAD, ocorrendo diretamente a oxidação da glicose no “carbono 1”, contendo uma hidroxila, tendo a formação de uma carbonila, como observado na Figura 5, apresentada anteriormente. Não só a geometria da cavidade está relacionada com a atividade catalítica, mas também aos aminoácidos ali presentes, podem direcionar o substrato para uma posição favorável ao encaixe e à reação com o FAD, localizado e direcionado para a entrada da cavidade.

Demin e Hall consideram o alto potencial de oxidação do FAD presente no sítio ativo da GOx, como efeito que o próprio FAD sofre, devido a interações com os aminoácidos que compõem este sítio ativo. Enquanto que o FAD em solução apresenta uma estrutura com os três anéis do agrupamento de isoaloxazina localizados todos num mesmo plano, este, quando localizado dentro do sítio ativo da GOx apresenta um efeito que os dois autores chamaram de “configuração do tipo borboleta”, onde há uma torção nos anéis de isoaloxazina, por influência das fortes interações com o sítio ativo da GOx, que resulta em uma estrutura que se assemelha ao bater da asa de uma borboleta (DEMIN; HALL, 2009). Esta nova configuração estaria aproximando os orbitais eletrônicos dos anéis presentes na estrutura dos anéis de isoaloxazina, resultando no aumento do potencial de oxidação do mesmo. A reação biocatalisada pela GOx se deve, portanto, a ligação de uma molécula de glicose em seu sítio ativo, onde contém o FAD nesta configuração do tipo borboleta, que apresenta potencial de oxidação alto suficiente para oxidar a glicose. O FAD em solução, sem a presença do sítio ativo da GOx, não apresenta a capacidade de oxidar a glicose, tal como ocorre quando localizado dentro do sítio ativo da GOx.

Os resultados apresentados na Figura 10 indicam que o FAD presente na estrutura da GOx está em contato direto com o eletrodo, de forma que este pode-se oxidar e se reduzir na superfície do mesmo. A tentativa de se adsorver a GOx diretamente sobre a superfície do tecido de carbono e de qualquer outro eletrodo utilizado, carbono vítreo ou ouro, sem a utilização do compósito, não permitiam observar o aparecimento destes pares de picos, indicando que a imobilização por glutaraldeído com os compósitos preparados foi bem sucedida. Diferenças entre as curvas contendo quit-CV-GOx e quit-graf-GOx se devem simplesmente a corrente capacitiva devido a presença da dupla camada elétrica na interface eletrodo-solução. A corrente capacitiva está relacionada, dentre outras coisas, a área eletroquimicamente ativa desta interface. Quanto maior a área eletroquimicamente disponível, maior será a quantidade de espécies carregadas eletricamente (ou no caso da água, também dipolos elétricos) presentes na interface eletrodo-solução e com resultado disto, maior será a carga necessária para carregar a dupla camada elétrica.

Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura dos materiais utilizados são apresentadas na Figura 12. É possível observar por estas imagens, que o tamanho das partículas de grafite (A) é consideravelmente menor do que o tamanho das partículas do

carbono Vulcan (B), indicando que a área eletroquimicamente disponível do material quit-graf deve ser muito maior do que a do material quit-CV, justificando o porque das diferenças observadas na Figura 10.

Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura dos compósitos quit-graf (A) e quit-CV (B)

Apesar de a imobilização da GOx sobre a superfície eletródica ter sido bem sucedida, de forma que o cofator enzimático FAD pudesse se oxidar e se reduzir sobre a superfície eletródica, não foi possível observar uma atividade bioeletrocatalítica de transferência eletrônica direta. Tanto a adição de mais glicose, quanto a agitação da solução, utilizando um agitador magnético, não permitiram o aumento da corrente de oxidação, que deveria ser resultado da reação bioeletroquímica catalisada pela GOx, assim como formulado por Armstrong, para experimentos de voltametria de filme de proteínas (ARMSTRONG, 2002). A pergunta que se faz é a de que se o FAD está ligado eletricamente a superfície eletródica, mas não apresenta uma atividade bioeletroquímica, seria possível que as enzimas foram inativadas ou desnaturadas durante o processo de imobilização? Para confirmar isto, foram feitos os mesmos experimentos eletroquímicos, mas com a solução aerada.

A Figura 13 apresenta os resultados de voltametria cíclica do compósito quit-CV-GOx em solução aerada e contendo diferentes concentrações de glicose.

Figura 13: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de tecido de carbono modificado com o compósito de quitosana, Carbono Vulcan e Glicose Oxidase (quit-CV-GOx), em solução 0,1 M tampão fosfato de sódio pH 5.5 aerada, com diferentes concentrações de glicose a 50 mV s^{-1} .

É possível observar pela Figura 13 o aparecimento de uma onda de corrente de redução em potenciais começando aproximadamente a -200 mV vs ECS , referente a redução de oxigênio molecular presente na solução diretamente sobre a superfície do tecido de carbono. A mesma reação não é observada quando a solução é desaerada. É possível observar também o desaparecimento dos picos referentes a oxidação e redução do cofator FAD, provavelmente encoberto pela corrente de redução obtida na mesma janela de potenciais. Com o aumento da concentração de glicose, observa-se uma diminuição desta corrente de redução de oxigênio. Isso se deve ao fato de que grande parte das GOx imobilizadas na superfície eletródica está ativa e disponível para biocatalisar a oxidação da glicose ali presente. Como mostrado anteriormente, a via natural de regeneração da GOx é por meio do oxigênio molecular, sendo este utilizado como receptor final de elétrons. A GOx imobilizada no bioeletrodo está, portanto, consumindo todo o oxigênio ali presente. A falta de oxigênio ali presente na superfície eletródica implica na diminuição da corrente de redução da mesma. A conclusão disto é a confirmação de que o método foi eficiente em imobilizar as enzimas GOx. Parte das enzimas ficou localizada próximo ao eletrodo, de forma que é possível a

transferência de elétrons do eletrodo para o seu cofator FAD. Parte das enzimas ficou localizada longe da superfície do eletrodo, mas disponíveis para reagir com a glicose presente na solução e se regenerar com o oxigênio. O mecanismo de transferência eletrônica direta não foi observado, visto que o FAD reagindo na superfície eletródica não apresentava atividade bioeletrocatalítica. Como próximo passo, é necessário estudar se é possível utilizar estas enzimas imobilizadas “longe” da superfície do eletrodo para promover o mecanismo de transferência eletrônica mediada.

5.1.2 Mediadores eletrônicos para a enzima Glicose Oxidase: Indicadores de pH

Para a escolha de mediadores eletrônicos para as reações envolvendo a GOx, foram utilizados alguns critérios. O primeiro critério adotado foi o de considerar a possibilidade da formação de intermediários destes mediadores próximos a superfície eletródica, a partir da molécula original. Supondo como exemplo, um processo de redução eletroquímica de uma molécula X formando uma molécula Y, de acordo com a reação apresentada em (iii):

Considerando um processo de transferência eletrônica heterogênea, têm-se algumas etapas ocorrendo durante este processo eletroquímico, conforme apresentado na Figura 14. A molécula X, presente no seio da solução, pode difundir para a região superficial do eletrodo, por uma diferença de potencial químico ou até mesmo pela agitação térmica ou convecção forçada da solução. Nas proximidades do eletrodo, esta molécula X pode formar um intermediário, induzido por outros componentes da solução, pelo próprio solvente e/ou principalmente pela ação dos altos campos elétricos produzidos pelo eletrodo. Estes processos de formação do intermediário, juntamente com possíveis processos de adsorção na superfície eletródica, envolvendo um catalisador, por exemplo, ocorrem a uma distância de mesma ordem de grandeza da dupla camada elétrica e está diretamente ligada a energia de ativação desta reação, sendo que a transferência dos elétrons, nesse caso, é mera consequência da energia de ativação adquirida anteriormente. A molécula Y formada pode então se desorver e novamente difundir para o seio da solução.

Figura 14: Esquema de uma reação eletrocatalítica heterogênea, envolvendo processos ocorrendo no seio da solução (bulk), na região superficial (sup), um intermediário (int) e possíveis processos de adsorção (ads).

O primeiro critério foi adotado levando em conta o fato de que, durante os processos de formação do intermediário, pode-se ter envolvida uma etapa de dissociação. Tendo esta idéia em mente, foi escolhido trabalhar com moléculas orgânicas, normalmente utilizadas como indicadores de pH (IpH). O fato de estas moléculas sofrerem processos dissociativos na faixa de pH de atividade das enzimas utilizadas, pode ser um indício de que seria possível estar já incluindo uma das etapas envolvendo a energia de ativação do processo, tanto para a interação com a enzima, quanto para o processo redox diretamente com o eletrodo.

Tendo a ideia de que os IpH poderiam contribuir para o processo de interesse, foi decidido adotar um segundo critério de escolha destes candidatos a mediadores eletrônicos. Este segundo critério seria o de escolher IpH que tivessem o seu ponto de equivalência (pK_a ou “ponto de virada”) próximo de pH 5,5, valor de máxima atividade para a Glicose Oxidase. Os IpH escolhidos por este segundo critério foram: Azul de Bromofenol (ABf), Vermelho de Fenol (VF), Azul de Bromotimol (ABt), Verde de Bromocresol (VBc) e Vermelho de Metila (VM).

A estrutura química dos IpH utilizados e seus respectivos voltamogramas cíclicos são apresentados na Figura 15, abaixo.

Figura 15: Estruturas e voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro em solução tampão fosfato de sódio desaerado 0,1, M pH 5,5, contendo 1 mM de: Azul de Bromofenol, Vermelho de Fenol, Azul de Bromotimol, Verde de Bromocresol e Vermelho de Metila. Experimentos eletroquímicos realizados a 50 mV s^{-1} .

A partir das Figuras apresentadas anteriormente, é possível observar que o ABf e o VF não apresentam quaisquer processos faradáicos ocorrendo nas condições experimentais adotadas. Entretanto, é possível observar um par redox referente a algum processo faradáico ocorrendo no caso do VM e um comportamento muito parecido entre o VBc e o ABt. Nestes dois casos, é observado um par redox ocorrendo próximo de -600 mV *vs* ECS e um pico de oxidação isolado, próximo de 600 mV *vs* ECS.

Pouca informação pode ser extraída quanto aos mecanismos de reação ocorrendo nestes casos, tendo apenas estes voltamogramas cíclicos como resultados. O fato é o de que o ABf e o VF já são descartados da lista nesta etapa, pelo simples fato de não serem eletroquimicamente ativos nas condições estudadas. Também já se pode especular, que os mecanismos redox envolvendo o VBc possivelmente deverão ser os mesmos que os mecanismos envolvendo o ABt, tomando como base apenas a comparação da forma das curvas, resultado dos processos redox envolvendo os mesmos.

Pensando em uma futura aplicação em biocélulas a combustível, deve-se levar em conta que um bom mediador para aplicação em um biocátodo deve apresentar um alto potencial de redução eletroquímica, enquanto que um bom mediador para aplicação em um bioânodo deve apresentar um alto potencial de oxidação eletroquímica (por convenção, um potencial negativo de oxidação), além de uma alta densidade de corrente em cada um destes processos. Em termos práticos, pode-se o fator potência de uma célula eletroquímica (Pot), como a sua capacidade de geração de energia elétrica. Esta potência é calculada como a contribuição da densidade de corrente J e da diferença de potencial ε , de acordo com a equação (iv).

$$Pot = J.\varepsilon \quad (iv)$$

Onde esta diferença de potencial ε é a diferença entre os potenciais de redução, ocorrendo no cátodo e o potencial de oxidação, ocorrendo no ânodo, de acordo com a equação (v).

$$\varepsilon = E_{cátodo} - E_{ânodo} \quad (v)$$

Levando estes fatores em consideração, se pode novamente analisar os voltamogramas cíclicos destes compostos, considerando qualitativamente estes dois parâmetros, densidade de

corrente e potencial de oxidação e redução. Neste caso, comparando os voltamogramas entre si, é possível observar que o VBc apresenta um pico de oxidação próximo de -600 mV vs SCE, com a maior densidade de corrente faradáica anódica, em comparação aos outros compostos analisados. Estes parâmetros indicam que o VBc é possivelmente o melhor candidato a mediador anódico, da lista. É observado um comportamento muito parecido para o ABt, mas numa intensidade de densidade de corrente menor, em comparação ao VBc. Tomando como um terceiro critério os valores de potencial de reação e de densidade de corrente, de acordo com as informações relacionadas às equações (iv) e (v), foi decidido dar continuidade aos experimentos com o VBc.

Apesar de estes corantes apresentarem um comportamento eletroquímico favorável, deve-se levar em conta também o fato de que as reações envolvidas nos processos de interesse devem ser reversíveis eletroquimicamente, de forma que estas duas moléculas devem apresentar um reciclo eletroquímico bem definido, evitando o consumo dos mesmos ou até mesmo a formação de produtos inertes eletroquimicamente, que possam prejudicar o ciclo reacional. Pensando em reversibilidade eletroquímica, três considerações podem ser tomadas, levando em conta as equações (vi), (vii) e (viii), abaixo (PALMORE; KIM, 1999) e (BARD; FAULKNER, 1980):

$$ip = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \quad (vi)$$

Também chamada de equação de Randles-Sevcik, a equação (vi) relaciona o aumento no valor da corrente de pico pelo aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura. Nesta equação, n é o número de elétrons envolvidos na reação eletroquímica, A é a área do eletrodo em cm^2 , D é o coeficiente de difusão da espécie envolvida em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, C é a concentração destas espécies em mol cm^{-3} e v é a velocidade de varredura em V s^{-1} .

$$\Delta Ep = (Ep)_a - (Ep)_c = 59 \text{ mV}/n \quad (vii)$$

$$\frac{(ip)_a}{(ip)_c} = 1 \quad (viii)$$

Onde Ep e ip são os valores de potencial e corrente de pico. Estas duas últimas são relações diretas observadas para alguns casos reversíveis, tomando como ideia principal, a simetria por reflexão entre os picos de oxidação e de redução.

Para fins práticos, estas três relações são apenas aproximações observadas para casos ideais, pensando na indicação de reversibilidade eletroquímica, devem ser cuidadosamente interpretadas para casos reais. O que deve ser levado em conta aqui é que é possível obter indícios de que as reações analisadas podem ou não ser reversíveis eletroquimicamente. O fato de o sistema obedecer estas três relações não garante a rigor a reversibilidade eletroquímica. Abaixo, são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o VBc, variando-se a velocidade de varredura na Figura 16.

Figura 16: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M desaerado pH 5.5, contendo 1 mM de Verde de Bromocresol, variando-se a velocidade de varredura.

Tomando como base a equação (vi), os valores de corrente de pico anódico obtidos foram representados em função dos valores da raiz quadrada da velocidade de varredura na Figura 17.

Figura 17: Relação entre os valores de corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para o Verde de Bromocresol.

É possível observar que a relação de Randles-Sevcik é obedecida para o VBc. Alguns pequenos desvios da linearidade em alguns pontos podem estar relacionados ao fato de ter se utilizado do método manual para obtenção dos valores de corrente de pico. Isto poderia ser corrigido utilizando algum método mais elaborado na obtenção dos mesmos.

Outra informação importante que pode ser extraída da Figura 17 é a de que as curvas não passam pela origem geométrica dos gráficos (ponto 0,0). A extrapolação para a velocidade de varredura zero leva a valores positivos de corrente de pico anódico. Isto provavelmente se deve ao fato de que pode existir a contribuição de mais algum fenômeno ocorrendo neste processo, relacionado a não idealidade da reação estudada e, portanto, não incluído na derivação da equação de Randles-Sevcik.

A utilização das relações (vii) e (viii) é complicada para este caso, pelo fato de que o pico de redução do VBc, na janela de potenciais de -600 a -800 mV *vs* ECS, não é bem definido nas condições experimentais utilizadas. Isto se deve ao fato de que nesta região de potencial está se iniciando o processo de redução de mais algum dos componentes presentes na solução, provavelmente dos íons H^+ , com a consequente formação e desprendimento de H_2 . Os dois processos ocorrendo concomitantemente tiram a definição do pico, que apresenta

um aumento na corrente faradáica, conforme o aumento no potencial para valores mais negativos, relativo à formação de H₂ em maior intensidade, favorecido pelo potencial.

Obtidas informações sobre a possibilidade de reversibilidade eletroquímica para as reações envolvendo o VBc, é necessário conhecer o mecanismo redox envolvido nestas reações. Como a idéia em princípio era a de se utilizar estes IpH, de forma a tomar como vantagens os processos dissociativos envolvidos a sua mudança de cor, foi tomada a estratégia de estudar os processos envolvidos com as formas protonadas e desprotonadas, características do VBc, dependendo do pH do meio (Figura 18).

Figura 18: Estrutura químicas do VBc: (i) desprotonado, (ii) parcialmente protonado e (iii) totalmente protonado.

Segundo a Figura 18, é possível se ter três formas do VBc em solução. A forma desprotonada (i) se encontra em maiores quantidades quando o pH da solução está abaixo de 3,8. O ponto de equivalência (pK_{a1}) caracteriza o valor de pH onde se tem exatamente 50% da forma desprotonada e 50% da forma parcialmente protonada (ii). No caso do VBc, este valor de pH é 3,8. Para valores acima de 3,8 a forma parcialmente protonada prevalece até o seu segundo ponto de equivalência (pK_{a2}), em pH 5,5; acima deste valor prevalece a forma totalmente protonada (iii) (DIAMOND, et. al., 2008). O desafio seria o de identificar qual das três formas seria responsável pelos processos redox. Para resolver este problema, foram realizados novamente os experimentos envolvendo a caracterização eletroquímica do VBc, para valores de pH 4,5 e 6,5. Este procedimento foi adotado, de forma a deixar o meio rico na forma parcialmente protonada do VBc, para o valor de pH em 4,5 e o meio rico na forma

totalmente protonado do VBc, para o valor de pH em 6,5. Estes resultados são apresentados na Figura 19.

Figura 19: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro, em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, sob diferentes valores de pH, desaerado. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de VBc e a 50 mVs^{-1} .

Pode-se observar pela Figura 19 um deslocamento nos potenciais de oxidação e redução, pelo simples fato de que os potenciais de oxidação e de redução dependem do pH da solução, de acordo com a equação de Nernst. O que vale destacar na Figura 19 é o fato de que é observado um aumento na corrente faradáica de oxidação, nos experimentos feitos em pH 6,5 e uma diminuição na corrente faradáica de oxidação, nos experimentos feitos em pH 4,5, ambos realizados com a mesma concentração de VBc. Estes resultados indicam que a forma do VBc que está possibilitando os processos redox é a forma totalmente protonada, sendo que a forma desprotonada está estabilizada, possivelmente por processos de ressonância entre os anéis, induzidos pela carga negativa presente no oxigênio. Estes processos podem dificultar possíveis processos redox posteriores, na forma desprotonada.

Pensando na forma deprotonada do VBc, aparentemente não existem muitas terminações por onde processos redox possam ocorrer, nesta faixa de potencial. O que chama a atenção é a presença de agrupamentos hidroxilas nos dois anéis. Um possível mecanismo envolvido neste processo, pode ser a oxidação do VBc, com a quebra da hidroxila e a formação de uma carbonila, de acordo com a Figura 20. Neste caso, o primeiro pico de oxidação, ocorrendo a valores de potencial abaixo de -200 mV *vs* ECS, poderia estar relacionado à quebra da primeira hidroxila e a formação da carbonila. O segundo pico de oxidação, ocorrendo em valores de potencial acima de 600 mV *vs* ECS, estaria relacionado à quebra da segunda hidroxila, com a formação da segunda carbonila.

Figura 20: Possível processo total redox envolvendo o VBc.

A reação proposta na Figura 20 é até o momento uma mera especulação. Outros métodos de análise devem ser aplicados, de forma a confirmar se esta é realmente a reação ocorrendo nos processos redox envolvendo o VBc.

Em complemento aos experimentos eletroquímicos, também foram realizados experimentos de espectroscopia no infravermelho (FTIR) *in-situ* durante saltos potencioestáticos, para tentar identificar os possíveis produtos e o mecanismo envolvido nas reações de interesse. Neste caso, foram aplicados saltos potencioestáticos de forma a reduzir o verde de Bromocresol (-750 mV) e de forma a oxidar o mesmo (-500 mV). Cada polarização foi realizada por 5 minutos, sendo que os experimentos de FTIR foram feitos nos primeiros 30 segundos de polarização e novamente 4 minutos após a polarização. Foram realizadas 64

aquisições no intervalo de números de onda de 4000 a 1100 cm^{-1} e o espectro resultante é uma média destas 64 aquisições. Como espectro de referência, foi utilizado um espectro obtido durante a polarização num potencial numa região longe de quaisquer processos faradáicos, a +200 mV, obtendo-se apenas corrente capacitiva pela polarização e informações do espectro sobre o solvente e sobre o Verde de Bromocresol diretamente adicionado na solução, antes de ser oxidado ou reduzido.

É possível observar os espectros de infravermelho do Verde de Bromocresol durante estes passos de polarização na Figura 21.

Figura 21: Espectros de infravermelho do Verde de Bromocresol depois de saltos potencioestáticos para reduzi-lo (-750 mV) e oxidá-lo (-500 mV).

A primeira coisa que se deve levar em conta para interpretar os resultados apresentados na Figura 31 é o de que um aumento na transmitância relativa se deve ao consumo de alguma espécie cujas ligações vibrem em certo número de onda, enquanto que a diminuição na transmitância relativa se deve à formação e/ou a produção de alguma espécie cujas ligações vibrem em certo número de onda. Neste caso, pode-se observar o aparecimento

da banda em 1680 cm^{-1} , que pode estar relacionada a vibração de cetonas terminais, o que estaria concordando com o mecanismo antes proposto, da oxidação de cada uma das hidroxilas presentes no Verde de Bromocresol para a formação de terminações carbonílicas. Estas bandas estão relacionadas com a deformação axial de terminações C=O em ligações carboxílicas presentes em anéis aromáticos (absorção entre 1680 e 1690 cm^{-1}). Em comparação a esta, as outras bandas parecem aumentar com o desenvolver do experimento, relacionado ao consumo de algum composto. Acredita-se que estas bandas estão relacionadas ao solvente ou sendo consumido ou sendo expulso da interface em estudo. Isto acontece quando, por exemplo, se tem a formação de produtos gasosos que acabam empurrando parte do solvente para fora do filme fino, por onde passa o feixe de IR. Outra possibilidade é a de que o próprio solvente está sendo consumido nesta superfície, levando a crer que a água pode estar fazendo parte das reações envolvendo o Verde de Bromocresol.

Para finalizar esta parte do trabalho, foram realizados experimentos contendo ambos, enzima e mediador, em solução. Neste caso, foi utilizado o VBc e as enzimas Glicose Oxidases em contato durante todo o experimento eletroquímico. Foi utilizada uma quantidade fixa de $0,1\text{ mg}$ de Glicose Oxidase e três concentrações de VBc e de glicose, sendo $0,05\text{ mM}$; $0,2\text{ mM}$ e $0,5\text{ mM}$.

É possível observar na Figura 22 os resultados obtidos com as enzimas e os mediadores em solução, tomando como base os processos redox envolvendo o VBc. Pode-se observar que, quando a concentração utilizada era de $0,05\text{ mM}$, eram observados os dois processos anódicos ocorrendo com relativa baixa intensidade. Ao aumentar-se a concentração para $0,2\text{ mM}$, foi observado um aumento na corrente faradáica, relativa aos dois processos de oxidação, mas não foi observado um aumento significativo na corrente faradáica relativa à redução. Quando a concentração utilizada foi de $0,5\text{ mM}$, foi observado o aumento na corrente faradáica para todos os processos.

Figura 22: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro com o sistema VBc/Glicose Oxidase/glicose, sob diferentes valores de concentração de Verde de Bromocresol, em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,5, desaerado e a 50 mV s^{-1} .

Essa diferença observada no aumento da concentração de 0,05 para 0,2 mM se deve à interação entre as enzimas e os mediadores. Pensando nos processos relacionados à Glicose Oxidase, deve-se lembrar de que estes envolvem a regeneração do FAD reduzido. No caso do sistema mediado, o FAD que foi reduzido devido a reação biocatalítica da glicose com a Glicose Oxidase, tem duas maneiras de se regenerar. A primeira seria difundindo até o eletrodo e transferindo os elétrons diretamente. A segunda seria a transferência dos elétrons para o mediador. Como se tem uma grande quantidade de enzima em contato com os mediadores, a transferência direta para o mediador é favorável. O mediador estaria, portanto, se reduzindo com as enzimas presentes na solução e não com a superfície eletródica, e novamente se reoxidando com o eletrodo. É este o motivo pelo qual não se vê um aumento na corrente de redução do VBc, quando a concentração de VBC foi aumentada de 0,05 para 0,2 mM. O mesmo estaria se reduzindo diretamente com as enzimas na solução, assim como apresentado no esquema da Figura 23. Já no caso da concentração de 0,5 mM, tem-se um excesso de mediador, com relação às enzimas, sendo que uma parte estaria se reduzindo com as enzimas e outra parte estaria se reduzindo diretamente com o eletrodo.

Figura 23: Esquema do processo redox glicose/Glicose Oxidase/Verde de Bromocresol.

Os resultados apresentados na Figura 22 confirmam a capacidade do VBc para ser aplicado como um mediador anódico para biocélulas a combustível, considerando um sistema contendo a enzima Glicose Oxidase como biocatalisador e glicose como combustível. A metodologia utilizada para esta demonstração foi por técnicas eletroquímicas em experimentos de meia-célula. Em um trabalho em colaboração com o Dr. Camilo La Rotta, foi utilizada também uma metodologia bioquímica, onde foi possível demonstrar a afinidade que a GOx apresenta com o VBc e a taxa de regeneração do cofator foi calculada, quanto a reversibilidade redox desta reação. Os valores das constantes bioquímicas obtidas o sistema GOx-VBc foram: $K_M = 0,978 \text{ mM}$, $k_{cat} = 5,11 \text{ s}^{-1}$ e $k_{cat}/K_M = 6,41 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (LA ROTTA et al., 2011). O valor de K_M (também chamada de constante de Michaelis) representa o valor de concentração de substrato onde se tem metade da velocidade máxima da reação biocatalisada. Este também representa a afinidade que a enzima tem sobre o substrato. Quanto menor o valor de K_M , maior será a afinidade que a enzima tem por seu substrato. Valores de K_M reportados na literatura para as reações envolvendo a GOx foram de 20 mM para a reação da GOx com a glicose (GIBSON et al., 1964) e de 0,25 mM para a regeneração da GOx com o oxigênio molecular (NAKAMURA et al., 1976), indicando que a GOx tem alta afinidade com o VBc. A relação mais importante em cinética enzimática é a relação k_{cat}/K_M , que é a medida do quão eficiente a enzima converte um substrato em produto. Quanto maior o valor desta relação, maior será a afinidade da enzima com o substrato e mais rápida será a velocidade da conversão do reagente, também chamado de turnover (k_{cat}). Valores de k_{cat}/K_M reportados na literatura para a reação da GOx com a glicose são de valores na ordem de $40 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (SIMPSON et al., 2007). Este valor é uma ordem de grandeza maior do que o obtido para o VBc, representado pelo baixo valor de k_{cat} obtido. Apesar de a enzima apresentar uma alta

afinidade com o substrato, a cinética reacional é lenta, visto que o VBc não é seu substrato primário para a Glicose Oxidase.

Finalmente, este mediador foi utilizado com a enzima GOx como um bioânodo em uma meia biocélula a combustível, utilizando um cátodo de Pt e foi confirmado que este bioânodo pode ser utilizado para gerar eletricidade. Apesar disto, como se pode observar pela Figura 24, a potência máxima obtida para este tipo de sistema foi de $6 \mu\text{W cm}^{-2}$, um valor considerado muito baixo para quaisquer aplicações tecnológicas. Isso se deve a baixa cinética de reação bioquímica e eletrotródica do VBc (LA ROTTA et al., 2011).

Figura 24: Curvas de potência de diferentes mediadores para a Glicose Oxidase, estudados por LA ROTTA e colaboradores. BCG representa o Verde de Bromocresol.

FONTE: LA ROTTA, H. C. E.; CINICIATO, G. P. M. K.; GONZALEZ, E. R. Triphenylmethane dyes, an alternative for mediated electronic transfer systems in glucose oxidase biofuel cells. **Enz. Microb. Tech.**, v. 48, 2011, p. 487-497.

É necessário buscar uma classe de mediadores que apresente não só as propriedades bioquímicas, físico-químicas e eletroquímicas já discutidas, mas também uma cinética eletródica considerável, de forma a se obter um maior valor de potência.

5.1.3 Mediadores eletrônicos para a enzima Glicose Oxidase: Ferrocenos

Uma segunda classe de moléculas foi escolhida para ser estudada, como possível aplicação a mediadores anódicos para as reações biocatalíticas envolvendo a Glicose Oxidase: a classe dos Ferrocenos.

Ferrocenos são moléculas metalo-orgânicas contendo um átomo de ferro rodeado por dois anéis ciclopentadienílicos (C_5H_5) (Cp), dando a forma estrutural de um sanduíche, sendo o átomo de ferro localizado no meio dos dois anéis Cp. O plano de cada um destes anéis está posicionado perpendicularmente á ligação metálica, com todos os cinco átomos de carbono aproximadamente equidistantes do átomo de ferro central. A distância entre o metal e o plano de cada anel é de 1.674 Å, o que possibilita uma perfeita comunicação eletrônica entre os mesmos (HAALAND, 1979).

Para os experimentos eletroquímicos, foram utilizados três tipos de ferrocenos: Ferroceno (FC), Ferroceno carboxaldeído (FCA) e Ferroceno ácido carboxílico (FAC), apresentados na Figura 25.

Figura 25: Estrutura química dos ferrocenos utilizados neste trabalho: (A) Ferroceno; (B) Ferroceno carboxaldeído e (C) Ferroceno ácido carboxílico.

A primeira coisa a ser fazer com estes reagentes é identificar os possíveis processos redox ocorrendo na faixa de potenciais de interesse. Para isto, foram realizados experimentos de voltametria cíclica com cada um deles. O voltamograma cíclico do FC é apresentado na Figura 26.

Figura 26: Voltamograma cíclico eletrodo de ouro contendo FC em solução. Experimentos realizados em solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1} .

Apesar de adicionado 1 mM do FC ao meio reacional, de forma a manter o mesmo padrão de concentrações que com os materiais já estudados anteriormente, é possível se observar a formação de um corpo de fundo ao final do experimento. A concentração de reagente disponível para as reações eletródicas é, portanto, menor do que os 1 mM adicionados. Isto se deve à baixa solubilidade do FC no meio aquoso. Apesar disto, foi possível observar o aparecimento de um par de picos com um potencial médio de 185 mV vs ECS (valor calculado como a média aritmética entre o potencial do pico de oxidação e o potencial do pico de redução), quando adicionado o FC na solução. Este par de picos está relacionado com o processo de oxidação do FC, formando o cátion ferrocênio (FeCp_2^+), o qual

pode ser facilmente regenerado por uma redução eletroquímica, assim como representado na Figura 27.

Figura 27: Mecanismo de oxidação do ferroceno para o cátion ferricínio (FC_{oxi}).

A reação apresentada na Figura 27 é uma reação eletroquímica rápida. Tanto a estabilidade, quanto o comportamento eletroquímico do cátion formado são fortemente dependentes do solvente utilizado. Waggoner e Mukherjee observaram que o potencial formal do ferroceno diminuiu de 100 mV, quando a concentração de água na mistura de acetona/água foi aumentada de 60 para 95 % (v/v) (WAGGONER; MUKHERJEE, 1982). Em um trabalho seguinte, Zara e colaboradores observaram uma decomposição muito lenta do ferroceno em solução de etanol 2% em água (v/v), observando o aparecimento de um segundo pico anódico irreversível e a formação de um produto verde, provavelmente associado com uma reação de oxidação do íon FeCp_2^+ , gerando um produto que se decompõe rapidamente (ZARA et al., 1987). A ideia de instabilidade do íon FeCp_2^+ foi reforçada pelo trabalho de Prins e colaboradores utilizando a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, pelo qual puderam observar a decomposição deste cátion na presença de Cl^- e Br^- , produzindo ferroceno e FeCl_4^- ou FeBr_4^- , ou na presença de um solvente aprótico (S), um solvente que não possui um íon H^+ dissociável, tal como o dimetilsulfóxido ou a dimetilformamida (PRINS et al., 1972), a partir de uma reação do tipo:

Apesar da baixa solubilidade do ferroceno em água, como solvente, esta não só estabiliza a formação do cátion, por ser um solvente prótico (um solvente que possui um íon H^+ dissociável), como também desloca o potencial formal do ferroceno para potenciais menos

positivos, o que é vantajoso para sua aplicação como um bioânodo para biocélulas a combustível.

Em termos estruturais, sabe-se que a perfeita interação entre os orbitais π de cada anel Cp e os orbitais d do átomo de ferro, presentes no ferroceno, é responsável pela coordenação, reatividade química, fotoquímica, além de suas propriedades eletroquímicas (FERY-FORGUES; DELAVAUX-NICOT, 2000).

Quando feito o mesmo experimento com o FAC, é possível observar o aparecimento de um par de picos muito bem definidos, com um potencial médio de 292 mV vs SCE (Figura 28). O maior valor de corrente obtido nas reações de oxidação e de redução para o FAC, em comparação ao FC, se deve ao fato de que o mesmo se solubilizou muito bem na solução tampão utilizada, enquanto que o FC se solubilizou muito pouco nas mesmas condições experimentais utilizadas.

Figura 28: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro, contendo FAC em solução. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FAC em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1} .

Se comparados os valores de potencial médio do FC e do FAC, é possível observar que o potencial médio do FAC é 107 mV maior do que o do FC. O menor potencial médio do FC indica uma maior espontaneidade para a reação de oxidação, em comparação com o FAC, pelo fato de apresentar o maior potencial de oxidação.

Estudos recentes envolvendo a determinação da densidade de carga sobre o átomo de ferro presente no ferroceno mostraram que esta é fortemente dependente dos grupos funcionais presentes nos anéis Cp.

Makal e colaboradores mostraram que a adição de duas metilas (met) aos anéis Cp aumentava a densidade de carga elétrica no átomo de ferro de 6,00 para 6,05, comparando-se a estrutura do ferroceno sem a modificação por grupos funcionais, enquanto que a adição de dez metilas aos anéis Cp aumentava a densidade de carga elétrica do átomo de ferro de 6,00 para 6,50, relacionando este fenômeno à capacidade de doação de densidade eletrônica de cada uma destas metilas para os orbitais π de cada um destes anéis, que por consequência, acabaria por compartilhar esta densidade eletrônica com os orbitais não ocupados presentes no átomo de ferro. Estes elétrons em excesso são preferencialmente localizados nos orbitais orientados ao longo do eixo principal da molécula do ferroceno (o eixo conectado aos centróides de cada anel Cp), chamados de orbitais dz^2 e dx^2-y^2 (MAKAL et al., 2010).

Em trabalho seguinte desenvolvido por Clegg e colaboradores, foi comprovado que o potencial de oxidação determinado para o ferroceno em acetonitrila diminuía de 0,371 V para 0,367 V, no caso do dimetil ferroceno e para 0,113 V, no caso do decametil ferroceno (CLEGG et al., 2005). O baixo potencial de oxidação do decametil ferroceno pode estar relacionado com a maior densidade eletrônica presente no átomo de ferro, resultado da presença da grande quantidade de terminações metilas aos anéis Cp, os quais podem estar facilitando o processo de oxidação no átomo de ferro da estrutura do decametil ferroceno (Figura 29).

Figura 29: Efeito de grupos funcionais na densidade de carga sobre o átomo de ferro da molécula de ferroceno, dimetil ferroceno e decametil ferroceno com o potencial de oxidação, segundo trabalhos de Makal e colaboradores; e Clegg e colaboradores.

FONTE: MAKAL, A. M.; PLAZUK, D.; ZAKRZEWSKI, J.; MISTERKIEWICZ, B.; WOZNIAK, K. Experimental charge density analysis of symmetrically substituted ferrocene derivatives **Inorg. Chem.** v. 49, 2010, p. 4046-4059.

CLEGG, A. D.; REES, N. V.; KLYMENKO, O. V.; COLES, B. A.; COMPTON, R. G. Marcus theory of outer-sphere heterogeneous electron transfer reactions: High precision steady-state measurements of the standard electrochemical rate constant for ferrocene derivatives in alkyl cyanide solvents. **J. Electroanal. Chem.** v. 580, 2005, p 78-86.

Tomando como base estes trabalhos, é possível concluir que o maior potencial médio do FAC deve estar relacionado com a presença do grupo funcional carboxílico. Diferente do grupo funcional metila, o grupo funcional carboxila apresenta uma forte capacidade de atrair os elétrons da molécula de ferroceno, devido à alta eletronegatividade dos átomos de oxigênio

presentes, retirando um pouco da densidade eletrônica dos anéis Cp e por consequência, do átomo de ferro pertencente à molécula de ferroceno. É de se esperar, portanto, uma densidade de carga elétrica menor do que 6,00 no átomo de ferro no caso do FAC, o que diminui sua espontaneidade para a reação de oxidação, em comparação com o FC. Estes resultados mostraram como o potencial formal do ferroceno é fortemente sensível a presença de diferentes grupos funcionais presentes em cada um dos anéis Cp, sugerindo a possibilidade de se desenvolver outros ferrocenos modificados, de forma a aumentar seu potencial de oxidação e possivelmente aumentar sua solubilidade no meio reacional.

Outro ferroceno utilizado neste trabalho foi o FCA. É possível observar o voltamograma cíclico do FCA na Figura 40 sob as condições experimentais.

Figura 30: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro, contendo FCA em solução. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FCA em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1} .

Diferente do FC e do FAC, o FCA apresentou um voltamograma cíclico bastante complexo, referentes aos processos de oxidação e de redução. É possível observar um pico de oxidação bastante intenso se iniciando próximo de 400 mV vs ECS e dois picos de redução, o primeiro próximo de 200 mV vs ECS e o segundo próximo de 400 mV vs ECS. Da mesma

forma que com o FAC, o FCA apresentou um alto valor de densidade de corrente para os processos faradáicos, em comparação com o FC, pelo fato de que se solubilizou muito bem na solução utilizada. É interessante observar que todos estes picos perdem intensidade com o aumento do número de ciclos até atingir uma situação estacionária, onde não é observado mais nenhum dos picos, provavelmente devido à degradação do FCA, possivelmente por alguma etapa química seguida de alguma das reações redox observadas. Esta degradação é facilmente acompanhada pela coloração da solução, que apresenta inicialmente uma coloração alaranjada intensa e no final de uma batelada de experimentos começa a apresentar uma coloração levemente alaranjada, tendendo para o amarelo, tornando-se incolor com o aumento do número de ciclos.

Tendo estabelecido o comportamento eletroquímico dos ferrocenos, estes foram adicionados em contato com as enzimas em solução, para estudar sua atividade como mediador para as reações de oxidação da glicose, envolvendo a enzima Glicose Oxidase.

O primeiro composto estudado desta maneira, em contato com a Glicose Oxidase foi o ferroceno, como apresentado na Figura 31.

Figura 31: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FC, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1} .

É possível observar pela Figura 31, que a adição das enzimas ao meio reacional promove o aumento da corrente faradáica anódica, referente à oxidação do ferroceno, após o pico de 200 mV *vs* ECS. Ao invés da corrente faradáica cair em detrimento do esgotamento do reagente na superfície eletródica, é observado o aumento desta corrente. Isto se deve ao fato de que o FC está reagindo (se reduzindo) e, portanto, se regenerando com as enzimas presentes na solução e novamente se oxidando sob a superfície eletródica. O sistema atinge uma situação de equilíbrio, onde a GOx (na verdade, o FAD presente na estrutura enzimática) oxida a glicose, se regenera reduzindo o FC, que é oxidado sob a superfície eletródica. A quantidade de FAD reduzido sob a superfície eletródica é muito grande na escala de tempo do experimento, devido à alta cinética enzimática, que o regenera quase que instantaneamente. O esquema da reação mediada do FC com a GOx é apresentado na Figura 32, abaixo.

Figura 32: Mecanismo de reação anódica mediada do FC com a Glicose Oxidase.

É possível observar pelo mecanismo apresentado pela Figura 31, que o FC oxidado está se reduzindo com o FAD em solução. Apesar disto, é possível observar um pico de redução referente ao mesmo. Isto se deve a alta velocidade de varredura utilizada. Parte do FC está se reduzindo com as enzimas em solução, mas a velocidade com que o potencial é varrido é tão rápida, que um excesso de FC que não se reduziu com as enzimas está se reduzindo diretamente sob a superfície eletródica.

Se realizado o experimento tendo a mesma quantidade de enzima e substrato (glicose), mas com uma menor concentração de FC e realizado a baixa velocidade de varredura, é possível observar além do aumento na corrente faradáica anódica, o desaparecimento total do pico de redução (Figura 33). A varredura é tão lenta, que há tempo suficiente para todo FC se

reduzir com as enzimas, não sobrando praticamente nenhum FC disponível para se reduzir sob a superfície eletródica. Esta é uma prova de que o FC está agindo com a enzima GOx, de forma a promover o mecanismo de transferência mediada.

Figura 33: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 0,1 mM de FC, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M desaerado e a 1 mV s^{-1}

Os resultados apresentados nas Figuras 30 e 32 mostram claramente um efeito catalítico mediado pelo FC sobre a reação de oxidação da glicose, proporcionado pela enzima Glicose Oxidase. A Figura 33 apresenta a atividade bioeletrocatalítica da GOx em oxidar a glicose, utilizando o FC. Isto é evidenciado pela forma da curva, a qual representa se assemelha a curvas representativas para uma reação bioeletroquímica, para experimentos de voltametria de filme de proteínas, assim como formulado pro Armstrong e colaboradores (ARMSTRONG, 2002).

Quando foi feito o mesmo experimento com o FAC, foi possível observar um aumento na corrente anódica num potencial acima do potencial de pico, mas muito pouco pronunciado, quando comparado ao mesmo processo utilizando o FC, como observado na Figura 34.

Figura 34: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FAC, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1} .

Esta informação nos leva a acreditar que não está ocorrendo uma reação com a GOx, pois não é observada a resposta de corrente ao efeito catalítico, quando adicionados ambos em solução. Uma explicação para isto é que a adição da terminação carboxílica impede que o FAC entre no sítio ativo da GOx para reagir com o FAD ali presente. Este impedimento pode ser devido a possibilidade de uma repulsão eletrostática entre o FAC e o sítio ativo da GOx. Como observado pela Figura 35, a entrada do sítio ativo da GOx (indicado pela seta), apresenta uma densidade de carga resultante negativa em sua superfície.

A presença de um excesso de carga negativa na superfície da enzima pode estar repelindo o FAC carregado negativamente, impedindo-o de entrar no sítio ativo da GOx e reagir com o cofator FAD ali presente. Esta pode ser uma explicação para o fato de que não é observada uma atividade catalítica para a reação de oxidação da glicose, pela Glicose Oxidase, mediada pelo FAC.

Figura 35: Estrutura de cargas superficiais de uma das subunidades da Glicose Oxidase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Glicose Oxidase de *Aspergillus niger*, com o número de identificação 1CF3. A seta indica o sítio ativo da GOx.

Esta carga resultante negativa se deve a presença de alguns resíduos de aminoácidos contendo terminações carboxílicas, como o aspartato (ou ácido aspártico) e o glutamato (ou ácido glutâmico) na estrutura enzimática (Figura 36).

Figura 36: Estruturas dos resíduos de aminoácidos carregados negativamente.

Negatively charged R groups

Quando é feito o mesmo experimento com o FCA e as enzimas em solução, é possível observar, que apesar do FCA se degradar ciclo após ciclo, assim como apresentado anteriormente, ainda é possível observar alguma atividade biocatalítica mediada (Figura 37), pois é observado que as curvas cheias (experimentos realizados com GOx em solução) apresentaram uma corrente anódica maior do que as curvas tracejadas (experimentos realizados sem GOx em solução). É possível observar também um ligeiro aumento na corrente anódica após o potencial de pico anódico, mas não é observado um aumento tão significativo quanto o das reações do FC com a GOx. Isto significa que o processo bioeletrocatalítico envolvendo o FCA não é tão eficiente quanto o processo bioeletrocatalítico envolvendo o FC para as reações com a Glicose Oxidase.

Figura 37: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FCA, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M desaerado e a 50 mV s^{-1} .

Outra informação relevante a ser considerada é que as enzimas parecem estar conservando o FCA, impedindo-o de se degradar, de alguma forma. Podemos observar, por exemplo, que o FCA já não apresenta o pico de oxidação bem definido depois de 30 ciclos de experimento, sem a presença da GOx na solução, enquanto que, o mesmo ainda apresenta o

pico de oxidação com boa definição depois de 30 ciclos de experimento com a presença da GOx na solução. Uma possível explicação para isto é que o FCA pode estar se degradando durante o processo de redução eletródico e não durante o processo de redução diretamente com o FAD presente na GOx.

5.1.4 Envenenamento do bioânodo com a enzima Glicose Oxidase em O₂

A completa redução do FAD envolve a inserção de dois elétrons e dois prótons em sua estrutura, como apresentado anteriormente na Figura 11. Sua regeneração naturalmente ocorre via oxidação com o O₂, pelo fato de ser um forte agente oxidante. O produto final formado nesta regeneração é o peróxido de hidrogênio, pela inserção destes dois elétrons e dois prótons na molécula de O₂. O maior problema neste caso é o de que o O₂ estaria agindo como um competidor pelos elétrons que desejamos utilizar no bioânodo da biocélula a combustível, assim como apresentado na Figura 38. É de se esperar que o funcionamento do bioânodo seja fortemente prejudicado pela presença do O₂ em contato com as enzimas, visto que a cinética de regeneração natural pelo O₂ (k_{nat}) deve ser muito maior que a cinética de regeneração pelo mediador em contato com as enzimas (k_{med}).

Figura 38: Mecanismo de competição entre o FC e o O₂ para regeneração da Glicose Oxidase.

Para comprovar este processo de competição, foram realizados novos experimentos eletroquímicos para estudar a atividade bioeletrocatalítica da Glicose Oxidase com a solução aerada e desaerada, como apresentado na Figura 3.

Figura 39: Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro. Experimentos realizados com concentração de 1 mM de FC, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GOx e 20 mM de glicose em solução tampão fosfato de sódio pH 5.5 0,1 M aerado e desaerado e a 50 mV s^{-1} .

É possível observar claramente pela Figura 39 que a corrente de oxidação do FC foi prejudicada com a adição de O_2 na solução, quando realizados experimentos com a mesma quantidade de mediador, enzima e glicose. Este processo se deve puramente a regeneração enzimática pelo O_2 , visto que não era esperado nenhum outro processo superficial envolvendo o O_2 . Apesar disto, é possível observar algum processo faradáico ocorrendo em potenciais acima de 400 mV e abaixo de 0 mV. Estes processos não devem estar relacionados com a formação de óxido no ouro, pois o mesmo ocorre apenas a potenciais acima de 800 mV nas mesmas condições e nem com a redução eletroquímica do O_2 , pois o mesmo geralmente ocorre em potenciais menores do que -300 mV vs ECS. Estas reações podem estar relacionadas com o peróxido formado enzimaticamente em solução.

Este experimento apenas confirma o efeito prejudicial do O_2 nas reações anódicas de interesse. Este problema já deveria ser esperado, visto que uma característica que define as

enzimas como “oxidases” é a necessidade da presença do oxigênio molecular para promover a regeneração de seu sítio ativo. Para fins práticos, isto é um problema bastante grave, visto que a competição das reações anódicas com o O_2 levaria a um considerável baixo desempenho da célula, visto que os elétrons que estariam sendo extraídos do combustível estão sendo perdidos para o O_2 , o receptor natural destes elétrons, segundo o mecanismo natural da GOx. Outra classe de enzimas que também apresentam propriedades redox, mas funcionam por mecanismos reacionais diferentes das oxidases, principalmente pelo fato de não utilizar o O_2 como receptor natural de elétrons são as enzimas da classe das desidrogenases e uma enzima em especial deste grupo, a Glicose Desidrogenase, pode ser uma alternativa interessante a Glicose Oxidase.

5.1.5 Estudos bioeletroquímicos envolvendo a enzima Glicose Desidrogenase

A Glicose Desidrogenase (GDh), também relatada pelo nome glicose 1-desidrogenase e pelo número de comissão EC 1.1.1.47, é uma enzima tipicamente bacteriana, mas é também encontrada em alguns insetos. O sítio ativo relacionado à ação da Glicose Desidrogenase é, assim como o da Glicose Oxidase, constituído por resíduos de aminoácidos, na forma de uma cavidade presente na superfície enzimática, sendo relacionado à orientação e ligação do substrato.

A GDh apresenta a capacidade de promover a oxidação biocatalítica de moléculas de β -D-glicose, tem como produto final, a formação de gliconolactona (D-glicono-1,5-lactona), que, assim como no caso da GOx, esta pode ser hidrolisada, formando-se ácido glucônico, considerado muitas vezes como seu produto final. A GDh, assim como a maioria das desidrogenases, apresenta grande especificidade para outros substratos, que não o seu substrato principal, no caso, a β -D-glicose. Na Tabela 2, abaixo, é apresentada uma comparação da atividade de oxidação e especificidade para com diferentes carboidratos para a GOx e GDh, obtidos por Carr e Bowers; e Haunge (CARR; BOWERS, 1980) e (HAUNGE, 1960).

Tabela 2: Especificidade da Glicose Desidrogenase e Glicose Oxidase quanto a outros carboidratos, com em relação à β -D-glicose. Os traços “-” indicam que o experimento com tal substrato e enzima não foi realizado.

	Glicose Desidrogenase	Glicose Oxidase
β-D-glicose	100	100
D-galactose	66	0,1
L-arabiose	51	-
D-manose	30	1,0
D-xilose	27	1,0
D-ribose	7,5	-
D-α-desoxiglicose	4,5	25
D-gliceraldeído	1,0	-
L-xilose	0,0	-
α-D-glicose	-	0,6
Trealose	-	0,3
Maltose	-	0,2

FONTE: CARR, P. W.; BOWERS, L. DL. **Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry**: fundamentals and applications. New York: Wiley, 1980. p. 62.

HAUGE, J. G. Kinetics and specificity of glucose dehydrogenase from *Bacterium Anitratum*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 45, p. 263-169, 1960.

A Glicose Desidrogenase é uma enzima que apresenta especificidade para utilizar tanto o cofator Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) quanto o Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADPH). Diferentemente da Glicose Oxidase, ela apresenta dois sítios ativos por cada uma das unidades de enzima. É possível observar pela Figura 40, duas moléculas de NADH (estruturas verde em palito), ligadas a cada sítio ativo na estrutura da GDh, localizadas em posições opostas.

Figura 40: Estrutura da Glicose Desidrogenase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Glicose Desidrogenase de *Bacillus megaterium*, com o número de identificação IWG3.

Cada sítio ativo presente na estrutura da GDh funciona de maneira independente. Uma molécula de glicose se encaixa em um dos sítios ativos da GDh. A reação biocatalítica da enzima é promover a ligação desta molécula de glicose com uma molécula de NAD^+ também adsorvida neste sítio ativo. A glicose é oxidada devido a esta interação com o NAD^+ , formando gliconolactona e o NAD^+ é reduzido, formando NADH. São os elétrons contidos no NADH que devem ser extraídos para serem utilizados a realizar o trabalho elétrico útil e que devem ser coletados pelo ânodo. Mas assim como apresentado no capítulo introdutório, a oxidação direta do NADH sobre a superfície eletródica de materiais convencionais, como Pt, Au ou até materiais carbonáceos requer um alto sobrepotencial. Felizmente, alguns corantes da família das tiazinas apresentam a capacidade de oxidar cataliticamente o NADH a baixos valores de sobrepotenciais.

5.1.6 Eletrodeposição do Verde de Metileno e oxidação do NADH

O Verde de Metileno (VMet) é um reagente pertencente a família das tiazinas. É muito utilizado na indústria química como um corante. Recentemente, foram descobertas certas propriedades eletroquímicas e bioquímicas que fizeram do VMet uma molécula de bastante interesse tecnológico. Do ponto de vista da bioquímica, o monômero verde de metileno apresenta a capacidade de oxidar moléculas de NADH em solução. A NADH é uma molécula bastante estável, quimicamente, e por muito tempo se tem buscado formas de se oxidar esta molécula eletroquimicamente, o que representaria grandes avanços para a indústria biomédica e de sensores. Do ponto de vista da eletroquímica, esta oxidação não é apenas espontânea, mas também é reversível. Os elétrons provenientes desta oxidação podem ser transportados para um ânodo, onde o verde de metileno agora reduzido pode facilmente se re-oxidar sobre a superfície de um eletrodo, podendo novamente oxidar uma nova molécula de NADH, fechando-se o ciclo. Além disto, o verde de metileno também pode ser depositado na forma de um filme fino, a partir da polimerização de seu monômero por via eletroquímica, sobre a superfície de um eletrodo, sem perder as suas propriedades redox de interesse.

É possível observar o comportamento redox do Vmet nas condições experimentais utilizadas neste trabalho pela Figura 41. Mantendo os voltamogramas cíclicos em uma janela de potencial entre -500 e 800 mV *vs* Ag/AgCl/Cl⁻(sat) são observados dois pares de picos redox, que são referentes a reações de oxi-redução envolvendo o Vmet sobre a superfície do papel Toray.

Figura 41: Experimentos de voltametria cíclica com o VMet em solução, fora da região de eletrodeposição. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 desaerada com 0.5 mM de VMet e 0.1 M de KNO_3 . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Zhou e colaboradores mostraram que cada par de picos está relacionado a uma reação redox envolvendo o VMet com um único elétron cada. Eles também mostraram que estas reações são dependentes do pH da solução, de forma que tanto o pico catódico (E_{pc}) quanto o pico anódico (E_{pa}) se deslocam na direção de potenciais negativos com o aumento do pH. A inclinação de um gráfico contendo $(E_{pa} + E_{pc})/2$ vs pH para ambos os pares redox era em torno de 51 mV/pH , o que sugere um processo eletroquímico procedido da participação de um íon de hidrogênio em cada passo (ZHOU et al., 1996).

Com a janela de potencial aumentada para até um máximo de $1.3 \text{ V vs Ag/AgCl/Cl}^-$ (sat), um ombro foi observado em potenciais se iniciando em torno de $800 \text{ mV vs Ag/AgCl/Cl}^-$ (sat), correspondendo a uma nova reação de oxidação, assim como apresentado na Figura 42. Não é observado nenhum pico de redução referente a esta reação de oxidação, indicando que deve se tratar de uma reação eletroquímica seguida de uma etapa química. O efeito observado desta etapa química é o aparecimento de um filme fino marrom esverdeado sobre a superfície do papel Toray, que se trata de um filme de Poli-Verde de Metileno (PVMet) eletrodepositado sobre a superfície do material eletrodico.

Figura 42: Eletrodeposição de VMet sobre a superfície de carbono vítreo por voltametria cíclica. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 desaerada com 0.5 mM de VMet e 0.1 M de KNO_3 . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A presença do monômero de VMet oxidado polimerizado sobre a superfície do papel Toray desloca o potencial do pico anódico para valores de potencial mais positivos e o potencial catódico para valores de potencial mais negativos. Este também promove o desaparecimento do primeiro par de picos redox nos voltamogramas cíclicos, que desaparece após o primeiro ciclo de potenciais, provavelmente fundindo-se ao segundo par de reações redox. Assim como discutido anteriormente, a eletrodeposição do PVMet não interfere em suas propriedades redox de interesse. Isto se deve ao fato de que a polimerização do mesmo deve ocorrer em uma região da estrutura química do VMet diferente da que promove as reações de oxidação e redução do VMet. Estas terminações redox são preservadas durante a polimerização. O deslocamento dos potenciais dos picos de oxidação e de redução se deve simplesmente a presença de uma concentração não-Nernstianas de espécies sobre a superfície eletródica, o filme polimérico eletrodepositado.

A Figura 43 apresenta uma imagem de espectroscopia eletrônica de varredura, onde é possível observar a formação de um material depositado sobre uma fibra do papel de carbono Toray. Pode-se observar que a deposição do material não chega a formar um filme fino, uniformemente distribuído, mas este se deposita sobre o suporte na forma de pequenos aglomerados. A comprovação de que este material depositado é o Verde de Metileno se deve

pelos experimentos de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) apresentados na Figura 44, onde é possível observar o sinal do enxofre, presente na estrutura molecular do VMet e do zinco, presente na estrutura do sal que faz parte da composição do material.

Figura 43: Imagen de microscopia eletrônica de varredura de uma fibra do papel Toray contendo o Verde de Metileno depositado

Figura 44: Espectro de EDS do aglomerado depositado sobre a fibra do papel Toray apresentado na Figura 43.

De forma a confirmar a oxidação do NADH utilizando o VMet polimerizado sobre a superfície do papel Toray, foram realizados experimentos de voltametria de varredura linear com o eletrodo contendo o PVMet em solução de tampão fosfato de sódio na ausência e na presença do NADH. Os resultados obtidos por estes experimentos são mostrados na Figura 45.

Figura 45: Experimentos de voltametria de varredura linear para oxidação do NADH utilizando PVMet em papel Toray. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0. Velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

É possível observar pela Figura 45 o aparecimento de uma corrente faradáica de oxidação, iniciando-se em torno de $0 \text{ mV vs Ag/AgCl/Cl}^{-}(\text{sat})$ quando foi adicionado NADH em solução. É observado também que aumentando a concentração de NADH em solução se têm também um aumento maior neste valor de corrente. Isto se deve ao fato de que o VMet apresenta a capacidade de oxidar o NADH cataliticamente, formando NAD^{+} (NAD oxidado), enquanto que o VMet age como o agente oxidante, se reduzindo, formando VMet reduzido (VMet_{red}). Este VMet_{red} pode-se então se oxidar novamente na superfície eletródica, promovendo então esta corrente faradáica de oxidação, formando como resultado final o VMet. O resultado deste processo todo é a geração de uma corrente anódica com a oxidação

do NADH, seguido do ciclo de reações envolvendo o VMet. As reações de oxidação e de redução do NAD são apresentadas na Figura 46.

Figura 46: Reações de oxidação e de redução envolvendo a NAD.

FONTE: LENHINGER, A. L. **Lenhinger principles of biochemistry 4th ed.**, New York: W. H. Freeman, 2005, p. 513.

Vale destacar aqui que nenhuma corrente faradáica é observada quando se têm apenas NADH em solução. O NADH não se oxida espontaneamente na superfície eletródica, nas condições experimentais utilizadas e na janela de potenciais utilizada.

A reação bioeletrocatalítica é considerada incluindo a reação de oxidação do NADH utilizando o VMet polimerizado sobre a superfície eletródica. Têm-se então a oxidação bioeletrocatalítica da glicose pela GDh seguido de uma cascata de reações envolvendo o NADH e o VMet, resultando na geração de corrente anódica sobre a superfície eletródica. O VMet neste caso está agindo como um mediador para as reações biocatalíticas envolvendo a GDh, assim como mostrado na Figura 47.

Figura 47: Reações em cascata envolvendo a oxidação da glicose pela GDh, o NADH e o VMet sobre a superfície do papel Toray.

Para a imobilização da GDh, foi utilizada uma solução de 1 mg de GDh em 100 μ L de quitosana, sobre a superfície do papel de Toray contendo já o filme fino de PVMet. A quitosana é um material biocompatível e, por si só, permite a imobilização de biocatalisadores, pois a estrutura química da quitosana possibilita a interação entre cargas com os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura enzimática e, portanto, uma imobilização por aprisionamento. Além disso, apesar de a quitosana ser hidrofóbica, esta apresenta canais hidrofílicos dentro de sua estrutura pelos quais a solução pode fluir e transportar o eletrólito contendo o soluto para as enzimas presentes ali. Na Figura 48 é possível observar duas imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando as fibras do papel Toray sem a quitosana (A) e após a adição da solução contendo GDh e quitosana (B). A solução de quitosana se adsorve entre as fibras do papel Toray e as enzimas ficam disponíveis ali para reagir com a glicose e o NAD⁺, presentes na solução.

Figura 48: Imagens de microscopia eletrônica de varredura do (A) papel Toray e (B) do papel Toray com a solução de quitosana.

A atividade bioeletroquímica da GDh foi confirmada experimentalmente a partir de experimentos eletroquímicos do tipo Michaelis-Menten com os bioeletrodos contendo GDh imobilizada em quitosana e adicionada sobre a superfície eletródica. Para este tipo de experimento, é aplicado um valor de potencial e o analito é adicionado a solução. A corrente resultante da reação biocatalítica é acompanhada com o tempo. Estes experimentos também são importantes para identificar as condições operacionais ótimas para a utilização dos bioeletrodos.

Experimentos eletroquímicos considerando a adição de glicose e de NAD^+ são mostrados nas Figuras 49 e 50, respectivamente.

Figura 49: Resultado de cronoamperometria, adicionando glicose em solução. Experimentos realizados com a aplicação de um potencial de 0.2 V. Adição de 10 mM de glicose a cada 300 s, em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 100 μ M de NAD^+ .

Figura 50: Resultado de cronoamperometria, adicionando NAD^+ em solução. Experimentos realizados com a aplicação de um potencial de 0.2 V. Adição de 100 μ M de NAD^+ a cada 150 s, em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 100 mM de glicose.

Pode-se observar pela Figura 49 que há um salto de corrente depois da primeira adição de glicose em solução. Isto se deve ao fato de que a solução não é agitada e por isso se têm uma limitação de transporte de glicose até as enzimas presentes na superfície eletródica. Com o passar do tempo, há a homogeneização da concentração da glicose em solução e esta limitação passa a ser menos pronunciada. Tal como um comportamento muito típico para sistemas biocatalíticos, observa-se um aumento na corrente catalítica relacionada a atividade bioeletrocatalítica até que esta resposta atinge um máximo de turnover, onde todas as enzimas estão a sua máxima atividade. Com a adição de mais substrato, excedendo esta concentração de máxima atividade, é possível observar uma diminuição desta atividade devido a inibição enzimática por excesso de substrato. O máximo de atividade para a GDh foi de aproximadamente 100 mM para a concentração de glicose e de 900 μM para concentração de NAD^+ . Estes valores foram utilizados para os experimentos seguintes, envolvendo este bioânodos. Voltamogramas cíclicos do bioânodo contendo GDh em quitosana nas condições ideais são mostrados na Figura 51.

Figura 51: Voltamogramas cíclicos do papel Toray contendo PVMet eletrodepositada e Glicose Desidrogenase imobilizada em quitosana. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 desaerada com 900 μM de NAD^+ e 90 mM de glicose. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . I representa 10 ciclos e II representa 50 ciclos adicionais.

A partir dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 51, é possível observar pela curva vermelha o aparecimento dos picos redox envolvendo as reações do VMet sobre a superfície eletródica, assim como apresentado anteriormente. A adição do filme biocatalítico contendo a enzima Glicose Desidrogenase (GDh) em quitosana (curva azul) promove um aumento na densidade de corrente se iniciando na mesma faixa de potencial que se têm a reação de oxidação do VMet, porém, por efeito das reações biocatalíticas promovidas pela GDh, não é observado uma diminuição da corrente de oxidação com o aumento do potencial, que seria esperado pela escassez do reagente na superfície eletródica e sim, um aumento da mesma. Isso se deve a regeneração (re-oxidação) do NADH sobre o filme catalítico de Verde de Metileno, polimerizado sobre o papel Toray. Da mesma forma, pode-se observar que o pico de redução do VMet diminui no voltamograma da figura azul, pelo fato de que o VMet está sendo reduzido, de forma a oxidar o NADH, e não diretamente sobre a superfície eletródica, tal como ocorre na curva vermelha.

A curva azul representa o décimo ciclo de um experimento inicial para se estudar o comportamento deste bioânodo. O mesmo experimento foi realizado logo em seguida, com o mesmo bioeletrodo, mesma solução eletrolítica, a mesma velocidade de varredura, porém, com 50 ciclos adicionais e aumentando a janela de potenciais para um máximo de 1500 mV vs ECS (curva verde). Comparando as curvas verde e azul, é possível observar que o bioeletrodo mantém a sua atividade bioeletrocatalítica, mas que a densidade de corrente cai em detrimento do consumo da glicose presente na solução. Não é observado um plateau neste voltamograma cíclico, que indicaria alguma limitação por transporte de massa, a qual deveria ser esperada a altos valores de potencial, indicando que a limitação deve ser cinética. Como a glicose é o substrato principal da GDh e o NAD^+ é o co-substrato principal da mesma, não é de se esperar que a limitação cinética será para esta reação, mas provavelmente das reações envolvendo o NADH com o VMet. Apesar disto, as reações bioeletrocatalisadas pela GDh, tendo o NAD^+ como cofator e o VMet como mediador ocorreram a baixos valores de potencial e a altos valores de densidade de corrente, na ordem de grandeza de mA cm^{-2} , o que é desejável para uma aplicação como um bioânodo para biocélula a combustível.

Obtida a condição de ótimo desempenho para o bioânodo, foram realizados também experimentos galvanostáticos, aplicando saltos de valores de corrente, iniciando do valor de aproximadamente zero de corrente até um valor estabelecido e o potencial referente a estes

valores de corrente foi coletado. A escolha do método galvanostático foi feita, pelo fato de que o bioeletrodo atinge uma situação de estado quase-estacionário mais rapidamente do que utilizando o método potenciostático. O valor de potencial estável para a corrente aplicada foi considerado calculando-se a média dos últimos 100 pontos obtidos no experimento e os valores de corrente e potencial foram adicionados a Figura 52. Os valores de erro representam a triplicata do experimento. A densidade de corrente foi calculada dividindo-se a corrente obtida pela área geométrica do eletrodo.

Figura 52: Resultado de curva de polarização do bioânodo contendo GDh em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

É possível observar pela Figura 52 o resultado do desempenho do bioânodo em termos de oxidação bioeletrocatalítica de glicose. Um valor de potencial de 0 mV foi obtido para uma corrente de $340 \mu\text{A cm}^{-2}$, nas condições otimizadas para o bioânodo. Apesar da considerável alta densidade de corrente obtida (para um bioeletrodo), não é observada uma limitação por transferência de massa em até $350 \mu\text{A cm}^{-2}$, isso pode estar relacionado tanto com o fato de que o bioeletrodo está sendo utilizado nas condições ideais de concentração de glicose e de NAD^+ e que o catalisador para a redução do NAD, o VMet, está presente em grande quantidade. A curva intitulada “Branco” representa o mesmo experimento realizado sem GDh.

5.2 Reações de bioeletroredução do oxigênio molecular

5.2.1 Estudos bioeletroquímicos envolvendo as enzimas Lacases

Em complemento as enzimas GOx e GDh, que podem ser aplicadas como bioânodos para BC, existem as enzimas da família das multi cobre oxidases, muitas vezes denominadas como enzimas oxidases de cobre azul (*blue copper oxidase*), que possuem alta capacidade de realizar a bioeletroredução de oxigênio molecular, fazendo destas possíveis candidatas para serem aplicadas como biocátodos para BC.

Dentre esta classe das multi cobre oxidases, as enzimas mais utilizadas, que possibilitam a redução do oxigênio molecular, são as enzimas denominadas Lacase (Lac), identificadas pelo número de comissão E.C. 1.10.3.2. São glicoproteínas na forma de dímeros ou tetrâmeros, geralmente contendo quatro átomos de cobre em cada monômero. São pertencentes à família das multicobre oxidases, que catalisam as reações de oxidação de vários compostos inorgânicos e aromáticos, geralmente fenólicos, acompanhados da redução de oxigênio a água (SOLOMON et al., 1992) e (XU, 1996). Como consequência da alta preferência para o oxigênio como substrato oxidante, estas enzimas mostram baixa especificidade para reduzir outros substratos. A reação de oxidação envolve a formação de radicais livres, possibilitando a transferência de um elétron para a Lacase.

O sítio ativo da Lac contém quatro átomos de cobre como cofatores. Estes cofatores são nomeados de acordo com a localização dentro do sítio ativo da enzima. O átomo de cobre localizado próximo a superfície externa da Lac, ou seja, a entrada do substrato orgânico, é chamado de sítio T1. O átomo de cobre localizado na outra extremidade, dentro da estrutura da Lac é chamado de sítio T2 e os dois átomos de cobre intermediários entre os átomos T1 e T2 são chamados de sítio T3, assim como apresentado na Figura 53.

Figura 53: Posição e nomenclatura dos átomos de cobre (esferas azuis) presentes no sítio ativo da Lac. Entre os átomos de cobre T1 e T3 é apresentado o tripeptídeo His-Cys-His conectando o átomo de cobre T1 com o aglomerado T2/T3.

Estudos da estrutura cristalina do complexo enzima/substrato revelaram que o substrato doador de elétrons se liga em uma pequena cavidade próxima do sítio de cobre T1. O sítio T1 é o aceptor de elétrons primário e é conectado ao agrupamento trinuclear T2/T3 por um tripeptídeo His-Cys-His. A distância entre o sítio T1 e o agrupamento T2/T3 é em torno de 12 a 14 Å. Essa distância é ideal para o tunelamento de elétrons entre o sítio T1 e o agrupamento T2/T3 (SHLEEV et al., 2005). É possível observar a estrutura da Lacase de *Trametes versicolor* na Figura 54, sendo os cofatores no sítio ativo representados pelas esferas azuis. O sítio T1 é o cobre mais afastado do agrupamento trinuclear, que possui o sítio T3, que são dois cobres igualmente alinhados ao sítio T1 e o sítio T2, que é o terceiro átomo de cobre.

Figura 54: Estrutura da Lacase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Lacase de *Trametes versicolor*, com o número de identificação 1GYC

A oxidação de substratos orgânicos ocorre por um mecanismo “ping-pong”. Os substratos são oxidados nas proximidades do sítio T1 e os elétrons são transferidos do sítio T1 para o agrupamento T2/T3 por tunelamento, onde o oxigênio molecular se liga e é reduzido para formar água, de modo a regenerar o sítio ativo enzimático (COLE et al., 1991).

As reações catalíticas que ocorrem no centro ativo da Lacase foram estudadas por técnicas espectroscópicas e cristalográficas de Raios-X e revelaram que, no sítio ativo da Lacase, elétrons adquiridos pelo sítio T1 do co-substrato oxidado são transferidos internamente por tunelamento através de cada ligação cisteína-histidina entre o sítio T1 e cada um dos sítios T2 e T3, onde o oxigênio se reduz para formar água (SOLOMON et al., 1996).

A estratégia em se utilizar a Lacase como enzima ativa para um biocátodo se deve no fato de se acoplar a primeira transferência de elétrons, que envolveria um substrato da enzima para o sítio T1, com a superfície eletródica de interesse. Neste caso, o eletrodo deverá estar fornecendo os elétrons para o sítio T1, que poderia naturalmente transferir estes elétrons para

o agrupamento T2/T3, que finalmente estariam transferindo os mesmos para o oxigênio molecular, formando água como produto final.

O primeiro procedimento de imobilização das Lacases foi utilizando o compósito de grafite com quitosana, que foi adicionado sobre o tecido de carbono e este adicionado a uma solução contendo as enzimas e glutaraldeído, tal como preparado anteriormente para a imobilização da Glicose Oxidase. No geral, com relação aos voltamogramas cíclicos dos materiais compósitos contendo Lacase não foi possível observar mudanças significativas, quanto a processos redox ocorrendo sobre a superfície do eletrodo. Este resultado já era esperado, visto que a Lacase já foi bem estudada em processos bioeletroquímicos e pouco foi encontrado quanto à transferência eletrônica direta entre seu sítio ativo e uma superfície eletródica (SANTOS et al., 2008).

Uma alternativa as reações bioeletrocatalíticas envolvendo as Lacases é a utilização de um mediador, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), chamado de ABTS, que apresenta a capacidade de se interagir com o átomo de cobre T1 presente no sítio ativo da Lacase e intercambiar elétrons com a superfície eletródica (PALMORE; KIM, 1999).

Experimentos foram realizados contendo Lacase e ABTS em solução, de forma a confirmar que o mecanismo de transferência mediada é possível para a Lacase utilizando o ABTS como mediador. Os voltamogramas cíclicos de um eletrodo de ouro em uma solução 100 mM de tampão acetato de sódio contendo 1 mg de Lacase e 0,15 mM de ABTS são apresentados na Figura 55.

Figura 55: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro inserido ao sistema de eletrodo rotatório. Solução de tampão acetato de sódio pH 4.5 aerada com 1 mg Lacase e 0,15 mM ABTS. Velocidade de varredura de 2 mV s^{-1} a diferentes velocidades de rotação.

A Figura 55 apresenta os resultados da atividade bioeletrocatalítica de redução de O_2 pela Lacase, utilizando o ABTS como mediador, de forma a promover o mecanismo de transferência mediada. A convecção forçada promovida pelo eletrodo rotatório ajuda a evidenciar o processo de redução do ABTS sobre a superfície do eletrodo de ouro. Não é observado um pico de oxidação referente ao ABTS sendo reoxidado diretamente a superfície do ouro, pelo fato de que este está sendo oxidado pelas enzimas Lacase presentes no meio da solução.

Quanto a magnitude de rotação do eletrodo, é observado que, quanto maior a velocidade de rotação do eletrodo, maior é a densidade de corrente obtida, pelo fato de que uma maior quantidade de ABTS que está sendo oxidado pelas enzimas na solução podem novamente se reduzir diretamente ao eletrodo. Para todos os valores de velocidade de rotação, é observada uma densidade de corrente limite iniciando-se a aproximadamente 300 mV vs ECS. Estes resultados são muito semelhantes aos resultados obtidos para o sistema GOx-FC. O sistema atinge uma situação de equilíbrio, onde a Lacase reduz o oxigênio molecular presente na solução, se regenera oxidando o ABTS, que é reduzido sob a superfície eletródica.

A quantidade de ABTS oxidado sob a superfície eletródica é muito grande na escala de tempo do experimento, devido á alta cinética enzimática, que o regenera quase que instantaneamente.

Conforme discutido na sessão 5.1.2, um bom mediador enzimático a ser utilizado em uma biocélula a combustível deve apresentar certas características físico-químicas de interesse. Particularmente, deve-se considerar a reversibilidade eletroquímica como ponto principal para as reações redox deste mediador, de forma que estas moléculas envolvidas apresentem um reciclo eletroquímico bem definido, evitando o consumo dos mesmos ou até mesmo a formação de produtos inertes eletroquimicamente, que possam prejudicar o ciclo reacional. Assim como apresentado anteriormente, a reversibilidade eletroquímica pode ser considerada levando em conta as equações (vi), (vii) e (viii), já apresentadas na sessão 5.1.2.

Voltamogramas cíclicos do ABTS nas condições experimentais utilizadas foram realizados a diferentes velocidades de varredura, na janela de potenciais onde são observados os picos de oxidação e de redução, assim como apresentado na Figura 56.

Figura 56: Voltametria cíclica do eletrodo de ouro, com a adição de 0.15 mM de ABTS na solução em tampão acetato de sódio pH 4.5, a diferentes velocidades de varredura.

A relação (iv) foi estudada, utilizando os valores de pico catódico e de pico anódico, obtidos pela Figura 56, com relação à raiz quadrada da velocidade de varredura e adicionando-os em um gráfico, assim como apresentado na Figura 57.

Figura 57: Relação entre a corrente de pico catódico e anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para as reações em estudo envolvendo o ABTS.

Pela Figura 57 é possível observar que a linearidade entre os valores de corrente de pico para ambos os valores de pico anódico e pico catódico, com relação a raiz quadrada da velocidade de varredura, assim como estabelecido pela equação de Randles-Sevcik, apresentada como equação (vi). Não só a linearidade dos pontos experimentais é observada, mas também que todas as curvas passam pela origem do gráfico, ponto (0,0), dando fortes evidências de que as reações redox envolvendo o ABTS apresentam certa reversibilidade eletroquímica.

Com relação as equações (vii) e (viii), foram obtidos os valores de potencial e corrente de pico, para análises mais detalhadas. Estes valores são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de corrente e potencial de pico, com relação a velocidade de varredura para as reações envolvendo o ABTS.

ν $mV s^{-1}$	E_{pa} mV	E_{pc} mV	ΔE_p mV	$\Delta E_p/2$ mV	I_{pa} $\mu A cm^{-2}$	I_{pc} $\mu A cm^{-2}$	$ I_{pa}/I_{pc} $
2	479	402	76	38	3.6	-1.1	3.0
20	480	400	79	39	10.1	-8.6	1.1
50	480	395	84	42	17.0	-14.5	1.1
100	482	391	90	45	23.4	-21.4	1.0
150	480	391	88	44	29.3	-27.9	1.0
300	482	391	90	45	43.8	-43.5	1.0
500	482	390	92	46	58.3	-58.4	0.99

Com relação aos dados apresentados pela Tabela 3, é possível observar que os valores de separação de pico (ΔE_p) para os processos de oxidação e de redução do ABTS, nas condições experimentais realizadas, são diferentes dos valores esperados para um sistema Nernstiano ($\sim 59 mV/n$), considerando que a reação envolve tanto 1 ou 2 elétrons. Apesar disto, a relação de valores de corrente de pico de oxidação e de redução é muito próxima da unidade para quase todos os valores de velocidade de varredura. Isto é um forte indício de que não há complicações cinéticas e nem mecanísticas envolvidas neste par de reações. Em compensação, os valores de separação de pico obtidos indicam que deve ter mais alguma etapa envolvida nesta reação e não considerada. Muitas reações eletroquímicas orgânicas têm como efeito adicional a inserção ou remoção de prótons, em concomitância com a transferência de elétrons. A consideração da concentração de prótons (pH) nesta solução poderia levar a variações deste tipo.

Sabendo que o ABTS se apresenta como um bom mediador para as reações envolvendo a Lacase, e que este apresenta fortes indícios de se comportar de forma reversível, eletroquimicamente, é interessante também conhecer um pouco os mecanismos reacionais envolvidos nos processos redox de interesse. Para esta etapa, foi decidido utilizar um eletrodo de carbono vítreo no lugar do eletrodo de ouro, como eletrodo de trabalho, pela possibilidade de se ampliar a faixa de potencial de análise. O carbono vítreo possui a vantagem frente ao ouro de adsorver menos facilmente o oxigênio na sua superfície, diminuindo a formação de

óxidos superficiais. Quando trabalhávamos com o ouro, a faixa de potencial de análise se restringia de -800 a 800 mV vs ECS. Isto se deve ao fato de que acima de 800 mV vs ECS, ocorre a formação de óxidos, basicamente Au_2O_3 fracamente adsorvido no ouro e abaixo de -800 mV vs ECS, ocorre formação e o desprendimento de H_2 . Já no caso do carbono vítreo, estes processos não ocorrem com considerável intensidade, observando-se apenas alguns processos característicos do material.

Utilizando o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, foi decidido avançar a faixa de potencial de análise, de forma a tentar conhecer um pouco os mecanismos envolvidos nas reações redox do ABTS. Podemos observar o aparecimento de um segundo par de picos, próximo de 900 mV vs ECS (Figura 68).

Figura 58: Voltamogramas cíclicos do ABTS em carbono vítreo, sob diferentes janelas de potencial. Experimentos em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M desaerado.

Este segundo par de picos está relacionado a um segundo processo de oxidação, envolvendo o ABTS já oxidado. A redução destas duas formas se dá em duas etapas, envolvendo um elétron cada uma. O mecanismo reacional do ABTS já é bastante conhecido, envolvendo processos de transferência eletrônica em cada um dos nitrogênios ligados á terminação etila, formando um composto tipo azo na forma mais oxidada, como apresentado na Figura 59. Os processos de interesse, pensando em sua aplicação para biocélulas a

combustível residem nas duas formas oxidadas, que podem se reduzir diretamente sobre um eletrodo (BRANCHI et al., 2005).

Figura 59: Processo redox envolvendo o ABTS, envolvendo um e dois elétrons, de acordo com Branchi e colaboradores.

5.2.2 Estudos bioeletroquímicos envolvendo a enzima Bilirrubina Oxidase

A enzima Bilirrubina Oxidase (BOx), também relatada pelo nome bilirrubina:oxigênio oxiredutase e pelo número de comissão EC 1.3.3.5, assim como a Lacase, é uma enzima da família das multi cobre oxidases, muitas vezes denominadas como enzimas oxidase de cobre azul (blue copper oxidase), que têm como substrato principal, moléculas de bilirrubina, que são oxidadas no sítio ativo da BOx, formando-se biliverdina. A BOx tem como co-substrato, o oxigênio molecular, que é ser reduzido a água, resultado desta reação biocatalítica. São glicoproteínas na forma de dímeros ou tetrâmeros, geralmente contendo quatro íons cobre em cada monômero.

Apesar de a BOx apresentar um sítio ativo praticamente idêntico ao da Lacase, alguns estudos recentes mostraram que, diferentemente da maioria das Lacases, a BOx apresenta a

capacidade de promover o mecanismo de transferência direta com um eletrodo (SANTOS, 2010). A explicação para isso ainda é um mistério e a dificuldade em encontrar explicações para tal se deve a dificuldade de se cristalizar a BOx, de forma a conhecer e estudar a sua estrutura. Muito recentemente, um grupo de pesquisa conseguiu cristalizar um par de estruturas da BOx (MIZUTANI et al., 2010). Esta estrutura de duas unidades da Bilirrubina Oxidase cristalizadas, encontrada no banco de dados do RCSB PDB é mostrada na Figura 60.

Figura 60: Estrutura da Bilirrubina Oxidase obtida do RCSB PDB. Estrutura criada pelo software PyMol para melhor visualização, tomando como base a estrutura da Bilirrubina Oxidase de *Myrothecium verrucaria*, com o número de identificação 3ABG.

Para a preparação de biocátodos utilizando a BOx, e tomando como vantagem a possibilidade de permitir o mecanismo de transferência direto, foi decidido utilizar o método de adsorção. Para a imobilização da BOx por adsorção, foi utilizado inicialmente o papel Toray como suporte eletródico. Devido a alto grau de hidrofobicidade característico deste material carbonáceo, o mesmo foi tratado com álcool isopropílico, de forma a aumentar a sua hidrofiliabilidade. Este tratamento se deve a total imersão do material a uma solução contendo álcool isopropílico concentrado por 10 segundos, seguido de secagem ao ambiente sobre um

papel de secagem por 1 hora. Este foi então adicionado a uma solução de 1 mL contendo 1 mg BOx e o mesmo foi deixado imerso nesta solução por 12 horas, sobre refrigeração, para que as enzimas se adsorvessem sobre a sua superfície. Após a imobilização das enzimas por adsorção, o mesmo foi adicionado a uma célula eletroquímica para a realização dos experimentos. Podemos observar os voltamogramas cíclicos da BOx adsorvida no papel Toray, nas condições experimentais na Figura 61.

Figura 61: Voltametria cíclica do papel Toray contendo 1 mg de BOx adsorvida. Solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerada e desaerada. Velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

É possível observar pela Figura 61 o aparecimento de uma corrente faradáica de redução, quando o bioeletrodo foi adicionado a uma solução contendo O_2 . Esta corrente é resultante da ação bioeletrocatalítica de reação de redução de oxigênio molecular catalisada pela BOx. Diferente dos experimentos utilizando a Lacase, onde não era possível observar nenhuma atividade bioeletrocatalítica de redução de O_2 , a não ser quando utilizado o mediador ABTS, a BOx apresenta a capacidade de se adsorver sobre o papel de carbono e promover estas reações, diretamente. Outros materiais carbonáceos, como o tecido de carbono e o carbono vítreo também apresentaram a mesma resposta. A BOx possibilita o mecanismo de transferência direta com o eletrodo.

Um potencial de circuito aberto de 520 mV vs ECS é determinado para o biocátodo contendo a BOX. Este valor de potencial está relacionado com o potencial de redução do átomo de cobre T1 adsorvido sobre a superfície eletródica. Cracknell e colaboradores discutiram sobre os diferentes ligantes rodeando o sítio T1 em diferentes multi-cobre oxidases (CRACKNELL et al., 2011). Para o caso da BOx, esta apresenta o sítio T1 com uma geometria de coordenação trigonal-bipiramidal. Os ligantes equatoriais (His-398, His-462 e Cis-457) diretamente coordenam ao átomo T1 e são altamente conservados entre as outras multicobre oxidases de outros diferentes microorganismos. O ligante axial Met-367 é fracamente coordenado ao T1. Os outros dois grupos axiais, Thr-397 e Asn-459, não aparentam estar diretamente coordenados ao átomo T1 (Figura 62). Estes resíduos axiais não são conservados em outros microorganismos.

Figura 62: Sítio T1 da BOx e os aminoácidos em suas redondezas.

FONTE: CRACKNELL, J. A.; MCNAMARA, T. P.; LOWE, E. D.; BLADFORD, C. F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: x-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. **Dalton Trans.** v. 40, 2011, p. 6668-6675.

Gray e colaboradores discutiram como o potencial padrão de redução do sítio T1 aparenta ser controlado pela geometria de resíduos de aminoácidos rodeando este sítio. Resíduos não-coordenados (tal como Phe) impõem coordenação trigonal-planar, favorecendo o sítio T1 reduzido (Cu^I) sobre o sítio T1 oxidado (Cu^{II}), o que resulta em um aumento do potencial redox do T1. De forma recíproca, resíduos com coordenação contendo átomos N, S

e O favorecem geometria trigonal-bipiramidal e diminuem o potencial redox de T1. Assim, multicobre oxidases com alto potencial tendem a ter resíduos Phe na posição axial inferior e tipicamente tem resíduos hidrofóbicos tais como Ile na posição axial superior (GRAY et al., 2000). O fato de a BOx conter os dois grupos axiais não coordenados, Thr e Asn, esta apresenta um potencial de redução bastante alto (~520 mV), este é apenas 70 mV diferença do potencial termodinâmico para a redução de oxigênio para água, 590 mV (calculado para pH 7.0 a 25°C e tomando-se o eletrodo de ECS como referencia).

Diferentemente das enzimas Lacase utilizadas num trabalho anterior, a BOx apresenta a capacidade de transferência eletrônica direta, porque o átomo de cobre T1 deve se localizar externamente a superfície da estrutura da enzima, de forma que é possível conectar este sítio a superfície eletródica. Não é necessário um mediador em solução para se aproveitar dos elétrons envolvendo a enzima e o oxigênio molecular. Além disso, a BOx apresenta a também a grande vantagem de não sofrer inibição com íons cloreto em solução, considerado um dos maiores problemas para a utilização da Lacase em biocátodos.

Experimentos de curvas de polarização mostrando o desempenho destes biocátodos são apresentados na Figura 63.

Figura 63: Resultado de curva de polarização do biocátodo contendo BOx. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7 aerada contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

É possível observar pela Figura 63 o aparecimento de uma corrente faradáica de redução (no gráfico, os valores de corrente são apresentados em valor absoluto), gerada pelas reações de redução de oxigênio bioeletrocatalisadas pela BOx. A partir desde biocátodo, foi possível obter uma densidade de corrente de $114 \mu\text{A cm}^{-2}$ em potencial 0 *vs* ECS. A densidade de corrente obtida é cerca de três vezes menor do que a mesma obtida para o bioânodo, apesar de a mesma quantidade de enzima ser utilizada. Isto pode estar relacionado com a imobilização da GDh por quitosana, que apresenta um ambiente químico mais agradável para as enzimas, em comparação com a BOx simplesmente adsorvida sobre a superfície eletródica. Além disto, a falta de uma metodologia para determinar a quantidade real de enzimas adsorvidas em ambos os casos, adsorção da BOx e imobilização da GDh utilizando a quitosana, dificulta uma comparação mais bem fundamentada. Não há garantia, por exemplo, de que todas as BOx adicionadas a solução se adsorveram sobre a superfície do eletrodo. Da mesma forma, não é possível garantir que todas as GDh adicionadas a quitosana estão disponíveis para reagir com a glicose e com o seu cofator NAD. Apesar disto, a BOx apresenta a capacidade de promover o mecanismo de transferência direta, o que é bastante desejável para aplicações em biocélulas a combustível, visto que o sítio T1 da BOx deve estar intimamente localizado próximo a superfície eletródica. Não é de interesse, do ponto de vista de aplicação destas biocélulas a combustível, de se utilizar um mediador solúvel na solução, pois este, apesar de estar sendo regenerado eletroquimicamente, pode ser perdido, se utilizado em condições de fluxo de combustível, por exemplo. A tentativa de imobilização de BOx em quitosana e sem a utilização de mediadores eletrônicos, não apresentou nenhuma resposta faradáica, tal como é apresentado nas Figuras 61 e 63, apresentadas anteriormente. Isto é mais uma prova de que a BOx deve estar intimamente ligada a superfície do eletrodo. A maior vantagem do método de adsorção é o de que as enzimas são adicionadas ao suporte em condições de estabilidade e de tempo para que as enzimas se adsorvam na melhor ideal.

5.3 Biocélula a combustível

Desenvolvido um par de bioeletrodos, biocátodo e bioânodo, considerando reações bioeletrocatalíticas de redução do oxigênio molecular e de oxidação da glicose,

respectivamente, foi possível construir a primeira biocélula a combustível com os eletrodos de papel Toray utilizando as metodologias desenvolvidas por este trabalho. O biocátodo consistiu de BOx adsorvida sobre a superfície do papel Toray e o bioânodo consistiu de GDh imobilizada em quitosana e adicionada sobre a superfície do papel Toray, previamente modificado com um filme fino de PVMet.

Existem muitas vantagens que este par de enzimas, GDh e BOx, trazem para uma aplicação em biocélulas a combustível. A BOx é uma enzima que apresenta a característica mais desejável para um bioeletrodo, pela capacidade de promover o mecanismo de transferência direta. Esta capacidade não é compartilhada pela GDh, onde esta necessita do cofator NADH, solúvel em solução. Apesar disto, o NADH só é oxidado sobre a superfície eletródica quando se têm o mediador verde de metileno presente. A polimerização do verde de metileno sobre a superfície do bioânodo leva uma condição onde se tem o NADH se oxidando apenas sobre o bioânodo, enquanto que apenas a BOx estará se reduzindo sobre a superfície do biocátodo. Não é esperado nenhum problema quanto a crossover de combustível, oxidante ou mediador, pela especificidade da BOx adsorvida no biocátodo e a especificidade da oxidação do NADH no filme de verde de metileno presente no bioânodo. Isso não pode ser dito para o sistema composto GOx com os mediadores estudados neste trabalho. Não há especificidade para a oxidação dos ferrocenos ou do VBc, o que representariam desvantagens em uma biocélula a combustível. Estes mediadores poderiam estar se oxidando no biocátodo, resultando em um potencial de eletrodo misto e prejudicando o desempenho deste bioeletrodo e por consequência, o desempenho da biocélula a combustível.

Os dois bioeletrodos contendo BOx e GDh foram preparados e adicionados a uma mesma célula eletroquímica, contendo o eletrólito areado e nas condições otimizadas de concentração de glicose e de concentração de NAD para o bioânodo. Para os experimentos de biocélula a combustível utilizando o par de bioeletrodos, o biocátodo foi ligado pela saída do potenciostato de ligação do eletrodo de trabalho e, enquanto que o bioânodo foi ligado pela saída do potenciostato de ligação do contra-eletrodo em curto circuito com ligação do eletrodo de referência.

Os resultados dos potenciais de circuito aberto obtidos por cada um dos pares de bioeletrodos e da biocélula a combustível são apresentados na Figura 64.

Figura 64: Medidas de potencial de circuito aberto (OCV) para o biocátodo, bioânodo e diferença de potencial (ddp) para a biocélula a combustível. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerado contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

É possível observar pela Figura 64 que o bioânodo apresentou um potencial de circuito aberto de cerca de -110 mV vs ECS, que representa o mesmo valor de potencial de circuito aberto do que o obtido para o monômero de VMet. Isto se deve ao fato de que nem a glicose e nem o NAD^+ são reativos ao suporte nas condições experimentais utilizadas. O VMet é a única molécula presente que está reagindo na superfície anódica. Já para o biocátodo, um potencial de circuito aberto de 520 mV vs ECS é obtido. Este valor de potencial está relacionado com o potencial de redução do átomo de cobre T1 adsorvido sobre a superfície eletródica, assim como discutido anteriormente.

Outra informação importante que pode ser obtida pela Figura 64 é a de que o potencial de circuito aberto do biocátodos atinge um valor estacionário quase que instantaneamente, e se mantém durante todo o período do experimento. Isto é resultado do longo tempo de adsorção, onde as enzimas BOx tiveram tempo de se adsorver de forma favorável sobre a superfície do eletrodo. Uma quantidade considerável de enzimas que se adsorveu com o átomo de cobre T1 em contato com o eletrodo se mantém desta forma, mesmo antes do início do experimento. Isso não é observado para o mesmo experimento realizado com o bioânodo,

onde o potencial de circuito aberto leva certo tempo para atingir um valor estacionário. Isto se deve a complexidade das reações envolvidas neste bioânodo, que se leva em conta desde a oxidação da glicose e redução do NAD^+ , dentro do sítio ativo da GDh, seguido da reoxidação do NAD^+ sobre a superfície do Verde de Metileno, eletrodepositado na superfície do eletrodo. Além disto, o transporte de massa de todos estes componentes, atravessando o filme de quitosana para o eletrodo, também é desconhecido.

Finalmente os dois bioeletrodos foram estudados por curvas de polarização, de forma a obter seu desempenho em termos de geração de energia elétrica, de acordo com as reações estudadas. As curvas de polarização de cada um dos bioeletrodos e da biocélula a combustível contendo este par de eletrodos foram obtidos a partir de saltos de potencial, onde valores de potencial foram aplicados desde o potencial de circuito aberto medido até um potencial de referência. Cada salto consistiu de uma batelada de 1 hora de experimento e o valor de corrente estacionária foi considerada como a média dos últimos 100 pontos obtidos para o experimento. Os resultados das curvas de polarização para os bioeletrodos e a biocélula a combustível são apresentados na Figura 65.

Figura 65: Curvas de polarização para o biocátodo, bioânodo e para a biocélula a combustível. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerado contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

Pode-se observar pela curva de polarização da biocélula a combustível (curva azul), que o maior limitante em termos de corrente é o biocátodo, por apresentar uma densidade de corrente relativamente baixa, em comparação ao bioânodo. Isto se deve principalmente ao fato de que as condições experimentais foram ótimas para o bioânodo e não para o biocátodo (concentrações de glicose e NAD^+). Além disso, a baixa difusividade do oxigênio em solução implica em uma menor concentração do oxidante em solução, resultando em uma limitação por transferência de massa, do oxigênio presente solubilizado no meio para a superfície do biocátodo. Considerando a forma da curva de polarização do biocátodo (curva vermelha), podemos observar que existe uma limitação de densidade de corrente em potenciais em torno de 350 mV. A densidade de corrente faradáica muda muito pouco, com a diminuição do potencial. Isso é uma forte indicação de que a reação bioeletrocatalítica de redução do oxigênio molecular está sendo limitada pela baixa concentração de oxigênio em solução que está se difundindo para o biocatalisador.

Já no caso do bioânodo, apesar deste apresentar uma alta densidade de corrente faradáica de oxidação, o potencial da oxidação é bastante baixo. O potencial termodinâmico da oxidação da glicose é de -0.630 mV (valor calculado para pH 7.0 a 25°C e tomando-se o eletrodo de ECS como referência). Considerando o potencial de circuito aberto obtido para o bioânodo de -110 mV, podemos concluir que há uma perda de potencial de 520 mV devido a alta energia de ativação necessária para a oxidação da glicose.

Uma diferença de potencial teórico esperado para uma biocélula a combustível utilizando a oxidação da glicose e redução do oxigênio molecular seria de 1220 mV, mas foi obtido apenas 630 mV. Metade do desempenho da biocélula a combustível é perdida, em termos de potencial. Isto se deve a complexidade de reações necessárias para oxidar a glicose. Esta necessita tanto da ação de um cofator (o NAD^+ , neste caso) e de um mediador, o VMet. Cada passo adicional na cascata de reações implica em uma perda, em termos de potencial. Infelizmente a lista de mediadores capazes de oxidar os cofatores FAD e NAD^+ ainda é muito escassa.

A partir da curva de polarização obtida para a biocélula a combustível, obtivemos a curva de potência referente a este sistema eletroquímico. A curva de potência para a biocélula a combustível em solução é apresentada na Figura 66.

Figura 66: Curvas de potência para a biocélula a combustível em solução. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 aerado contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

O desempenho apresentado pela biocélula a combustível em termos de potência apresenta um máximo de geração de potência em torno de $55 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$ (lembrando que foi utilizada a área geométrica para o cálculo da densidade de corrente) a uma diferença de potencial de 300 mV.

5.4 Biocélula a combustível em papel

A etapa seguinte deste projeto foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Plamen Atanassov, professor do Departamento de Engenharia Química e Nuclear, da *University of New Mexico*, EUA. Esta etapa se tratou em trabalhar com todo o conhecimento adquirido até o momento para o desenvolvimento de biocátodos e bioânodos e trabalhar em sua adaptação para um sistema baseado em microfluídica em papel. O objetivo maior desta fase do projeto foi o de se desenvolver biocélulas a combustível em papel para a geração de energia elétrica para sistemas eletrônicos pequenos, portáteis e leves.

O desenvolvimento de bioeletrodos utilizando o material de papel de carbono Toray como substrato é interessante, porque este apresenta certas características físicas, tais como leveza, flexibilidade e estabilidade mecânica, que fazem destes bioeletrodos ideais para aplicações em dispositivos em papel. Além disto, quaisquer técnicas industriais de manufatura e produção em massa de outros dispositivos em papel podem ser utilizadas para trabalhar também com estes materiais suporte, que foram empregadas como suporte condutor para os bioeletrodos.

A Figura 67 mostra o perfil do fluxo de solução para o sistema se deseja desenvolver.

Figura 67: Fotos demonstrando o fluxo de uma solução contendo verde de metileno concentrado (utilizado aqui como corante) sobre a célula em papel.

Uma solução contendo o eletrólito, o combustível e possivelmente o oxidante pode ser adicionada na parte inferior da célula. Graças a curta distância entre as fibras do papel, esta solução pode espontaneamente fluir entre as mesmas, devido à ação capilar. As forças de adesão entre as moléculas da água e a superfície do papel são maiores do que as forças de coesão da própria água e o ângulo de contato resultante entre a água e o papel é próximo de 0° , resultando em um fluxo ascendente. A solução, portanto, flui dentro das fibras do papel até atravessar uma região onde ambos biocátodo e bioânodo estarão presentes, contendo as enzimas que estarão reagindo com as substâncias presentes nesta solução. Há a formação de um filme fino de solução entre o papel do fluxo (o qual estaremos referindo daqui em diante como “bomba estática”) e cada um dos bioeletrodos. Ao topo da célula encontra-se uma

região do papel de grande área superficial, aberta ao ambiente, de forma que a solução fluindo no papel pode ser removida da célula por evaporação. Ao final de certo tempo, o sistema atinge uma condição de equilíbrio, onde se tem solução deixando a célula por evaporação e a resposta a isto é a movimentação de mais solução por capilaridade. O resultado deste comportamento é o fluxo constante de eletrólito, combustível e oxidante, circulando na bomba estática e para os bioeletrodos ali presentes. Para as condições experimentais utilizadas (umidade 13% e temperatura de 24.5 ± 0.2 °C), a vazão no estado quase-estacionário (situação onde o equilíbrio entre a evaporação da solução e a ação capilar é bem definido), em uma célula em papel retangular, cortada em 2,6 cm de comprimento por 10,0 cm de altura, foi constante e no valor de $470 \mu\text{m min}^{-1}$.

O desenho da estrutura da célula eletroquímica em papel na forma de um cogumelo bi-dimensional se deve a trabalhos desenvolvidos por Mendez e colaboradores, onde estes mostraram que o desenho neste formato permite uma condição de fluxo de solução por capilaridade constante na região retangular, onde se encontram os bioeletrodos, ao contrário do que aconteceria se o desenho não apresentasse esta estrutura semicircular ao topo (MENDEZ et al., 2010). Neste caso, a vazão da solução estaria decrescendo com a raiz quadrada do tempo, assim como apresentado pela equação de Lucas-Washburn, para o fluxo de fluidos em um meio poroso (WASHBURN, 1921).

5.4.1 Biocátodo em papel no formato de cartão

A primeira biocélula a combustível em papel foi desenvolvida utilizando ambos biocátodos e bioânodo cortados no formato de um cartão. Este procedimento foi realizado com o intuito de se desenvolver uma biocélula a combustível que apresentasse certas propriedades físicas de um cartão de crédito bancário, como o tamanho, peso, flexibilidade e resistência mecânica, de forma que esta biocélula a combustível pudesse ser utilizada como um sistema de geração de energia portátil, sendo de fácil transporte e de fácil acessibilidade.

Na Figura 68 é apresentado o esquema das partes que compõem os biocátodos no formato de cartão e uma foto do sistema depois de prensado.

Figura 68: Esquema e foto do biocátodo em papel no formato de cartão.

A Figura 68 apresenta o esquema utilizado para a preparação dos primeiros biocátodos em papel. Como se pode ver, o bioeletrodo consiste de três camadas, todas prensadas de forma a mantê-las unidas, resultando no sistema apresentado na foto.

A primeira camada é feita de papel de carbono Toray. Este foi cortada utilizando um cartão de crédito como molde para dar a sua forma. O material serve basicamente para dar a estrutura física do corpo da biocélula a combustível, além de servir como coletor de corrente, que será ligado externamente. Uma janela de 1”x1” foi cortada no meio do papel de carbono Toray, que será utilizado para adicionar a camada biocatalítica contendo as enzimas BOx e permitirá que o oxigênio presente no ar se difunda para camada biocatalítica ali presente.

A segunda camada consiste de 100 mg de carbono Vulcan, teflonizado em 35% w/w (XC35).

A terceira camada, consiste de um pedaço de papel de nitrocelulose cortado em 1”x1”, mesmo tamanho da janela cortada no papel de carbono Toray. Uma mistura contendo 15 mg de BOx em 3 mL de uma solução 0.1 M tampão de fosfato de sódio pH 7.0 com 250 mg de carbono Vulcan sem teflonização (XC72R) foi adicionado sobre este pedaço de papel de nitrocelulose e o mesmo foi adicionado a base do bioeletrodo em cartão, tendo uma área geométrica de 8,41 cm². A segunda camada foi adicionada sobre a terceira e as três camadas foram prensadas a 1000 psi, por 5 segundos, utilizando uma prensa hidráulica. Diferente do carbono Vulcan não teflonizado, o XC35 apresenta uma consistência sólida após a exerceção da pressão mecânica, formando um filme fino e mecanicamente estável sobre a camada catalítica.

A posição das camadas foi escolhida de forma que a camada contendo o material hidrofílico e as enzimas BOx, chamada de camada biocatalítica hidrofílica (Hydrophilic Biocatalytic Layer – HBL), estivesse em contato com a bomba estática, de forma com que estas enzimas pudessem receber a solução tampão fluindo no papel, enquanto que o material hidrofóbico (o material XC35), estivesse em contato com o ar, de forma que o oxigênio ali presente pudesse penetrar na estrutura do material e reagir com as enzimas ali adsorvidas.

Para fazer as conexões com o circuito externo, foi utilizada uma malha de Níquel, que foi mantida em contato com o coletor de corrente. Uma malha de Pt foi adicionada as costas da bomba estática e foi utilizado como contra-eletrodo, para os experimentos de meia célula. Todo o sistema foi mantido unido por uma fita adesiva transparente. A solução contendo o eletrólito foi adicionada a uma placa de Petri, localizada na parte inferior da célula e a célula eletroquímica em papel foi adicionada sobre a placa da Petri, de forma a permitir que a solução pudesse fluir entre as fibras do papel, por capilaridade. O eletrodo de referência foi adicionado a solução, dentro da placa de Petri e todos os experimentos de medida começaram assim que se observou que a solução já tivesse passado pela região contendo os eletrodos. Resultados de potencial de circuito aberto e curvas de polarização para este biocátodos em papel no formato de cartão são apresentados nas Figuras 69 e 70.

Figura 69: Potenciais de circuito aberto do biocátodos no formato de cartão com e sem BOx.

Figura 70: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel, no formato de cartão. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.

É possível observar pela Figura 69 que o potencial de circuito aberto dos biocátodos em papel, em formato de cartão, apresenta valores na ordem de 510 mV vs Ag/AgCl/Cl⁻_(sat), quando preparados com a enzima BOf. Assim como apresentado anteriormente, este valor representa o potencial do átomo de cobre T1, presente no sítio ativo da BOf, dando indícios de que as enzimas adicionadas ao material estão em contato com o suporte, de forma que o mecanismo de transferência direta é possível.

As curvas de polarização apresentadas na Figura 70 representam o desempenho deste biocátodo funcionando com o oxigênio presente no ar. É possível observar este desempenho foi consideravelmente baixo, em comparação com os biocátodos preparados em papel Toray, mas utilizado imerso em solução. Mesmo que utilizada uma grande quantidade de BOf, a corrente obtida para este tipo de biocátodo foi bastante baixa, apresentando valores de densidade de corrente na ordem de $67 \pm 13 \mu\text{A cm}^{-2}$. As barras de erro mostram uma baixa reprodutibilidade quanto aos resultados obtidos, resultado de toda preparação do biocátodos, que era majoritariamente manual.

Este tipo de biocátodo foi utilizado em conjunto com um bioânodo utilizando a enzima álcool desidrogenase, desenvolvido por um trabalho em conjunto com a pesquisadora Claudia W. Narváez Villarrubia, onde foi possível ligar um relógio de parede, utilizando etanol como

combustível, para a prova do conceito desta tecnologia (ATANASSOV, 2011). É possível observar pela Figura 71 o conjunto de pares de bioeletrodos conectados a bomba estática. Na foto, todos os pares de bioeletrodos estão conectados em paralelo e funcionando como uma biobateria e não uma biocélula a combustível. O combustível utilizado foi etanol, misturado a uma solução de 0,1 M tampão fosfato de sódio pH 7,0.

Figura 71: Foto da biobateria funcionando com seis pares de bioeletrodos no formato de cartão e gerando energia a partir da oxidação de etanol e redução de oxigênio presente no ar, para o funcionamento de um relógio, como demonstração.

O desenvolvimento deste tipo de bioeletrodo representou pouco, do ponto de vista de desenvolvimento científico. O desempenho e a reprodutibilidade dos bioeletrodos eram muito baixos. Foi necessário um grande número de pares de eletrodo para fazer funcionar um dispositivo eletrônico simples e de baixa exigência, o que é indesejável, quando se pensa em uma aplicação prática e sua utilização como um dispositivo de geração de energia portátil. Apesar disto, a tecnologia foi demonstrada e apresentada pela primeira vez para as agências financiadoras do projeto e, logo em seguida, para a comunidade científica, no 62nd Meeting of

the International Society of Electrochemistry (ISE), em 2011, na cidade de Niigata, Japão (ATANASSOV, 2011).

5.4.2 Biocátodo em papel - XC35/HBL

Grande parte da dificuldade em conseguir uma boa reprodutibilidade a estes bioeletodos do tipo cartão se deve ao resultado da manufatura manual para a preparação dos mesmos. O tamanho da janela para adicionar a camada catalítica em contato com o ambiente externo era muito grande, o que dificultava a prensagem dos pós de carbono e, muitas vezes, levava a quebra da estrutura da camada catalítica e perda do material, quando não prensado corretamente. A atitude tomada para resolver estes problemas foi a de diminuir o tamanho do bioeletrodo (e por consequência, diminuir a camada biocatalítica) e automatizar o maior número de passos possíveis para a manufatura do bioeletrodo. Um novo desenho para o suporte destes bioeletrodos foi desenvolvido, assim tal como o apresentado na Figura 72.

Figura 72: Medidas de comprimento em cm e de área em cm² do suporte de papel Toray utilizado para preparação dos bioeletrodos em papel

A Figura 72 traz o desenho do suporte dos bioeletrodos utilizados para os experimentos seguintes. Este desenho foi utilizado em uma maquina de corte automatizada (Graphtec FC7000-75, Western Graphtec Inc., Irvine, CA), que foi programada para cortar o

papel Toray nas dimensões ali apresentadas. O suporte contém a cabeça circular, que foi desenhada no tamanho que pudesse se encaixar a um molde, onde iriam ser adicionadas e prensadas as camadas bioeletrocatalíticas, e esta é a região que ficava em contato com o filme de solução no papel; e a perna, que servia de contato elétrico com o circuito externo. Os buracos na cabeça circular foram utilizados para dar estabilidade ao filme em pó ali prensado, além de permitir que o oxigênio presente no ar entrasse no biocátodo. Estes não foram necessários para o bioânodo.

Os primeiros modelos de bioeletrodos, utilizando o novo desenho apresentado na Figura 72, foram de mesma configuração que os biocátodos desenvolvidos no formato de cartão, consistindo de as mesmas camadas, prensadas no suporte de papel de carbono Toray: 100 mg de XC35 formando a camada hidrofóbica e o HBL formando a camada hidrofílica, sendo esta composta de 15 mg de BOx, misturada em 3 mL de uma solução 0.1 M tampão de fosfato de sódio pH 7.0 com 30 mg de carbono Vulcan sem teflonização (XC72R) e adicionada sobre este um pedaço de papel de nitrocelulose de mesma área geométrica que a cabeça do suporte de papel de carbono Toray. Todas as camadas foram prensadas sobre o suporte utilizando uma prensa hidráulica a 1000 psi. O esquema do biocátodos XC35/HBL é apresentado na Figura 73.

Figura 73: Esquema dos biocátodos em papel XC35/HBL.

A Figura 74 apresenta uma imagem de microscopia eletrônica de varredura, de um corte transversal mostrando a região de contato entre as camadas prensadas e o suporte de papel de carbono Toray.

Figura 74: Imagem de microscopia de um corte transversal do biocátodo em papel na configuração XC35/HBL

Pela imagem de microscopia eletrônica, é possível observar que todas as camadas prensadas para dar a forma do biocátodos em papel são claramente bem definidas. Pode ser ver, por exemplo, a estrutura granular dos pós de carbono utilizados para dar estrutura a camada hidrofílica e a camada hidrofóbica, em comparação a estrutura fibrosa do papel de carbono Toray. É possível observar também a fina camada da fita adesiva, utilizada para manter toda a estrutura unida a célula eletroquímica em papel, recobrindo ambos os lados da célula. A região da bomba estática não está muito bem definida na imagem, pelo fato de que o papel utilizado para permitir o fluxo de solução era sensível a energia de radiação utilizada pelo microscópio. Este material estava queimando durante a visualização do material.

As curvas de polarização para o desempenho do biocátodo em papel na configuração XC35/HBL são apresentadas na Figura 75. A área geométrica do disco contendo a HBL era de 2.20 cm^2 .

Figura 75: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel XC35/HBL. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.

É possível observar pela Figura 75 que o desempenho dos biocátodos foi muito melhor com essa nova configuração de tamanho de eletrodo, em comparação aos valores de densidade de corrente obtidos para os biocátodos em papel no formato de cartão. Valores de densidade de corrente de $148 \pm 2 \mu\text{A cm}^{-2}$ a $0 \text{ mV vs Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$ foram obtidos. Isso pode estar relacionado a uma melhor utilização da área eletroquímica disponível pelo material. Um excesso de carbono estava sendo utilizada para dar forma à camada catalítica dos biocátodos em cartão e esta área inativa deveria estar sendo considerada no cálculo de densidade de corrente.

Pelos valores de erro obtidos, é de se observar uma melhora na reprodutibilidade dos resultados. Isso se deve a facilidade de preparação da camada biocatalítica sobre o suporte de papel de carbono Toray. O processo de mecanização do corte do suporte possibilitava a utilização de suportes eletródicos de mesmo tamanho, de forma reprodutível, e a utilização

dos buracos no suporte permitiram uma melhor acomodação do filme de carbono prensado, evitando problemas como mau contato entre o filme de carbono prensado e o suporte de papel de carbono Toray, ou até mesmo, perda da estrutura do filme de carbono, resultado de uma pressão mal sucedida.

5.4.3 Biocátodo em papel - XC35

O modelo seguinte de biocátodos em papel foi desenvolvido baseado nas experiências prévias já realizadas com a imobilização da BOx por adsorção. Como mostrado anteriormente, o procedimento de adicionar um material eletródico hidrofílico, por imersão, em uma solução contendo as enzimas, e deixado por tempo suficiente para que estas enzimas se adsorvessem de forma favorável sobre a superfície eletródica, se mostrou bastante eficiente para a preparação dos primeiros biocátodos contendo BOx.

De forma a promover a imobilização das enzimas BOx por adsorção, o suporte de papel de carbono Toray foi cortado no tamanho e escala apresentados anteriormente, na Figura 82. 100 mg de XC35 foram adicionados sobre a região da cabeça do suporte e o material foi prensado a 1000 psi, de forma a formar o filme de carbono, onde serão adsorvidas as enzimas., assim como esquematizado na Figura 74. O filme de XC35 formado foi tratado por 100 μ L de álcool isopropílico, seguido de secagem ao ambiente sobre um papel de secagem por 1 hora. Depois deste processo de hidrofílicização, este material foi adicionado por imersão a uma solução de 3 mL contendo 15 mg de BOx, sendo deixado em contato por 12 horas sobre refrigeração, de forma a permitir que as enzimas se adsorvessem sobre a superfície do material hidrofílico. O esquema dos biocátodos em papel preparados por adsorção é apresentado na Figura 76.

Figura 76: Esquema dos biocátodos em papel XC35.

Os resultados em triplicata das curvas de polarização realizadas para os biocátodos na configuração denominada “XC53” são apresentados na Figura 77.

Figura 77: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.

Da mesma forma que o biocátodo em papel na configuração XC35/HBL, esta nova configuração apresentou grande reprodutibilidade com os resultados, como pode ser observado pelo tamanho das barras de erro, resultado da triplicata dos experimentos.

Resultados de densidade de corrente na ordem de $201 \pm 11 \mu\text{A cm}^{-2}$ a $0 \text{ mV vs Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$. A densidade de corrente foi consideravelmente maior, mesmo quando utilizada a mesma quantidade de enzima. Isso se deve, como discutido anteriormente, ao processo de adsorção enzimática, que permite com que as enzimas BOx se adsorvam de forma ideal sobre a superfície eletródica. Isso não acontece durante a preparação da HBL, situação a qual se tem simplesmente a mistura das enzimas com o carbono Vulcan e a adição ao suporte pela pressão mecânica. A região hidrofílica não fica bem definida para esta configuração, sendo esta a interface de contato entre as enzimas adsorvidas no carbono e o filme de solução fluindo pela bomba estática. A simples mistura das enzimas com o pó de carbono pode estar levando a uma situação onde a camada biocatalítica está encharcada com a solução eletrólito, prejudicando o transporte de massa e a difusividade do oxigênio, tal como no caso dos bioeletrodos na configuração XC35/HBL. Este efeito não se manifesta quando utilizado o método de a simples adsorção das enzimas sobre o suporte eletródico.

Considerando o desenvolvimento destes biocátodos em papel em um estágio consideravelmente bom, foram realizados experimentos de estabilidade temporal em termos de potencial de circuito aberto e de corrente gerada por este biocátodo. Os resultados destes experimentos são apresentados nas Figuras 78 e 79.

Figura 78: Experimento de estabilidade temporal do potencial de circuito aberto para o biocátodo em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.

É possível observar pela Figura 78 que o potencial de circuito aberto obtido para o biocátodo em papel na configuração XC35 leva certo tempo para atingir uma situação de estabilidade no valor de 510 mV vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$, potencial de redução do átomo de cobre T1, presente no sítio ativo da BOx, em comparação com o desenho de biocátodo em solução, onde este valor era atingido instantaneamente. Isso está relacionado as propriedades químicas do eletrólito resultantes do comportamento do fluxo de solução na bomba estática. As moléculas de água presente no eletrólito apresentam menos interação com a composição química da superfície do papel de filtro em comparação com as moléculas do sal de fosfato, que dão as condições de pH necessárias para o funcionamento das enzimas. Este efeito se assemelha ao efeito cromatográfico, onde há uma resistência para a mobilidade destes sais no papel. O filme fino de solução presente na interface biocátodo-bomba estática leva certo tempo para atingir uma situação onde se têm uma concentração de sais suficiente, de tal forma que o ambiente químico necessário para a atividade destas enzimas, em termos de pH e de força iônica, fica bem estabelecido para a atividade biocatalítica. Além disto, é possível observar que, depois de atingida esta condição de equilíbrio, o potencial de circuito aberto se mantém no mesmo valor de potencial de redução do sítio T1, indicando que as enzimas se mantêm adsorvidas sobre o eletrodo, mesmo sobre o stress causado por esta diferença de concentração de sais.

A Figura 79 apresenta os resultados obtidos para a estabilidade do biocátodo em papel na configuração XC35, em termos de geração de corrente.

Figura 79: Experimento de estabilidade temporal de corrente para o biocátodo em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.

Da mesma forma que com o experimento de estabilidade frente ao potencial de circuito aberto, o mesmo é observado com relação a capacidade de geração de corrente. O biocátodo leva certo tempo para atingir uma situação de desempenho estacionário, pelo fato de que a condição ideal, em termos de pH e de força iônica para o funcionamento das enzimas é estabelecida depois de certo tempo do experimento.

Depois de atingida a condição de estabilidade, este biocátodo consegue manter este comportamento por pelo menos o tempo de duração do experimento. Isto indica que o sítio T2/T3, responsável pela ligação da molécula de oxigênio e a resultante redução biocatalisada a água, também se mantém em bom funcionamento durante o tempo do experimento. Os elétrons transportados do eletrodo até o sítio T1, em contato direto com o eletrodo, são também transportadas para o aglomerado T2/T3, terminando com a regeneração deste sítio ativo pela redução do oxigênio molecular. Esta é mais uma prova de que a imobilização das enzimas por adsorção é um processo muito pouco agressivo com a estrutura da BOx, tanto na região externa da enzima, onde se localiza o sítio T1, quanto na região interna da enzima, onde se localiza o aglomerado T2/T3.

5.4.4 Biocátodo em papel - XC35/HcBP

A última configuração de biocátodos em papel desenvolvida por este trabalho se baseou em utilizar um material desenvolvido e comercializado por uma empresa americana chamada Buckeye Composites Inc., responsável por trabalhar com materiais a base de nanotubos de carbono, para aplicações industriais. O material, chamado comercialmente de Papel “Bucky” de alta condutividade (High conductivity Buckypaper – HcBP), é caracterizado como sendo uma fina membrana de um material tipo papel, formada por nanotubos de carbono. O material pode ser composto por nanotubos em camada simples, multi-camadas, nanofibras ou plaquetas de grafeno em nanoescala. Segundo a empresa, o material HcBP é o material de maior condutividade desenvolvido e é composto por uma blenda de nanotubos de carbono de camada simples, nanotubos de carbono em multicamadas e nanoplaquetas de materiais de grafeno “Angstron”. A combinação destes três materiais

apresenta os maiores valores de condutividade, em comparação com qualquer outra combinação entre os mesmos.

Pouca informação pôde ser obtida quanto ao procedimento de fabricação e a real composição destes materiais, pelo fato de que, a comercialização e disponibilidade destes materiais ainda eram bastante restritas, pelo menos durante o período de realização desta pesquisa.

Imagens de microscopia do material HcBP, em comparação com o papel de carbono Toray, em mesma magnitude, são apresentados na Figura 80.

Figura 80: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de (A) uma fibra única do papel Toray e (B) o material HcBP, em mesma magnitude de amplificação.

A Figura 80 apresenta uma comparação direta do tamanho da microestrutura do HcBP, com o papel de carbono Toray. A distância de 5 μm foi utilizada para comparar o tamanho de uma fibra única do papel de carbono Toray com a mesma distância para o HcBP. A estrutura fibrosa em nanoescala, apresentada pelas fibras de nanotubos de carbono, indica que este material deve apresentar uma área eletroquimicamente disponível muito grande, o que é uma característica ideal um material suporte.

A BOx é uma enzima que apresenta uma estrutura quaternária tridimensional, na forma geométrica de um elipsóide, com um diâmetro de eixo maior de aproximadamente 6

nm e um diâmetro de eixo menor de aproximadamente 4 nm, apresentando um volume pequeno suficiente para permitir que estas enzimas possam penetrar nas regiões entre as fibras do HcBP, o que permite não só uma melhor acomodação para as enzimas adsorvidas, mas também um ambiente de condução tridimensional com o suporte eletródico, de forma que a probabilidade de se ter o sítio T1 da BOx em contato com alguma das fibras do HcBP é muito maior do que a probabilidade de ocorrer o mesmo entre a BOx e a fibra do papel de carbono Toray, que apresenta uma superfície plana, bi-dimensional, considerando o tamanho das enzimas. As fibras do HcBP estariam, portanto, funcionando como nanofios, fazendo a condução eletrônica entre o sítio T1 e o eletrodo.

Para a preparação dos biocátodos em papel utilizando o HcBP, este foi cortado no mesmo tamanho das camadas utilizadas, tal como apresentado pela Figura 72 e 100 mg de XC35 foi adicionado sobre a região da cabeça do suporte de papel de carbono Toray, juntamente com o papel de carbono Buckeye (HcBP) sobre o mesmo. Toda a estrutura foi prensada, utilizando uma prensa hidráulica a 1000 psi. Após a preparação do suporte de carbono, o filme de HcBP foi tratado por 100 μ L de álcool isopropílico, seguido de secagem ao ambiente sobre um papel de secagem por 1 hora. Seguido deste processo de hidrofilição, este material foi adicionado por imersão a uma solução de 3 mL contendo 15 mg de BOx, sendo deixado em contato por 12 horas sobre refrigeração, de forma a permitir que as enzimas se adsorvessem sobre a superfície do material hidrofiliado.

O esquema dos biocátodos em papel com a configuração de XC35/HcBP, preparados por adsorção, é apresentado na Figura 81.

Figura 81: Esquema dos biocátodos em papel XC35/HcBP.

A Figura 82 apresenta as curvas de polarização para os biocátodos em papel nas configurações XC35/HcBP e XC35.

Figura 82: Curvas de polarização em triplicata para o biocátodo em papel XC35/HcBP, em comparação com os biocátodos em papel XC35. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0.

É possível observar pela Figura 82 que a inclusão do material HcBP melhorou ainda mais a performance do biocátodos em papel. Valores de corrente na ordem de grandeza de mA foram obtidas para um único biocátodos em papel, funcionando em uma meia célula em papel. Considerando a área geométrica do material, pode-se considerar que foram obtidos valores de densidade de corrente na ordem de grandeza de $450 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$, valores de densidade de corrente comparáveis com a performance obtida para os bioânodos contendo GDh em quitosana e utilizando o Verde de Metileno polimerizado sobre o papel de carbono Toray, como catalisador para a oxidação do NADH.

A forma das curvas de polarização da Figura 82 traz algumas informações muito importantes, quanto ao desempenho destes biocátodos em papel. Pela forma da curva de polarização do XC35, fica muito claro de que há uma forte limitação no desempenho do mesmo. Em baixos valores de densidade de corrente, onde efeitos de transporte de massa são menos significativos, o desempenho dos dois eletrodos é praticamente o mesmo. Em valores de densidade de corrente acima de $100 \mu\text{A cm}^{-2}$ se tem a separação das duas curvas, de forma que os efeitos de transporte de massa começam a ficar mais pronunciados no biocátodos em papel na configuração XC35 do que no biocátodos em papel na configuração XC35/HcBP, até uma situação extrema, onde a densidade de corrente do biocátodos XC35 passa a ficar limitada a $200 \mu\text{A cm}^{-2}$, mesmo com a baixos valores de potencial. Isso não é observado para o biocátodos XC35/HcBP, mas sim um aumento nos valores de densidade de corrente com a diminuição do potencial. Isso pode estar relacionado a tanto um melhor transporte de massa do oxigênio vindo do ar e difundindo dentro da camada catalítica ou um melhor transporte de eletrólito dentro da estrutura do material Buckypaper, de forma que todas as enzimas se encontram em uma condição ideal para a catálise e correspondente transferência direta com o eletrodo.

A camada hidrofílica ficou em contato com a bomba estática e esteve recebendo a solução como o eletrólito, necessário para o funcionamento biocatalítico das enzimas. A adição do material Buckypaper a camada hidrofílica permitiu uma condição de melhor adsorção das enzimas e de transporte de oxigênio vindo da camada hidrofóbica e eletrólito vindo da bomba estática para as mesmas. Já a camada hidrofóbica ficou direcionada para o ambiente, de forma que o oxigênio presente no ar pode difundir-se pelos poros do carbono para a camada biocatalítica.

A teflonização do carbono e a interface com o Buckypaper permitem a formação de uma zona de contato de tripla fase, constituída pelo eletrólito, necessário para as reações bioquímicas; o carbono como material eletródico, que estará funcionando como coletor de corrente; e o ar atmosférico contendo o oxigênio que estará difundindo para reagir com as enzimas presentes no bioeletrodo (Figura 83). Esta tecnologia já é bem estabelecida na comunidade científica e este tipo de bioeletrodo é chamado de biocátodo respirador (do inglês, *air-breathing biocathode*). A maior vantagem da utilização desta tecnologia de biocátodo se deve a alta solubilidade do oxigênio no ar ($1,9 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) em comparação com o oxigênio presente solubilizado em uma solução aquosa ($2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), o que permite uma maior concentração de oxigênio na superfície eletródica, enquanto funcionando com o oxigênio presente no ar (LAU et al., 2012).

Figura 83: Esquema de um biocátodo respirador mostrando a zona de contato de tripla fase e uma foto de microscopia mostrando uma partícula de XC35.

FONTE: LAU, C.; ADKINS, E. R.; RAMASAMY, R. P.; LUCKARIFT, H. R.; JOHNSON, G. R.; ATANASSOV, P. Design of carbon nanotube-based gas-diffusion cathode for O_2 reduction by multicopper oxidases. **Adv. Energy Mat.** v. 2, p. 162-168, 2012.

Experimentos de curvas de polarização para os bioeletrodos em papel em uma célula eletroquímica em papel, com uma solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ adicionada a placa de Petri. Para os experimentos de curva de polarização da biocélula a combustível, a conexão para o eletrodo de trabalho foi ligada ao biocátodo, enquanto que a conexão do contra-eletrodo foi colocada

em curto-circuito, juntamente a conexão do eletrodo de referência ao bioânodo são apresentados na Figura 84.

Os biocátodos em papel de carbono Toray foram utilizados na configuração XC35/HcBP, contendo 15 mg de BOx adsorvida.

Os bioânodos em papel foram manufaturados a partir de papel de carbono Toray, cortado na geometria apresentada pela Figura 82, mas sem os buracos, com o filme de Verde de Metileno eletrodepositado e contendo 1mg de GDh em 200 μ L de quitosana

Figura 84: Curvas de polarização para o biocátodo, bioânodo e para a biocélula a combustível em papel. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μ M de NAD^+ .

É possível observar pela Figura 84 que o biocátodo modificado com a função de biocátodo respirador apresenta um desempenho muito melhor do que o mesmo em solução. Não é observado um platô nos valores de densidade de corrente com o aumento do sobrepotencial aplicado, mas a densidade de corrente aumenta exponencialmente com o aumento do sobrepotencial aplicado, assim como descrito pelo modelo de Butler-Volmer, onde apenas a energia de ativação do catalisador responde ao potencial aplicado, sem limitação por transporte de massa. Isto resulta também em um melhor desempenho para a

biocélula a combustível em papel em comparação ao mesmo sistema de bioeletrodos utilizados em solução. No caso da biocélula a combustível em solução, a limitação principal estava relacionada com o desempenho do biocátodo em solução, devido a baixa densidade de corrente de redução bioeletrocatalítica de oxigênio molecular.

O desempenho do bioânodo na célula eletroquímica em papel é muito parecido com o mesmo em solução, com algum aumento na densidade de corrente para valores de altos sobrepotenciais, devido a possível melhor distribuição das enzimas sobre a maior área superficial.

É observada pela Figura 84 que o potencial de circuito aberto obtido para o bioânodo foi de -50 mV *vs* Ag/AgCl/Cl⁻(sat), quando o eletrodo foi utilizado na célula eletroquímica em papel e este valor foi um pouco menor do que o mesmo em solução (-100 mV). Isto provavelmente se deve a diferente concentração superficial de NADH no bioânodo em papel em comparação ao mesmo em solução. Apesar de se ter a mesma concentração de NADH e de glicose na solução adicionada a placa de Petri, é de se esperar que o suprimento do soluto pela solução no filme fino entre o bioeletrodo e a bomba estática seja mais lento do que o mesmo imerso totalmente em solução. Já para o caso do biocátodo, o potencial de circuito aberto se mantém no mesmo valor, pelo fato de este estar relacionado somente com o potencial do sítio T1, sendo este regido pelos resíduos de aminoácidos presentes em suas redondezas.

Com relação ao desempenho do bioânodo na biocélula a combustível em papel, este apresentou uma densidade de corrente de 350 $\mu\text{A cm}^{-2}$ a um potencial de 0 mV (*vs* Ag/AgCl/Cl⁻(sat)), uma diferença de apenas 10 $\mu\text{A cm}^{-2}$ com relação ao mesmo bioeletrodo em solução. Já o biocátodo apresentou uma densidade de corrente de 400 $\mu\text{A.cm}^{-2}$ a um potencial de 0 mV (*vs* Ag/AgCl/Cl⁻(sat)), sendo este aproximadamente quatro vezes maior do que para o mesmo biocátodo em solução e sem a função de biocátodos respirador. Esta melhora no desempenho no biocátodo se deve simplesmente ao melhor transporte de massa do oxidante para a superfície do biocátodo, visto que a quantidade de enzimas utilizada foi a mesma.

A partir da curva de polarização obtida para a biocélula a combustível em papel, foi obtida também a curva de potência referente a este sistema eletroquímico. A curva de potência para a biocélula a combustível em papel é apresentada na Figura 85.

Figura 85: Curvas de potência para a biocélula a combustível em papel. Experimentos realizados em solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

O desempenho apresentado pela biocélula a combustível em papel, em termos de potência apresentou um máximo de geração de potência em torno de $110 \mu\text{W cm}^{-2}$ ($0,11 \text{ mW cm}^{-2}$) um valor de até duas vezes maior em comparação com o mesmo sistema em solução. Além disso, foi obtido um máximo na diferença de potencial de 450 mV, um acréscimo de diferença de potencial de 100 mV. Esta melhora no desempenho se deve principalmente ao desenvolvimento de um biocátodo respirador, permitindo um melhor transporte do oxidante para a camada catalítica e resultando em uma maior cinética de redução bioeletrocatalítica de O_2 .

A etapa seguinte do projeto foi a de estudar a possibilidade de utilizar esta biocélula a combustível em papel, para abastecer dispositivos eletrônicos portáteis. Como aplicação inicial, esta biocélula a combustível em papel foi conectada a uma resistência de $1.7 \text{ k}\Omega$ e a

diferença de potencial resultante foi monitorada durante três semanas. Os resultados obtidos para este experimentos são mostrados na Figura 86.

Figura 86: Experimento de tempo de vida da biocélula a combustível em papel funcionando com uma resistência de $1.7\text{ k}\Omega$. A solução adicionada sobre a placa de Petri foi uma solução de tampão fosfato de sódio pH 7.0 contendo 90 mM de glicose e $900\text{ }\mu\text{M}$ de NAD^+ . (i) indica quando a célula foi conectada a resistência, (ii) indica que mais solução foi adicionada na placa de Petri, (iii) indica que a bomba estática foi trocada e (iv) indica quando a resistência foi desligada da biocélula a combustível.

É possível observar pela Figura 86 que a biocélula a combustível em papel apresenta inicialmente uma diferença de potencial de cerca de 620 mV, antes de ligar a resistência, o que é um valor esperado para o par de reações envolvendo a BOx e o sistema de reações da GDh com o NADH e o Vmet.

Após a conexão com a resistência em (i), é observada a queda do potencial medido, resultado da passagem de corrente sobre o mesmo. Mais solução foi adicionada na placa de Petri quando necessário, para evitar a falta do combustível e para evitar a secagem dos bioeletrodos. A cada seis dias, a biocélula a combustível em papel foi desligada e desmontada para a troca da bomba estática, que se encontrava suja e amassada. A biocélula a combustível foi remontada, utilizando uma nova bomba estática, mas mandendo o mesmo par de eletrodos. É interessante observar que a atividade da biocélula a combustível foi restabelecida com uma nova bomba estática, indicando que perdas da atividade enzimática podem estar relacionadas

a fenômenos ocorrendo na superfície eletródica, devido ao longo tempo de exposição com a solução no papel. Uma possível explicação para isto é o excesso do sal do eletrólito, que acaba se concentrando ali, devido a interações com o papel e/ou com o carbono. A presença do sal sobre a superfície catalítica aumenta a força iônica regionalmente. A alta força iônica pode estar causando a inativação de parte das enzimas ali presentes. Um estudo mais minucioso deste fenômeno deve ser feito, de forma a evitar uma possível desativação total dos bioeletrodos, pensando na possibilidade de uma aplicação real. A diferença de potencial observada para a biocélula a combustível, religada novamente em curto, foi de 400 mV e a perda de 200 mV na diferença de potencial está relacionada a considerável perda de biocatalisador devido a sua inativação.

5.5 Biocélula a combustível em papel funcionando com Gatorade®

Finalmente, a última aplicação da biocélula a combustível em papel, desenvolvida por este trabalho, foi com a utilização de um combustível real e de fácil acesso. Para esta etapa, foi escolhida a bebida isotônica Gatorade® para a realização dos experimentos. O Gatorade® apresenta uma quantidade considerável de glicose (em torno de 200 mM), além de possuir sais que o permite funcionar como um eletrólito (concentração de sais em torno de 1 mM). Apesar disto, a limitação quanto a este experimento é a de que foi necessário adicionar o NAD^+ em solução, de forma a promover uma concentração final de 900 μM de NAD^+ , não presente na composição da solução original.

A biocélula a combustível desenvolvida para este experimento se tratou de uma célula com três pares de bioeletrodos, conectados em paralelos, com cada par de células produzindo uma diferença de potencial de cerca de 600 mV. A biocélula a combustível com todos os bioeletrodos ligados estaria gerando uma diferença de potencial de cerca de 1,8 V. As conexões internas desta biocélula a combustível foram feitas utilizando uma tinta de grafite comercial (TED PELLA, INC., Redding, CA, EUA) e cada par de eletrodos foi adicionado a bomba estática em posições opostas, assim como apresentado na Figura 97.

O sistema de pares de bioeletrodos foi conectado e preso por duas placas de plástico, grampeadas, a fim de manter toda a estrutura da biocélula a combustível em papel unida. De forma a mostrar a independência de cada par de bioeletrodos, foram utilizadas três soluções diferentes de Gatorade® (de cores diferentes), porém de mesma concentração de glicose, de NAD^+ e de sais do eletrólito, assim como apresentado com as três sessões de diferentes cores na Figura 87.

Figura 87: Esquema da biocélula a combustível em papel com três pares de eletrodos, mostrando as conexões internas, as placas de plástico e a separação em três sessões.

Da mesma forma que o experimento realizado com um único par de células, a diferença de potencial em função do tempo desta nova biocélula a combustível em papel com três pares de eletrodo foi acompanhada, funcionando com Gatorade® e produzindo energia elétrica suficiente para fazer um relógio de parede conectado a ele funcionar. A escolha da bebida isotônica Gatorade® se deve a alta concentração de glicose, que será utilizada como combustível e a presença dos sais, que dão a função de eletrólito à solução, permitindo que

haja a condução iônica dentro da bomba estática e que a eletroneutralidade seja bem estabelecida.

Os valores de diferença de potencial desta célula funcionando nesta configuração e nestas condições são apresentados na Figura 88.

Figura 88: Experimento de tempo de vida da biocélula a combustível em papel, com três pares de eletrodos, funcionando com Gatorade® contendo 900 μ M de NAD⁺ e funcionando em um relógio com resistência de 1.7 k Ω . (i) indica quando o relógio foi conectado, (ii) indica quando mais solução foi adicionada a placa de Petri, (iii) indica quando a bomba estática secou e o (vi) indica quando o relógio foi desconectado.

Diferente da biocélula a combustível em papel funcionando com a solução eletrolítica preparada em laboratório, a mesma funcionando com a solução de Gatorade® levou cerca de 14 horas para atingir a diferença de potencial de célula esperada, provavelmente devido a baixa concentração de eletrólito, que foi 100 vezes menor do que a solução eletrólito utilizada para os experimentos em bancada. Foi necessário um tempo maior para que a concentração de sais fosse suficiente para promover as condições de pH e de força iônica para que as reações biocatalíticas de ambas as enzimas no biocátodo e bioânodos pudessem funcionar em máxima atividade.

Depois de atingido o equilíbrio estacionário da célula, e a diferença de potencial observada atingiu o valor esperado de 1,8V, esta célula foi conectada ao relógio de parede e o

potencial da célula foi monitorado constantemente, por até 36 horas. É possível observar um comportamento muito parecido com o da biocélula a combustível funcionando com a solução eletrolítica preparada em laboratório. Há o decréscimo da diferença de potencial da célula com o tempo, provavelmente resultante da alta concentração de sais na região onde se encontram os bioeletrodos, levando a uma situação onde pode estar havendo desativação dos catalisadores devido a alta força iônica local.

Um ponto adicional muito importante neste experimento foi a de que esta biocélula a combustível foi deixada secar durante o procedimento. A diferença de potencial observada caiu abruptamente com a falta de eletrólito e combustível para ambos os bioeletrodos (apresentada em (iii)). A adição de mais solução de Gatorade® na placa de Petri permite com que haja a regeneração desta biocélula a combustível e a diferença de potencial é novamente restabelecida. Estes resultados mostram a estabilidade e a viabilidade do sistema bioeletroquímico, frente à geração de eletricidade em condições de uso para dispositivos móveis e portáteis, onde a utilização de combustível pode não ser constante, mas realizada de forma gradual, onde o combustível pode ser muito bem aproveitado.

A tecnologia de biocélulas a combustível em papel se iniciou com o trabalho desenvolvido por esta tese e já se encontra protegida por uma patente internacional, sobre o código PCT/US2011/067152 (SIBBETT et al., 2012). Apesar de que a prova de conceito foi realizada utilizando a glicose como combustível, esta tecnologia pode ser expandida para um grupo de combustíveis tão grandes, quanto se tem de variedade de enzimas da classe das oxiredutases e desidrogenases. A adaptação da tecnologia para qualquer outro sistema biocatalítico pode ser feita sem muitas dificuldades, considerando a simplicidade nos métodos de imobilização utilizados.

Assim como já apresentado neste trabalho, exemplos de biocélulas a combustível funcionando com combustíveis convencionais para células a combustível, tal como álcoois e hidrogênio já são encontrados na literatura. Apesar de as biocélulas a combustível ainda serem considerada como uma tecnologia ainda realizada em nível de bancada, a inserção de materiais nanoestruturados compostos por nanotubos de carbono abriram oportunidades de inserção desta tecnologia, como possíveis candidatos a aplicações reais, visto que valores de potência na ordem de mW já começam a ser atingidos.

Existe ainda uma classe muito rica de biosistemas, que são as células a combustível microbianas, e que apesar de não terem sido foco de estudos neste trabalho, também podem apresentar também muitas oportunidades para a utilização desta tecnologia.

6 Conclusões

Foi possível imobilizar as enzimas Glicose Oxidase sobre a superfície eletródica, mas não foi possível promover o mecanismo de transferência eletrônica direta. A partir de experimentos eletroquímicos, foi mostrado que é possível conectar o FAD sobre a superfície do eletrodo, mas não foi observada uma resposta bioeletrocatalítica de oxidação da glicose. Apesar disto, com experimentos realizados em meio aerado, foi possível comprovar que parte das enzimas Glicose Oxidase se encontrava ativa sobre a superfície eletródica, de forma que o mecanismo de transferência mediada poderia ser utilizado.

Dentre a lista de mediadores do tipo Indicadores de pH escolhidos, o Verde de Bromocresol se apresentou como o melhor candidato para as reações de bioeletrooxidação catalisadas pela enzima Glicose Oxidase. Este mediador apresenta um alto potencial de oxidação, indicativos de reversibilidade eletroquímica e alta afinidade bioquímica com a Glicose Oxidase. Apesar de que os experimentos eletroquímicos e bioquímicos puderam mostrar a funcionalidade do Verde de Bromocresol como mediador, a cinética eletródica e bioquímica eram muito lenta, o que resultava em baixos valores de potência em meia célula.

Dentre a lista de mediadores do tipo Ferrocenos, o ferroceno se apresentou como o mais ativo para a GOx, mas sua atividade é fortemente influenciada pela baixa solubilidade na solução tampão utilizada. O ferroceno ácido carboxílico não funciona como mediador para a GOx, devido a impedimentos eletrostáticos com o sítio ativo da enzima. O ferroceno carboxaldeído funciona como mediador para as reações bioeletroquímicas envolvendo a GOx, mas este se degrada, como resultado de algum dos processos redox ocorrendo no eletrodo. Isto não acontece com a redução direta com a GOx, que termina por preservar a estrutura do ferroceno carboxaldeído por mais tempo do que com a redução direta no eletrodo.

O potencial de oxidação dos ferrocenos é fortemente influenciado pelos grupos funcionais presentes nos anéis ciclopentadienílicos. Grupos funcionais doadores de densidade eletrônica permitem uma maior densidade de carga elétrica ao átomo de ferro, presente nos ferrocenos, resultando em um maior potencial de oxidação.

O fenômeno de envenenamento da enzima Glicose Oxidase pelo oxigênio molecular foi demonstrado experimentalmente, se apresentando como um grande problema para a sua aplicação como bioânodo em biocélulas a combustível que utilizem o oxigênio molecular no biocátodo como oxidante.

O Verde de metileno pode ser eletrodepositado sobre a superfície de eletrodos de carbono. Este apresenta a capacidade de oxidar cataliticamente moléculas de NADH e se reoxidar sobre a superfície eletródica, funcionando como um mediador para as reações bioeletrocatalíticas de oxidação de glicose envolvendo as enzimas Glicose Desidrogenase.

As melhores condições para o funcionamento de um bioânodo utilizando a enzima Glicose Desidrogenase são: 100 mM de glicose e 900 μM de NAD^+ .

O desempenho de bioânodos contendo Glicose Desidrogenase imobilizada em quitosana sobre um suporte de papel de carbono Toray contendo Verde de metileno eletrodepositado, nas melhores condições de glicose e de NAD^+ , apresentou valores de densidade de corrente na ordem de $340 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs $\text{Ag/AgCl/Cl}^-_{(\text{sat})}$.

Não foi possível promover o mecanismo de transferência direta com as enzimas Lacase, mas foi possível promover a atividade bioeletrocatalítica de redução de O_2 por estas enzimas utilizando o ABTS como mediador. O ABTS apresentou indicativos de reversibilidade eletroquímica a um alto potencial de redução na ordem de 550 mV vs ECS. Valores de densidade de corrente de redução de $44 \mu\text{A cm}^{-2}$ foram obtidos com um eletrodo de ouro utilizando Lacase e ABTS como mediador e rotacionando a 1600 rpm.

A enzima Bilirrubina Oxidase apresentou a capacidade de transferência eletrônica direta em todos os eletrodos que puderam ser tratados para promover uma superfície hidrofílica suficiente para que a adsorção destas enzimas fosse possível.

Os biocátodos contendo Bilirrubina oxidase adsorvida sobre o papel de carbono Toray apresentaram valores de densidade de corrente de $114 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs ECS para as reações de redução de oxigênio molecular, a partir do mecanismo de transferência direta.

A biocélula a combustível desenvolvida com um bioânodo contendo Glicose desidrogenase e um biocátodos contendo Bilirrubina oxidase apresentou valores de densidade de potência máxima de $52 \mu\text{W cm}^{-2}$ a uma diferença de potencial de 300 mV.

O primeiro biocátodo em papel desenvolvido foi o biocátodo no formato de cartão, que apresentou um baixo desempenho, com valores de densidade de corrente na ordem de $67 \pm 13 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs ECS, mas foi a partir deste tipo de bioeletrodo que a tecnologia de biocélulas a combustível em papel foi demonstrada em público pela primeira vez.

O novo desenho do suporte de papel de carbono Toray, de tamanho menor e contendo os buracos na cabeça do suporte permitiram uma melhor acomodação da camada catalítica e possibilitam resultados mais reprodutíveis.

Os biocátodos em papel na configuração XC35/HBL apresentaram valores de densidade de corrente na ordem de $148 \pm 2 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs Ag/AgCl/Cl⁻_(sat), resultado de uma melhor utilização da área do suporte de carbono, em comparação aos biocátodos no formato de cartão.

Os biocátodos em papel na configuração XC35 apresentaram valores de densidade de corrente na ordem de $201 \pm 11 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs Ag/AgCl/Cl⁻_(sat), resultado da melhor acomodação das enzimas Bilirrubina oxidase, favorecido pelo processo de imobilização das enzimas por adsorção. Além disso, os biocátodos nesta configuração também apresentaram boa estabilidade temporal, quanto a performance de potencial de circuito aberto e de corrente de redução.

Os biocátodos em papel na configuração XC35/HcBP apresentaram valores de densidade de corrente de até $450 \mu\text{A cm}^{-2}$ a 0 mV vs Ag/AgCl/Cl⁻_(sat), resultado do ambiente de condução tridimensional resultado do material nanoestruturado fibroso. Além disso, a combinação do HcBP com o XC35 permitiram que a função de biocátodo respirador pudesse ser bem definida.

A biocélula a combustível em papel, compreendendo o biocátodo na configuração XC35/HcBP e o bioânodo de mesma geometria de suporte, contendo o Verde de metileno polimerizado e as enzimas Glicose Desidrogenase imobilizadas por quitosana apresentou valores de máximo de densidade de potência de $110 \mu\text{W cm}^{-2}$ a uma diferença de potencial de 450 mV.

Uma biocélula a combustível em papel com um único par de bioeletrodos apresentou a capacidade de geração de energia elétrica por pelo menos 18 dias, quando utilizada uma

resistência de 1.7 k Ω . Apesar disto, o potencial da célula decaiu com o tempo, provavelmente resultado da inativação dos biocatalisadores, por efeito do acúmulo do sal do eletrólito, que estaria promovendo um aumento na força iônica local, na interface entre o biocátodos e a bomba estática.

Como forma de demonstração do uso da tecnologia com um combustível real, uma biocélula a combustível em papel com três pares de eletrodos apresentou a capacidade de geração de energia elétrica, utilizando a bebida isotônica Gatorade® como combustível, para fazer um relógio de parede funcionar por pelo menos 36 horas de experimento. Apesar disto, foram necessárias 14 horas para que esta biocélula a combustível apresentasse a diferença de potencial máxima de célula, resultado da baixa concentração de sais no eletrólito utilizado.

7 Referências

ADDO, P. K.; ARECHEDERRA, R. L.; MINTEER, S. D. Evaluating enzyme cascades for methanol/air biofuel cells based on NAD⁺-dependent enzymes. **Electroanalysis**, v. 22, n. 7-8, p. 807-812, 2010.

ARMSTRONG, F. A. Insights from protein film voltammetry into mechanisms of complex biological electron-transfer reactions. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.**, p. 661-671, 2002.

ATANASSOV, P. Enzymatic biofuel cells: explorations and designs. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF ELECTROCHEMISTRY, 62., 2011, Niigata. **Livro de resumos...** Lausanne: The International Society of Electrochemistry, 2011. Ref. ISE-111511.

BARD; A. J., FAULKER, L. R. **Electrochemical methods fundamentals and applications**. New York: John Wiley, 1980. p. 215-229.

BARTLETT, P. N.; TEDDBUTT, P.; WHITETAKER, R. G. Kinetic aspect of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry. **Prog. React. Kinet.**, v. 16, n. 2, p. 55-155, 1991.

BARTON, S. C.; GALLAWAY, J.; ATANASSOV, P. Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 10, p. 4867-4886, 2004.

BARTON, S. C.; KIM, H-H; BINYAMIN, G.; ZHANG, Y.; HELLER, A. Electroreduction of O₂ to water on the “wired” laccase cathode. **J. Phys. Chem. B**, v. 105, n. 47, p. 11917-11921, 2001.

BRANCHI, B.; GALLI, C.; GENTILI, P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. **Org. Biomol. Chem.**, v. 3, p. 2604-2614, 2005.

CARR, P. W.; BOWERS, L. DL. **Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry**: fundamentals and applications. New York: Wiley, 1980. p. 62.

CASS, A. E. G.; DAVIS, G.; FRANCIS, G. D.; HILL, H. A. O.; ASTON, W. J. A.; HIGGINS, I. J.; PLOTKIN, E. V.; SCOTT, L. D. L.; TURNER, A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. **Anal. Chem.**, v. 56, n. 4, p. 667-674, 1984.

CINICIATO, G. P. M. K. C.; LAU, C.; COCHRANE, A.; SIBBETT, S. S.; GONZALEZ, E. R.; ATANASSOV, P. Development of paper based electrodes: From air-breathing to paintable enzymatic cathodes. **Electrochim. Acta**, v. 82, 2012, p. 208-213.

CLEGG, A. D.; REES, N. V.; KLYMENKO, O. V.; COLES, B. A.; COMPTON, R. G. Marcus theory of outer-sphere heterogeneous electron transfer reactions: High precision steady-state measurements of the standard electrochemical rate constant for ferrocene derivatives in alkyl cyanide solvents. **J. Electroanal. Chem.**, v. 580, p. 78-86, 2005.

COLE, J. L.; AVIGLIANO, L.; MORPURGO, L.; SOLOMON, E. I. Spectroscopic and chemical studies of the ascorbate oxidase trinuclear copper active site: comparison to laccase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 113, n. 24, p. 9080-9089, 1991.

COLMATI, F.; YOSHIOKA, S. A.; SILVA, V. L. V. B.; VARELA, H.; GONZALEZ, E. R. Enzymatic based biocathode in a polymer electrolyte membrane fuel cell. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 2, p. 195-202, 2007.

COONEY, M. J.; PETERMANN, J.; LAU, C.; MINTEER, S. D. Characterization and evaluation of hydrophobically modified chitosan scaffolds: Towards design of enzyme immobilized flow-through electrodes. **Carbohydr. Polym.**, v. 75, p. 428-435, 2009.

CRACKNELL, J. A.; MCNAMARA, T. P.; LOWE, E. D.; BLADFORD, C. F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: x-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. **Dalton Trans.**, v. 40, p. 6668-6675, 2011.

CRACKNELL, J. A.; VINCENT, K. A.; ARMSTRONG, F. A. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. **Chem. Rev.**, v. 108, n. 7, p. 2439-2461, 2008.

DEGANI, T.; HELLER, A. Electrical communication between redox centers of glucose oxidase and electrodes via electrostatically and covalently bound redox polymers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 2357-2358, 1989.

DEMIN, S.; HALL, E. A. H. Breaking the barrier to fast electron transfer. **Bioelectrochemistry**, v. 76, p. 19-27, 2009.

DIAMOND, D.; LAU, K. T.; BRADY, S.; CLEARY. Integration of analytical measurements and wireless communications-current issues and future strategies. **Talanta**, v. 75, p. 606-612, 2008.

FERY-FORGUES, S.; DELAVALUX-NICOT, B. Ferrocene and ferrocenyl derivatives in luminescent systems. **J. Photochem. Photobio. A: Chemistry**, v. 132, p. 137-159, 2000.

GALLAWAY, J. W.; BARTON, S. C. Kinetics of redox polymer-mediated enzyme electrodes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, n. 26, p. 8527-8536, 2008.

GIBSON, Q. H.; SWOBODA, B. E. P.; MASSEY, V. Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 239, n. 11, p. 3927-3934, 1964.

GOMES, A. S. O. **Desenvolvimento de uma célula a combustível microbiana com culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultura de glicerol**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

GONZALEZ, E. R.; SRINIVASAN, S. Electrochemistry of fuel cells for transportation applications. **Int. J. Hydrogen Energy**, v. 9, n. 3, p. 215-218, 1984.

GRAY, H. B.; MALMSTROM, B. G.; WILLIAMS, R. J. P. Copper coordination in blue proteins. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 5, p. 551-559, 2000.

GRUPO DE ELETROQUÍMICA. **Sítio do grupo de eletroquímica do IQSC**. Disponível em: <<http://eletroquimica.iqsc.usp.br/linhasdepesquisa/>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

GUPTA, G.; LAU, C.; RAJENDRAN, V.; COLON, F.; BRANCH, B.; IVNITSKI, D.; ATANASSOV, P. Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrode. **Electrochem. Commun.**, v. 13, p. 247-249, 2011.

HAALAND, A. Molecular structure and bonding in the 3d metallocenes. **Acc. Chem. Res.**, v. 12, p. 415-422, 1979.

HAUGE, J. G. Kinetics and specificity of glucose dehydrogenase from *Bacterium Anitratum*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 45, p. 263-169, 1960.

HELLER, A.; MANO, N.; KIM, H-H.; ZHANG, Y.; MAO, F.; CHEN, T.; BARTON, S. C. **Miniature biological fuel cell that is operational under physiological conditions and associated devides and methods**. US 2008/0118782, 25 jan. 2008.

JAEGFELDT, H. Adsorption and electrochemical oxidation behavior of NADH at a clean platinum electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 110, p. 295-302, 1980.

KATZ, E.; SHENNEY HAJ, I.; WILLNER, I. Electrical contacting of glucose oxidase in a redox-active rotaxane configuration. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 43, p. 3292-3300, 2004.

KATZ, E.; WILLNER, I.; KOTLYAR, A. B. A non-compartmentalized glucose | O₂ biofuel cell by bioengineered electrodes surfaces. **J. Electroanal. Chem.**, v. 479, p. 64-68, 1999.

KORDESCH, V. C. H. K.; SIMANDER, G. **Fuel cells and their applications**. Weinheim: Wiley, 1996. p. 32-38.

LA ROTTA, H. C. E.; CINICIATO, G. P. M. K.; GONZALEZ, E. R. Triphenylmethane dyes, an alternative for mediated electronic transfer systems in glucose oxidase biofuel cells. **Enz. Microb. Tech.**, v. 48, p. 487-497, 2011.

LAU, C.; ADKINS, E. R.; RAMASAMY, R. P.; LUCKARIFT, H. R.; JOHNSON, G. R.; ATANASSOV, P. Design of carbon nanotube-based gas-diffusion cathode for O₂ reduction by multicopper oxidases. **Adv. Energy Mater.**, v. 2, p. 162-168, 2012.

LENHINGER, A. L. **Lenhinger principles of biochemistry 4th ed.**, New York: W. H. Freeman, 2005. p. 511-516.

LIMA, F. H. B. **Desenvolvimento de eletrocatalisadores dispersos para o cátodo de células a combustível alcalinas**. 2006. 127 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

LUTZ, A. E.; LARSON, R. S.; KELLER, J. O. Thermodynamic comparison of fuel cells to the Carnot Cycle. **Int. J. Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1103-1111, 2002.

MAKAL, A. M.; PLAZUK, D.; ZAKRZEWSKI, J.; MISTERKIEWICZ, B.; WOZNIAK, K. Experimental charge density analysis of symmetrically substituted ferrocene derivatives **Inorg. Chem.**, v. 49, n. 9, p. 4046-4059, 2010.

MCDUGALL, A. **Fuel Cells**. London: The Macmillan., 1976. p. 18-21.

MENDEZ S.; FENTON, E. M.; GALLEGOS, G. R.; PETSEV, D. N.; SIBBETT, S. S.; STONE, H. A.; ZHANG, Y.; LOPEZ, G. P. Imbibition in porous membranes of complex Shape: Quasi-stationary flow in thin rectangular segments. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 1380-1385, 2010.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, 2004.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). Secretaria de Energia Elétrica. **Monitoramento do sistema Elétrico Brasileiro – Boletim de Agosto/2012**. Brasília. 2012, p. 29.

MIZUTANI, K.; TOYODA, M.; SAGARA, K.; TAKAHASHI, N.; SATO, A.; KAMITAKA, Y.; TSUJIMURA, S.; NAKANISHI, Y.; SUGIURA, T.; YAMAGUSHI, S.; KANO, K.; MIKAMI, B. X-ray crystal analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 angstrom resolution using a twin crystal. **Acta Crystallogr.**, v. 66, p. 765-770, 2010.

MOORE, C. M.; MINTEER, S. D.; MARTIN, R. S. Microchip-based ethanol/oxygen biofuel cell. **Lab. Chip**, v. 5, p. 218-225, 2005.

NAKAMURA, S.; HAYASHI, S.; KOGA, K. Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 445, p. 294-308, 1976.

PAGANIN, V.; SITTA, E.; IWASITA, T.; VIELSTICH, W. Methanol crossover effect on the cathode potential of a direct PEM fuel cell. **J. Appl. Electrochem.**, v. 35, p. 1239-1243, 2005.

PALMORE, G. T. R.; KIM, H. H. Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. **J. Electroanal. Chem.**, v. 464, p. 110-117, 1999.

PALMORE, G. T. R., WHITESIDES, G. M. Microbial and enzymatic biofuel cells. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. **Enzymatic conversion of biomass for fuel production**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 271-290.

PRINS, R.; KORSWAGEN, A. R.; KORTBEEK, A. G. T. G. Decomposition of the ferricenium cation by nucleophilic reagents. **J. Organometal. Chem.**, v. 39, p. 335-344, 1972.

PRODOLLIET, J.; HISCHENHUBER, C. Food authentication by carbohydrate chromatography. **Z. Lebensm. Unters Forsch A**, v. 207, p. 1-12, 1998.

RAO, A.; MACLAY, J.; SAMUELSEN, S. Efficiency of electrochemical systems. **J. Power Sources**, v. 134, p. 181-184, 2004.

SANTOS, L. **Investigação da enzima Bilirrubina oxidase como catalisador da reação de redução eletroquímica de oxigênio**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SANTOS, L.; CINICIATO, G. P. M. K.; GONZALEZ, E. R. Effect of mediator on the reduction of molecular oxygen catalysed by laccase. In: MEETING OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, 213., 2008, Phoenix. **Livro de resumos...** Pennington: The Electrochemical Society, 2008. Ref. MA2008-01 250.

SHLEEV, S.; TKAC, J.; CHRISTENSON, A.; RUZGAS, T.; YAROLOPOV, A. I.; WHITTAKER, J. W.; GORDON, L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. **Bios. Bioelec.**, v. 20, p. 2517-2554, 2005.

SIBBETT, S.; LAU, C.; CINICIATO, G. P. M. K.; ATANASSOV, P. **Paper-based fuel cell**. PCT/US2011/067152, 28 jun. 2012.

SIMPSON, C.; JORDAAN, J.; GARDINER, N. S.; WHITELEY, C. Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH. **Prot. Exp. Pur.**, v. 51, p. 260-266, 2007.

SOKIC-LAZIC, D.; MINTEER, S. D. Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. **Bios. Bioelec.**, v. 24, p. 939-944, 2008.

SOLOMON, E. I.; BALDWIN, M. J.; LOWERY, M. D. Electronic structures of active sites in copper proteins: contribution to reactivity. **Chem. Rev.**, v. 92, n. 4, p. 512-542, 1992.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chem. Rev.**, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, 1996.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. Células a combustível: Uma alternativa promissora para a geração de eletricidade. **Química Nova**, v. 12, n. 3, p. 269-270, 1989.

TORSTENSSON, A.; GORDON, L. Catalytic oxidation of NADH by surface-modified graphite electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, v. 130, p. 199-207, 1981.

UNITED NATIONS (UN). **Final report of the United Nations conference on sustainable development, Rio+20**. Rio de Janeiro, 2012. p.24.

VINCENT, K. A.; CRACKNELL, J. A.; CLARK, J. R.; LUDWIG, M.; LENZ, O.; FRIEDRICH, B.; ARMSTRONG, F. A. Electricity from low-level H₂ in still air – an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. **Chem. Commun.**, p. 5033-5035, 2006.

WAGGONER, J. R.; MUKHERJEE, L. M. Proton medium effects in 5-40% acetone-water mixture. An investigation using the ferrocene assumption. **J. Phys. Chem.**, v. 86, n. 19, p. 3852-3855, 1982.

WAIT, A. F.; PARKIN, A.; MORLEY, G. M.; SANTOS, L.; ARMSTRONG, F. A. Characteristics of enzyme-based hydrogen fuel cells using an oxygen-tolerant hydrogenase as the anodic catalyst. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, n. 27, p. 12003-12009, 2010.

WASHBURN, E. W. The dynamics of capillary flow. **Phys. Rev.**, v. 17, n. 3, p. 273-283, 1921.

WILLNER, I.; KATZ, E. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 39, p. 1180-1218, 2000.

WILSON, R.; TURNER, A. P. F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Bios. Bioelec.**, v. 7, p. 165-185, 1992.

XIAO, Y.; PATOLSKY, F.; KATZ, E.; HAINFELD, J. F.; WILLNER, I. "Plugging into enzymes": nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. **Science**, v. 299, p. 1877-1881, 2003.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 9608-9614, 1996.

YAHIRO, A. T.; LEE, S. M.; KIMBLE, D. O. Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 88, p. 375-383, 1964.

ZARA, A. J.; MACHADO, S. S.; BULHÕES, L. O. S.; BENEDETTI, A. V.; RABOCKAI, T. The electrochemistry of ferrocene in non-aqueous solvents. **J. Electroanal. Chem.**, v. 221, p. 165-174, 1987.

ZHOU, G.; ZHANG, G.; CHEN, H. Development of integrated chemiluminescence flow sensor for the detection of adrenaline and isoprenaline. **Anal. Chim. Acta**, v. 463, p. 257-263, 1996.