Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Desenvolvimento de biocélulas a combustível de Etanol/O_2"

Carolina Souza Bonfin

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

"Desenvolvimento de biocélulas a combustível de Etanol/O_2"

Development of Biofuel cell Ethanol/O_2

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja
o Programa de Pós-graduação)

Carolina Souza Bonfin

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Prof. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza Bonfin, Carolina

Desenvolvimento de biocélulas a combustível de Etanol/O_2. Ribeirão Preto, 2018.

107 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Orientadora: Andrade, Adalgisa Rodrigues de.

1. Biocélula a combustível. 2. Etanol. 3. ADH. 4. Eletropolimerização simultânea. 5. Verde de metileno 6. Pirrol

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, porque Dele, Por Ele e para Ele são todas as coisas. E depois aos meus pais e irmãos, por todo apoio, incentivo, amor e compreensão durante esses anos; acreditando em mim mesmo quando nem eu acreditava.

AGRADECIMENTOS

Gratidão primeiramente a Deus, por seu amor incondicional e por ter me dado a oportunidade de cursar uma pós-graduação na melhor universidade de país, e ter me sustentado e me dado força e ânimo durante esse período. Sem Ele com certeza nada disso seria possível e eu não teria chegado até aqui; afinal, tudo vem Dele e tudo é para honra e glória Dele.

À minha família, pai, mãe e irmãos pelo apoio espiritual, emocional, intelectual e pessoal que me deram durante esse tempo, pois foi fundamental esse apoio. Sem eles teria sido tudo mais difícil do que foi. Agradeço também aos meus familiares pela torcida e orações; e meu namorado, Felipe (e sua família também), que com certeza deixou tudo mais alegre e colorido nos últimos meses.

À ABU, por todo auxílio que me concederam (inclusive à rep mais linda de Ribeirão, Nutella!). Um movimento apaixonante, com pessoas incrivelmente maravilhosas que foram como uma segunda família. Aprendi muito com cada um de vocês. Amizades que eu fiz e que com certeza vão durar para sempre. Sem vocês não seria tão divertido. Obrigada por cada momento inesquecível.

À IMCERP (Igreja Metodista Central de Ribeirão Preto), por terem me acolhido tão bem nesses últimos anos. Obrigada por todo apoio, amor, carinho e a todos os momentos maravilhosos concedidos; em especial ao pastor, à mocidade e ao grupo de discipulado. Aprendi muito com cada um de vocês.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) pela disponibilização de recursos. A todos os participantes do Laboratório de Eletroquímica e Eletrocatálise de Ribeirão Preto (LEEA), Vanderlei, Jefferson (João), Thamyres (Joana), Neto, e todos os outros, por toda a ajuda nos experimentos e tratamentos de dados, bem como os momentos e experiências legais compartilhadas dentro e fora do laboratório, e por oferecerem um

ambiente agradável durante o mestrado. E um obrigado especial à orientadora Prof. Dra. Adalgisa, por todos os ensinamentos passados e todo auxílio concedido.

À CAPES pela bolsa concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas

lutei para que o melhor fosse feito. Não

sou o que deveria ser, mas graças a

Deus, não sou o que era antes.”

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário

que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro

passo”

(Martin Luther King)

“Entregue o seu caminho ao Senhor;

confie nele, e ele agirá”

(Salmos 37:5)

“O medo se vai quando

ouço a voz do alto me dizer:

Sê valente, sê valente!”

(Marcos Almeida)

RESUMO DO PROJETO

Resumo: BONFIN, Carolina Souza. **Desenvolvimento de biocélulas a combustível de Etanol/O_2. 2018. 125 f.** Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As biocélulas a combustível proporcionam meios de se obter energia de maneira mais sustentável, limpa e renovável e apresentam grande potencial para serem usadas como fontes de energia alternativas para dispositivos eletrônicos de baixa demanda energética. Esta dissertação investiga a bioeletro-oxidação de etanol pela enzima Álcool Desidrogenase (ADH) empregando-se bioânodos inéditos, ainda não presentes na literatura, com polimerização simultânea do eletrocatalisador/mediador poli-VM (poli - verde de metileno) e polímero condutor PYR (polipirrol). Uma vez preparado o bioânodo foram realizados estudos para verificar a oxidação do cofator (NADH), formação do produto da bio-oxidação de etanol e estabilidade do sistema. Na presença do NADH, observou-se um par de picos redox NADH/NAD^+ muito bem definidos (-0,261/-0,430 V vs ECS). Também foram feitos estudos visando aumentar a eficiência energética gerada empregando nanotubos de carbono (MWCNTs) ao suporte de carbono antes da eletropolimerização simultânea do filme para aumento de área eletroquímicamente ativa e melhor comunicação com os sítios ativos das enzimas. Os valores de densidade de potência se mostraram altos (188 μW cm^{-2}) e ainda foram melhorados com a adição de MWCNTs com um aumento de 90 μW cm^{-2} (em pH 8,9). O bioânodo se mostrou relativamente estável, apresentando um decaimento médio de 36%, do valor inicial da densidade de potência após 20 semanas de estocagem, tanto na ausência quanto na presença da enzima no sistema. Quando operado em condição contínua (tempo = 4h, E (V)= ½ PCA), o decaimento foi de 39% e de 66% em 12 horas de operação em pH 8,9. A eletrólise de longo prazo (12 horas) de etanol seguida pelo sistema HPLC-UV / RID confirma o achado eletroquímico com a formação de acetaldeído (2,89 mmol L^{-1} e 9,08 mmol L^{-1}) para o filme na ausência e presença de MWCNT, respectivamente. Demonstramos também, através da eletrólise, que a adição de MWCNT aumenta o consumo de etanol. Foi também preparada uma biocélula completa (com enzima no cátodo e ânodo) sem membrana polimérica visando diminuir resistência de transferência de prótons do sistema, com a configuração final constituída de ADH/NAD^+, etanol, Lacase/O_2 com e sem MWCNT no bioânodo. Os melhores resultados foram com a presença de MWCNTs no bioânodo, obtendo-se uma potência de 12,5 $\pm$ 0,9 μW cm^{-2}. Os resultados obtidos são bastante promissores comparado com a literatura atual e mostram que esse sistema pode ser empregado para construção de biocélula a combustível. Além disso, o próprio filme obtido com a eletropolimerização simultânea mostrou resultados interessantes, podendo ser utilizado também em outros sistemas, como biosensores, por exemplo.

Palavras chaves: biocélula a combustível enzimática, etanol, pirrol, verde de metileno, álcool desidrogenase, eletropolimerização simultânea

ABSTRACT

Abstract: BONFIN, Carolina Souza. **Development of Biofuel cell Ethanol/O_2. 2018. 125 f.** Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Biofuel cells provide the means to obtain energy in a more sustainable, clean, and renewable way and have great potential as alternative energy sources for low-energy electronic devices. This dissertation investigates ethanol bioelectrooxidation by the enzyme Alcohol Dehydrogenase (ADH) at bioanodes, unpublished bioanodes, not yet present in the literature, with simultaneous polymerization of the electrocatalyst/ mediator (polymethylene green) and conductive polymer (polypyrrole). After preparing the bioanode, we investigated cofactor (NADH) oxidation, the ethanol biooxidation product, and bioanode stability. In the presence of NADH we observed a well-definide peaks (-0.261/-0.495 V vs SCE) for NADH/NAD+ redox couple. We also conducted studies to increase the generated energy efficiency by using carbon nanotubes to the C-support before simultaneous film electropolymerization to augment the electrochemically active area and to improve communication with the enzyme active sites. The power density values were shown to be high (188 μW cm^{-2}) and increased upon addition of MWCNTs; at pH 8.9, showed an increase of 90 μW cm^{-2}. The bioanode was relatively stable, in fact, in the presence or absence of enzyme, the mean decay was around 36% of the initial power density after 20 weeks of storage When the bioanode was operated in continuous condition (time = 4h, E (V) = ½ PCA), the decay was 39% and 66% in 12 hours of operation for pH 8.9. Long-term electrolysis (12 hours) of ethanol followed by HPLC-UV/RID system confirms our electrochemical finding demonstrating formation of acetaldehyde (2.89 mmol L^{-1} and 9.08 mmol L^{-1}) for the film in the absence and presence of MWCNT, respectively. We demonstrate that also that addition of MWCNT enhances the consumption of ethanol using the electrolysis. We also prepared a complete biofuel cell (containing enzyme at the anode and at the cathode) without polymer membrane to decrease the system proton transfer resistance: the final configuration consisted of ADH / NAD +, ethanol, Laccase , and O_2 with or without MWCNTs in bioanode. The best results were with the presence of MWCNTs in the bioanode, which provided a power of 12.5 $\pm$ 0.9 μW cm^{-2}. The results obtained here are quite promising if compared to the current literature and show that this system can be used to construct a BFC. In addition, the film obtained with the simultaneous electropolymerization has shown interesting results, and can be used in other systems, such as biosensors.

Keywords: enzymatic biofuel cells, ethanol, pyrrole, methylene green, alcohol dehydrogenase, simultaneous electropolymerization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma biocélula a combustível enzimática primária 2

Figura 2: Pesquisa bibliográfica conduzida na base de dados do Science Direct utilizando o termo “biofuel cell”. Fonte: Science Direct [ScienceDirect].....3

Figura 3: Representações esquemáticas dos tipos de reações possíveis entre as enzimas e os eletrodos em uma biocélula a combustível.....3

Figura 4: Diagrama do processo catalítico enzimático e não enzimático. A = reagente; B = produto; E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto.....15

Figura 5: a) Estrutura no NAD^+ e b) Esquema reacional da oxirredução do cofator NAD^+.....16

Figura 6: Figura representativa da estrutura da enzima ADH obtida por cristalografia de raios X.....18

Figura 7: Esquema do mecanismo de ação da enzima ADH na catálise de oxidação do etanol. (E ≡ ADH, A ≡ NAD+, B ≡ etanol, P ≡ acetaldeído, Q ≡ NADH).....19

Figura 8. Representação da Lacase mostrando os átomos de Cu como esferas coloridas, sendo o sítio T1 em azul e o par T2 e T3 em amarelo.....20

Figura 9. Esquema representativo dos sitios cataliticos da enzima Lacase.....22

Figura 10. Funcionamento do MWCNTs-Ac sobre a Lacase 21

Figura 11: Esquema dos principais métodos de imobilização enzimática. (a) adsorção direta, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) aprisionamento, (e) encapsulamento e (f) afinidade química e/ou física.....24

Figura 12: Estrutura molecular da poliamidoamina (PAMAM) geração 4 (G4) contendo 4,5 nm de diâmetro, 32 grupos interiores de amina terciária e 64 grupos funcionais periféricos.....25

Figura 13. Estrutura do Nafion.....26

Figura 14: Representação da estrutura química do monômero pirrol (PYR).....27

Figura 15: Mecanismo da eletropolimerização do Pirrol.....28

Figura 16. Estrutura do Nanotubo de carbono de parede única ou simples (SWNT).....30

Figura 17: Estrutura do nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs).....31

Figura 18. Etapas ocorridas em uma reação na interface eletrodo/solução resultando na medida voltamétrica.....35

Figura 19. Forma de aplicação do potencial e resposta resultante para cada tipo de voltametria.....36

Figura 20. Variação do potencial em função do tempo em uma voltametria cíclica.....37

Figura 21. (A) Aplicação do salto de potential em um ensaio cronoamperométrico; (B) comportamento da corrente com o tempo e (C) da corrente com $t^{-1/2}$ segundo a equação de Cottrell 39

Figura 22. Representação da célula de três eletrodos utilizada nos testes voltamétricos e cronoamperométricos.....42

Figura 23 a) Fotografia da célula de eletrólise e b) Esquema da célula de eletrólise utilizada.....43

Figura 24: Esquema da célula utilizada para ensaios de densidade de potência de bioânodo.....44

Figura 25: Esquema da célula utilizada para ensaios de densidade de potência da biocélula completa.....45

Figura 26: Esquema da arquitetura final do bioânodo na presença e ausência de MWCNTs.....48

Figura 27. Comparação do efeito dos ancorantes (NAFION e PAMAM) da enzima ADH nos valores de densidades de potência das semi-biocélulas a combustível $EtOH/O_2$ para o filme (poli-VM-poli-PYR). Meio reacional: Tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico:

papel de carbono (área = 1cm^2).....49

Figura 28. Voltamogramas cíclicos representativos na ausência e presença de NADH (1 mg mL^{-1}) em a) filme poli-VM na ausência e presença de NADH e b) diferentes filmes contendo poli-PYR e poli-VM. Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7.4) e $NaNO_3$ 0,1mol L^{-1} (v = 10 mV s^{-1}), suporte carbono vítreo (A = 0,70 cm^2).....55

Figura 29: Voltamograma cíclico na ausência e presença do NADH (1 mg mL^{-1}) do filme (poli-VM-Poli-PYR) com eletropolimerização simultânea sobre o eletrodo de carbono vítreo (A = 0,70 cm^2) : Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,4) e $NaNO_3$ 0,1mol L^{-1} (v = 10 mV s^{-1}).....57

Figura 30. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do filme de eletropolimerização simultânea do verde de metileno com pirrol em diferentes aproximações.....58

Figura 31. Curvas representativas de densidade de potência das semi-biocélulas a combustível EtOH/O_2 contendo ou não enzima ADH para o filme poli-VM+poli-PYR na plataforma de tecido de carbono (a) na ausência de MWCNTs e (b) na presença de MWCNTs. Meio reacional: Tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....60

Figura 32. Curvas representativas de densidade de potência das semi-biocélulas a combustível EtOH/O_2 contendo enzima ADH para o filme de eletropolimerização simultânea (poli-VM-poli-PYR). Meio reacional: Tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....62

Figura 33. Gráfico comparativo dos valores de densidade de potência máxima na presença e ausência da enzima ADH. 1 = poli-VM, 2 = poli-VM + ADH/ NAD^+, 3 = poli-PYR, 4 = poli-PYR + ADH/ NAD^+, 5 = poli-VM+poli-PYR, 6 = poli-VM+poli-PYR + ADH/ NAD^+, 7 = (Poli-VM-Poli-PYR), 8 = (Poli-VM-Poli-PYR) + ADH/ NAD^+. Meio reacional: Tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina

E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....63

Figura 34. Estudo da estabilidade dos bioânodos (poli-VM+poli-PYR) com e sem enzima em função do tempo em (a) tampão fosfato (pH 7,4) e (b) tampão fosfato (pH 8,9).....65

Figura 35. Gráficos representativos das densidades de potências médias dos bioeletrodos com polimerização simultânea (poli-VM - poli-PYR) após 4h de operação (a) filme (poli-VM - poli-PYR), (b), bioânodos (poli-VM - poli-PYR)/ADH, (c) comparação da estabilidade entre sistemas. Meio reacional de tampão fosfato (pH 8,9), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....67

Figura 36. Teste cronoamperométrico de adição de etanol (3 mmol/min). Comparação entre os eletrodos com e sem enzima ADH. Potencial: 0,6 V. Meio reacional: Tampão fosfato pH 7,4.....69

Figura 37. Gráficos representativos das densidades de potências médias dos eletrodos com polimerização simultânea (poli-VM + poli-PYR) na (a) comparação entre os brancos na ausência e presença de MWCNTs, (b) comparação entre os eletrodos com enzima na ausência e presença de MWCNTs. Meio reacional de tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....70

Figura 38. Comparação entre as densidades de potências médias dos eletrodos com MWCNTs + (poli-VM + poli-PYR) na ausência e presença da ADH. Meio reacional de tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L-1 e EtOH 100 mmol L-1 como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: tecido de carbono (área = 1 cm^2).....71

Figura 39. Curvas representativas das densidades de potências médias dos eletrodos com polimerização simultânea MWCNTs / (poli-VM - poli-PYR) sendo (a) comparação na ausência e presença de ADH em pH 8,9 e (b) comparação entre os pH estudados (7,4 e 8,9). Meio reacional de tampão fosfato, NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}.

(Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....73

Figura 40. Curva de corrente versus tempo medida durante a eletrólise (12h) de etanol (50 mmol) para os bioânodos na ausência e presença da enzima ADH bem como a ausência e presença de MWCNT. Potencial aplicado: 0,6 V. Eletrólito utilizado: tampão fosfato, pH = 8,9. Temperatura = 19º C.....75

Figura 41. Concentração do produto obtido durante a eletrólise (12h) para os sistemas na presença e ausência de MWCNTs. Etanol 50 mmol L^{-1}, pH 8,9, Eap = 0,6 V vs Ag/AgCl.....76

Figura 42. Densidades de potência antes e após a eletrólise de 12h. a) MWCNTs/(VM-PYR), b) MWCNTs/(VM-PYR)/ADH, c) (VM-PYR e d) (VM-PYR)/ADH. Meio reacional de tampão fosfato (pH 8,9), NAD$^+$ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....78

Figura 43. Redução de O_2 pela enzima Lacase imobilizada no biocátodo MWCNT-Ac/Lacase. Meio reacional: Tampão citrato pH 5,0, Eletrodo suporte: Papel de carbono, A = 1cm^2.....79

Figura 44. Densidade de potência da biocélula a combustível completa na ausência de membrana a) bioânodo: (poli-VM-poli-PYR)/ADH, b) bioânodos: MWCNTs (poli-VM-poli-PYR)/ADH. Biocátodo: MWCNTs-Ac/Lacase. Meio reacional de tampão fosfato (pH 6,5), NAD$^+$ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}.Suporte eletródico: tecido de carbono (área = 1cm^2).....81

Figura 45. Gráfico comparativo entre os sistemas mono e bienzimático, na presença de tampão fosfato (pH 7,4), NAD$^+$ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).....105

Figura 46. Curva de corrente versus tempo medida durante a eletrólise (12h) de etanol

(50 mmol) para os bioânodos mono e bienzimático. Potencial aplicado: 0,6 V. Eletrólito utilizado: tampão fosfato, pH = 8,9, Temperatura = 19º C.....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos da literatura de biocélulas a combustível utilizando etanol como combustível.....32

Tabela 2. Atividade enzimática.....53

Tabela 3. Comparação dos valores médios de densidade de potência e PCA para diferentes conformações de bioânodos com a literatura.....60

Tabela 4. Teste de estabilidade dos bioânodos (poli-VM+poli-PYR)/ADH.....65

Tabela 5. Estabilidade dos bioânodos em sistema de operação contínua por 4 horas na ausência e presença da enzima ADH.....68

Tabela 6. Valores médios obtidos do teste de densidade de potência dos diferentes sistemas de bioânodos na ausência e presença de enzima(s) e MWCNTs.....74

Tabela 7. Resultados obtidos das eletrólises (12h) de etanol (50 mmol/L) empregando bioânodos na presença e ausência de MWCNT em pH 8,9 a 0,6V vs Ag/AgCl.....77

Tabela 8. Valores médios de densidade de potência e PCA para diferentes conformações de biocélulas a combustível sem membrana presentes na literatura.....81

Tabela 9. Resultados obtidos das eletrólises (12h) de etanol (50 mmol/L) empregando bioânodos na presença e ausência de MWCNT em pH 8,9 a 0,6V vs Ag/AgCl.....106

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABTS - ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ADH – Álcool Desidrogenase

AldDH – Aldeído Desidrogenase

BFC – Biofuel Cell

BOx – Bilirrubina Oxidase

D.P. – Densidade de potência

GOx – Glicose oxidase

I_f – Corrente final

MEV – Microscopia de varredura

MWCNTs – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

MWCNTs-Ac – Nanotubos de carbono modificados com antraceno

NAD – Dinucleotídeo de nicotidamina adenina

NADH - Dinucleotídeo de nicotidamina adenina reduzido

PCA – Potencial de circuito aberto

PYR - Pirrol

VM – Verde de Metileno

TED - Transferência eletrônica direta

TEM – Transferência eletrônica mediada

VC – Voltametria Cíclica

VM + PYR – polimerização sucessiva dos filmes

(VM-PYR) – polimerização simultânea dos filmes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 Fontes alternativas de energia - Células e Biocélulas a combustível **1**

1.2 Histórico do desenvolvimento das biocélulas a combustível **5**

1.3 Desempenho de biocélulas a combustível **11**

1.4 Enzimas e cofatores **13**

1.5 Imobilização de enzimas **23**

1.6 Polímero condutor **27**

1.7 Nanotubos de carbono **29**

1.8 Histórico das biocélulas empregando etanol como combustível **31**

1.9 Eletroquímica **33**

1.10 Técnicas de caracterização de eletrodos **33**

1.10.1 Voltametria **33**

1.10.2 Cronoamperometria **38**

1.10.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) **39**

2. OBJETIVOS **40**

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL **41**

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS **41**

3.1.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO **41**

3.2 EXPERIMENTAL **45**

3.2.1 POLIMERIZAÇÃO do (poli-VM-poli-PYR) **45**

3.2.2 REVESTIMENTO DE MWCNTs NO SUPORTE ELETRÓDICO **46**

3.2.3 MODIFICAÇÃO DO NAFION® **46**

3.2.4 PREPARAÇÃO DOS BIOELETRODOS: IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA **47**

3.2.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS **50**

3.2.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1} = U\ mg^{-1}$) **51**

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO **52**

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA **52**

4.2 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA DO NADH **54**

4.2.1 FILME POLIVERDE DE METILENO+POLIPIRROL **54**
4.2.2 FILME (POLI-VM-POLI-PYR) **56**
4.3 MICROSCOPIA DO FILME POLIMÉRICO (Poli-VM-Poli-PYR) **57**
4.4 ESTUDOS COMPARATIVOS DE DENSIDADE DE POTÊNCIA ENTRE OS FILMES poli-VM + poli-PYR e (poli-VM-poli-PYR) **59**
4.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO FILME (poli-VM+poliPYR) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA ENZIMA ADH **64**
4.6 ESTUDOS CRONOAMPEROMÉTRICOS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA ADH DO FILME (poli-VM-poli-PYR) **68**
4.7 ESTUDO/INVESTIGAÇÃO DA DENSIDADE DE POTÊNCIA DO FILME (POLI-VM - POLI-PYR)/ADH NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE MWCNTs em pH 7,4 e pH 8,9 ..... **69**
4.8 ELETRÓLISE E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR HPLC **74**
4.9 PREPARO E ANÁLISE DO BIOCÁTODO COM ENZIMA LACASE **79**
4.10 TESTE COM UMA BIOCÉLULA COMPLETA NA AUSÊNCIA DE MEMBRANA (poli-VM-poli-PYR)/ADH/NAD+ /etanol,Lacase/O_2 ..... **80**
5. CONCLUSÕES **83**
6. TRABALHOS FUTUROS **85**
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **86**
8. APÊNDICE **104**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fontes alternativas de energia - Células e Biocélulas a combustível

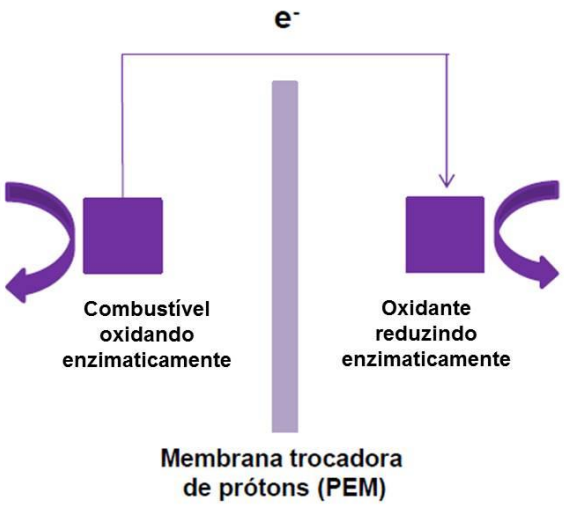
Sabe-se que, questões ambientais e econômicas, principalmente, tem movido a busca contínua por fontes de energias alternativas através da pesquisa e desenvolvimento de processos mais limpos e eficientes para produzir energia [1-2]. Diante dessa situação, novas fontes de energias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas. Destas podemos citar a eólica, biomassa, solar e, a célula a combustível. As células a combustível constituem uma forma limpa, silenciosa e bastante eficiente de geração de energia; trata-se de um dispositivo eletroquímico que transforma energia química, a partir de uma reação entre um combustível e um oxidante, em energia elétrica. As células a combustível tradicionais utilizam como catalisadores de reação, metais nobres como platina, paládio e rutênio entre outros. Apresentam como desvantagem o elevado custo, operação a elevadas temperaturas (80°C ou mais) e funcionamento em condições drásticas (pH fortemente ácidos ou básicos) [1-6].

Alternativamente, tem-se as biocélulas a combustível (BFC) que é um caso particular das células a combustível [7]. Nestas, enzimas ou microrganismos são utilizados como catalisadores no lugar dos catalisadores metálicos convencionais. Assim, a energia química é transformada em energia elétrica por meio de reações que envolvem etapas bioquímicas [2]. Dando atenção mais especificamente às biocélulas enzimáticas, esta classe de dispositivos apresentam várias vantagens: catalisadores renováveis e não poluentes; flexibilidade de combustível; operação a temperaturas mais brandas (20° a 40 °C), possibilidade de aplicação em sistemas in vivo, operação em pH fisiológico, além de seletividade enzimática [1-2]. Isso pode eliminar o uso de membranas separadoras e favorecer a catálise de vários tipos de combustíveis, sem a necessidade de pré-tratamento, uma vez que as enzimas, pela questão da seletividade e especificidade da estrutura, não reagem e/ou não são passivadas pelas

impurezas presentes no analito em questão. Porém, como desvantagem, destaca-se o tempo de vida limitado devido à natureza frágil da enzima e a oxidação parcial do combustível utilizado [8]. As BFC vêm sendo alvo de muitos estudos devido ao seu grande campo de aplicação [1, 7-14].

A Figura 1 mostra um exemplo esquemático de uma biocélula a combustível enzimática primária.

Figura 1: Representação esquemática de uma biocélula a combustível enzimática primária

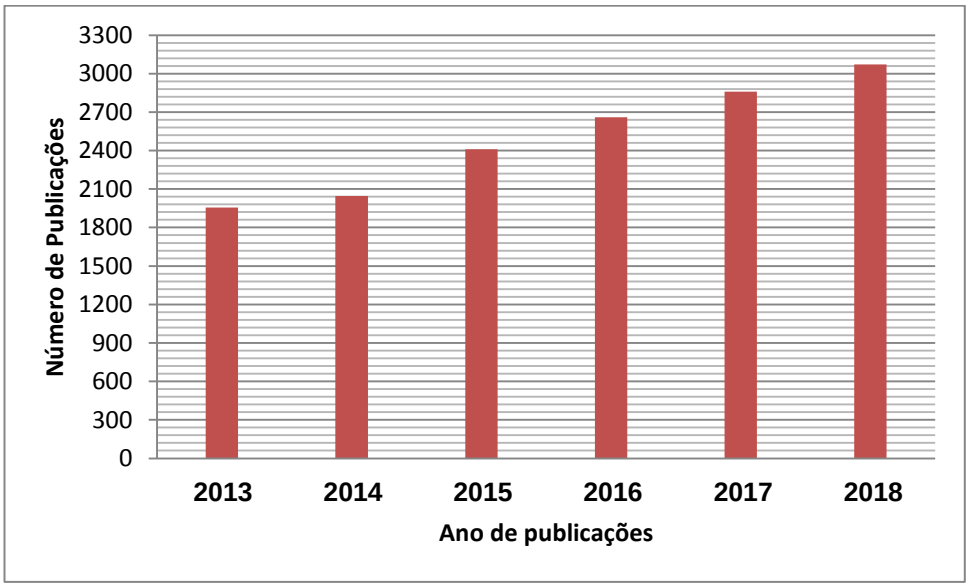


Fonte: Adaptado da ref. [7]

De acordo com a Figura 1 o combustível é oxidado enzimaticamente no ânodo produzindo prótons e elétrons, no cátodo o oxidante (geralmente O_2) reage com os prótons e elétrons gerando água [7]. Como resultado, um circuito externo fornece trabalho elétrico através de um fluxo de elétrons [9].

As biocélulas a combustível (BFCs) têm gerado interesse de pesquisas desde 1964, quando a primeira descrição de uma biocélula a combustível utilizando enzimas isoladas (GOx) na superfície de um eletrodo foi produzida [7]. Aquino-Neto [2] em uma revisão apresenta um quadro crescente do aumento no número de publicações na área até 2012; uma atualização deste tema até os dias atuais confirma o grande interesse dos pesquisadores por este tema ainda (Figura 2).

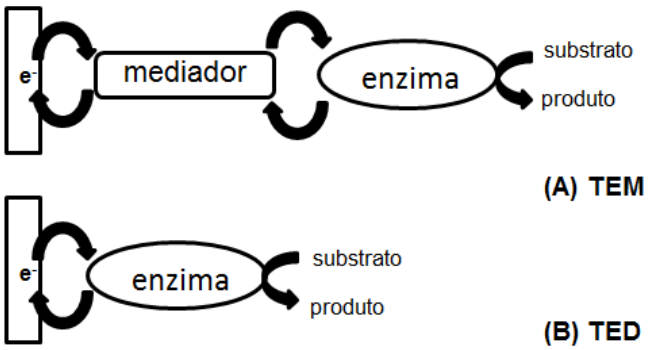
Figura 2: Pesquisa bibliográfica conduzida na base de dados do Science Direct utilizando o termo “biofuel cell”. Fonte: Science Direct [ScienceDirect].



Fonte: Autoria Própria

Um ponto crítico deste sistema é a velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo. Para isso, geralmente, utiliza-se um mediador de elétrons para facilitar essa conexão. A figura 3 mostra os tipos de reações possíveis entre as enzimas e os eletrodos:

Figura 3: Representações esquemáticas dos tipos de reações possíveis entre as enzimas e os eletrodos em uma biocélula a combustível



Fonte: Adaptado da ref. [9]

Segundo o banco de dados da ExplorEnz [15], aproximadamente 1300 enzimas oxirredutases (catalisam reações através de transferência eletrônica) são conhecidas até hoje e podem, possivelmente, ser utilizadas como biocatalisadores em biocélulas a combustível enzimáticas [1-2]. Porém, menos de 10% são capazes de converter diretamente o sinal químico em elétrico, via transferência de carga na presença de espécies redox estáveis; ou seja, transferir elétrons diretamente do seu sítio ativo para a superfície do eletrodo [10-11], como mostra a figura 3B, representando uma transferência eletrônica direta (TED). A Figura 3A mostra outro tipo de transferência de elétrons, a mediada (TEM), no qual os mediadores de elétrons, espécies de baixo peso molecular e atividade redox (compostos orgânicos ou organo-metálicos), têm como função o transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Eles podem permanecer em solução ou imobilizados no eletrodo [1, 9, 14, 16]. Aqui, a enzima catalisa a oxidação ou redução do mediador redox, o qual é regenerado na superfície do eletrodo (assim, há um fluxo constante que espécies oxidadas e reduzidas para ocorrer a reação) e atua como co-substrato para a reação enzimática [8]. A reação que ilustra o processo de transferência mediada é dada por [9]:

$$\text{substrato} + \text{mediador}_{ox} \xrightarrow{\text{enzima}} \text{produto} + \text{mediador}_{red} \qquad (1)$$

$$\text{mediador}_{red} \xrightarrow{\text{anodo}} \text{mediador}_{ox} + e^- \qquad (2)$$

O mediador deve ser estável, não tóxico, biocompatível, solúvel nas formas oxidada e reduzida; reagir rápido com a enzima; possuir menor potencial de redução em relação às outras moléculas interferentes na solução; o potencial redox do mediador deve ser mais positivo quando comparado com o potencial do sítio ativo da enzima para biocatálise oxidativa; e no caso da biocatálise redutiva, esse comportamento deve ser o inverso; não reagir com oxigênio; e sua regeneração deve ser reversível e ocorrer em um sobrepotencial baixo [1, 8, 14]. Seu potencial redox

deve ser o mais próximo possível do par redox das enzimas, já que sua eficiência depende da faixa de potencial redox. Quando o potencial do eletrodo é maior que o potencial redox do mediador, ele oxida na superfície do eletrodo; caso contrário, ele reduz [1].

Apesar da necessidade de outra molécula junto com a enzima para ocorrer o processo TEM, esse processo é preferível ao TED pelo fato de se obter maiores densidades de potência e pela possibilidade de se utilizar enzimas facilmente obtidas comercialmente [1-2].

Embora a primeira produção de energia ter sido realizada no século XIX, a ideia sobre biocélulas a combustível foi consolidada bem depois, e desde então muitos trabalhos importantes vem surgindo na literatura e alguns serão descritos no item 1.2 a seguir.

1.2 Histórico do desenvolvimento das biocélulas a combustível

Bullen, R.A *et al* [14] relembra que a conexão entre biologia e eletricidade já é uma história antiga, conhecida desde a década de 1780, quando Galvani descobriu que a corrente elétrica poderia causar uma contração na perna de uma rã, causando um rápido desenvolvimento na compreensão do sistema nervoso e fazendo outros cientistas, como Volta, a se interessarem por esse tema [14,16]. A célula a combustível também é conhecida há bastante tempo desde que Grove, em 1839 produziu água e corrente elétrica, sendo o pioneiro no desenvolvimento desses dispositivos. Apesar disso, a primeira biocélula microbiana só foi demonstrada em 1910, quando M.C. Potter observou a produção de eletricidade pela E. Coli [17]. Já as biocélulas enzimáticas só começaram a aparecer em 1960, com o trabalho pioneiro de Yahiro *et al.* [18], onde construíram três semi-biocélulas diferentes usando, no bioânodo, glicose oxidase, aminoácido oxidase e álcool desidrogenase com o cátodo de platina em contato direto com o ar, para posterior comparação entre os sistemas.

Enquanto a desidrogenase não mostrou um PCA positivo, as oxidases apresentaram um PCA positivo (175-350 mV). Apesar de um valor baixo, eles conseguiram provar que uma enzima poderia sim catalisar uma reação de biocélula a combustível [19].

Durante muito tempo, a glicose foi o combustível padrão, motivada pela possibilidade de aplicação in vivo como bateria para marca-passo [1], com o primeiro trabalho utilizando glicose citado anteriormente [18]. Hoje já existem inúmeros trabalhos com vários outros combustíveis.

O processo de transferência eletrônica direta (TED) surgiu no final da década de 70 [2] com a imobilização de citocromo c9 em eletrodos de óxido de índio [20]. Esse mecanismo despertou um maior interesse a partir do final dos anos 80, tendo vários trabalhos com diferentes enzimas atuando diretamente, sem mediação de nenhuma molécula [11]. O ressurgimento das biocélulas ocorreu a partir de 1980 [2], sendo o foco de alguns trabalhos, a oxidação do metanol pela enzima ADH e etosulfato de fenazina como mediador. Foi obtido um PCA de 0,300 V e uma densidade de potência máxima de 30 μA cm^{-2} em um trabalho de 1981, de Plotkin, E.V. *et al* [21]. Dois anos mais tarde, outro mediador foi apresentado, N, N, N ', N'-tetrametil-4-fenilenodiamina (TMPD) e obteve-se uma densidade de potência máxima de 20 μA cm^{-2} [22]

É bom lembrar que a maioria dos trabalhos investigam a oxidação de diversos combustíveis no ânodo, só em 1984 que o conceito de utilizar enzima no cátodo de uma biocélula foi discutido, e ainda sim, a bioeletrocatálise não foi direta. Em vez disso, primeiro um eletrodo de ouro produziu peróxido de oxigênio e, em seguida, o peróxido foi consumido pela enzima cloroperoxidase [23]. Este trabalho pioneiro foi importante para expandir a utilização de enzimas tanto no ânodo quanto no cátodo.

A partir da década seguinte, alguns estudos focaram na imobilização das enzimas [24-28]. Nos anos 90, Palmore *et al.* [29] fizeram uma grande contribuição para o campo das biocélulas onde apresentaram uma cascata enzimática com três enzimas (ADH, formaldeído desidrogenase, e formato desidrogenase) para oxidação

completa do metanol, obtendo um PCA de 0,8 V, e D.P. de 0,67 mW cm^{-2}. Em 1998, outro grande avanço veio de Willner e Katz [30], que construíram uma biocélula sem membrana, com uma monocamada de PQQ como bioânodo e microperoxidase-11 como biocátodo, ambos em eletrodos de Au. O dispositivo apresentou uma densidade de potência de 8 μW cm^{-2} e um PCA de 0,320 V. Em 1999, Palmore e Kim [31] utilizaram a enzima lacase no cátodo, com TEM utilizando o ABTS, obtendo-se um PCA de 0,53 V e uma DP de 42 μW cm^{-2}.

Nos últimos 18 anos, os nanomateriais começaram a ser muito utilizados na construção dos bioeletrodos, indo desde nanotubos de carbono até nanopartículas de ouro; servindo tanto para aumentar a área superficial dos eletrodos, como também para diminuir o sobrepotencial para a oxidação de NADH, e até melhorar a bioeletrocatálise direta de várias enzimas [26-27, 32-37].

Em 2001, começam a aparecer pesquisas para microdispositivos implantáveis. Chen *et al.* [38] construíram uma biocélula de glicose/O_2 composta de bioeletrodos com 7 μm de diâmetro, sendo a GOx com polímero de ósmio como bioânodo e a lacase como biocátodo. A potência obtida foi de 600 nW.

A melhoria genética de enzimas, com o intuito de aumentar as taxas de oxidação do combustível, é um tipo de pesquisa interessante em biocélulas. Em 2002, Halliwell *et al.* [39] obtiveram resultados satisfatórios em potenciais para uso em biosensores e biocélulas utilizando como ânodo uma lactato desidrogenase mutante imobilizada com poli(anilina)poli(vinilsulfonato). Já em 2003, Katz e Willner [40] elaboraram a primeira biocélula com sistema de interruptor, empregando GOx e citocromo oxidase no bioânodo e no biocátodo, respectivamente [2]. Eles utilizaram uma matriz híbrida de Cu^{+2}/Cu^{0} com ácido-poliacrílico, permitindo que o desempenho da biocélula fosse reversível, alternando entre os estados “ON” e “OFF”da biocélula.

Apesar de todos os trabalhos citados até aqui terem utilizado açúcares e álcoois como combustíveis, desde muito tempo o hidrogênio é o combustível padrão em estudos de célula a combustível [2]. Inclusive, há importantes trabalhos na

literatura que utilizam enzimas hidrogenases para gerar energia através de hidrogênio. Vincent Kylie *et al* [41] demonstraram um teste de tolerância ao O_2 para um catalisador biológico de hidrogênio. Conseguiram oxidar traços de H_2 do ar através de uma hidrogenase no ânodo e uma Lacase no cátodo. Alguns trabalhos mostram bons resultados na oxidação de hidrogênio envolvendo enzimas Lacase e bilirrubina oxidase sem mediador. Porém traços de oxigênio podem inativar as enzimas hidrogenases, dificultando o processo [42].

Segundo Aquino-Neto [2], mais recentemente, o foco tem sido na utilização de álcoois nas biocélulas, como etanol/O_2. Muitos avanços têm sido obtidos com esse sistema, mas alguns obstáculos como eficiência e estabilidade ainda permanecem [43-45]. Um exemplo desse sistema está no trabalho de Sokic-Lazic e Minteer [46], de 2008, que simularam o ciclo do ácido cítrico na superfície de um bioeletrodo, conseguindo obter a oxidação completa do etanol a CO_2. Isso através da imobilização de uma cascata enzimática com enzimas desidrogenases, onde se observou um aumento na densidade de potência de acordo com o número de enzimas adicionadas. Outro trabalho de simulação de ciclo bioquímico foi apresentado pelo mesmo grupo, dessa vez para a oxidação completa do piruvato [47]. Logo depois mais trabalhos foram feitos com esse foco de oxidação completa do combustível, como o lactato e a glicose [48-49]

Em 2009, a empresa Sony® [50] apresentou a primeira biocélula glicose/O_2 em forma de um protótipo de biobateria para ser utilizada em dispositivos portáteis de baixa demanda energética. Neste, o ânodo era composto pela enzima GOx e o cátodo pela BOx com TEM utilizando uma MTP, obtendo-se um PCA de 0,8 V e uma DP de 1,45 ± 0,24 mW cm^{-2}.

Avanços nos dispositivos implantáveis também tiveram espaço na literatura. Em 2010, Cinquin Philippe *et al.* [51] propuseram uma biocélula implantável em ratos. Segundo eles, as biocélulas a combustível de glicose já existentes não podem ser implantadas em animais, porque as enzimas utilizadas requerem operação em baixo

pH ou são inibidas por ânions cloreto ou urato, presentes no fluido extra celular. No trabalho, desenvolveram discos de grafite contendo glicose oxidase e ubiquinona no ânodo e polifenol oxidase (PPO) e quinona no cátodo, obtendo um pico um PCA de 0,275 V e uma potência máxima de 6,5 μW (produzindo uma potência específica máxima de 24,4 mW mL^{-1}).

Em 2012, Lenka Halámková *et al.* [52] desenvolveram uma biocélula a combustível que operava continuamente em um caracol, produzindo energia elétrica durante um longo período de tempo usando glicose produzida fisiologicamente como combustível. A densidade de potência obtida foi de 30 μW cm^{-2}.

Além de artigos sobre dispositivos construídos, muitos trabalhos importantes de revisão sobre o tema são encontrados na literatura como o de Barton *et al.* [8], 2004, revisando sobre métodos de imobilização, aplicações, diferenças entres biocélulas e biosensores, estrutura de eletrodos, além de enfatizar os processos de transferência eletrônica mediada. Em 2006, Bullen *et al.* [14] revisam os trabalhos publicados entre 1994 e 2006, focando em densidade de potência, PCA e condições das biocélulas desenvolvidas tanto microbiológicas quanto enzimáticas, apresentando também possíveis direcionamentos futuros para a pesquisa no assunto. Em 2007, Minteer *et al.* [53] destacam os aspectos práticos de aplicação em biocélulas enzimáticas (estabilidade e tempo de vida), e perspectivas futuras para o desenvolvimento e avanços deste dispositivo. Cooney e Minteer [17] revisaram, em 2008, as vantagens e desvantagens dos processos de transferência eletrônica em biocélulas enzimáticas, comparação de diferentes técnicas de imobilização de enzimas, além dos aspectos associados à configuração dos eletrodos e técnicas de caracterização dos mesmos. Aquino-Neto e Andrade, em 2013, fizeram uma revisão geral sobre biocélulas a combustível enzimáticas [1]. Mais recentemente, em 2016, Babadi, A.A*., et al.* [54], revisaram o progresso de biocélulas a biocombustível implantáveis através da funcionalização de nanotubo de carbono para melhoria da imobilização enzimática. Em 2018, Zebda A., et al. [55] dão destaque aos desafios e problemáticas para o

sucesso de biocélulas a combustíveis implantáveis, aos aspectos que impactam e limitam esses sistemas que operam dentro de um corpo vivo. Ainda nesse ano, Cosnier, S., *et al* [56] após uma breve comparação de biocélulas a combustível enzimáticas e microbianas, discutem vários desenvolvimentos importantes e aplicações de biocélulas a combustível enzimáticas.

Em 2010, Ivanov *et al* [57] focaram sua discussão nas metodologias de preparo de bioeletrodos, além de modelagem, design do sistema, e o que ainda limita a aplicação desta técnica (baixas densidades de corrente e voltagem, estabilidade). Em 2011, Osman *et al.* [58] apresentaram progressos obtidos no desenvolvimento desses dispositivos, assim como princípios de operação e aplicação dos mesmos, novos materiais eletródicos (incluindo os nanoestruturados), métodos de imobilização, e características da engenharia de construção de biocélulas. Ainda em 2011, Opallo *et al.* [59] focaram na reação de redução de oxigênio apresentando os mais recentes aspectos no desenvolvimento de bioeletrodos nanoestruturados. No início de 2012 Yang *et al.* [60] revisaram sobre imobilização da enzima na superfície do eletrodo; e Falk *et al.* [61] discutiram o processo de TED em biocélulas enzimáticas. Ainda em 2012, Meredith and Minteer [62] abordam os conceitos fundamentais da operação de uma biocélula a combustível, bem como os avanços nas transferências eletrônicas mediada e direta, desenvolvidas para criar dispositivos bioelétricos que podem produzir potência significativa e permanecer estáveis por longos períodos.

Em 2013, Wu, X.E. *et al* [63], fabricaram células biocombustíveis enzimáticas flexíveis e descartáveis utilizando papel de filtro e compósito de celulose e nanotubo de carbono, com biocátodo contendo a enzima bilirrubina oxidase e bioânodo com frutose desidrogenase, onde conseguiram aumentar a potência colocando biocélulas em série. Em 2015, Desmaele D. *et al* [64], construíram um sensor sem fio alimentado por uma flexível biocélula a combustível glicose/O_2 sem membrana empilhadas, com glicose oxidase e lacase, em uma arquitetura 3D e sistema de fluxo contínuo, a qual foi capaz de fornecer energia elétrica a um sensor sem fio enviando medições de

temperatura para um computador remoto.

Em um trabalho interessante de 2018, Ichi-Ribault *et al*., [65] construíram uma biocélula a combustível conectada a um sistema de transmissão sem fio e implantaram em um coelho a fim de monitorar sua função in vivo por 2 meses. Eles obtiveram 16 mW mL^{-1} continuamente a cada 30 minutos de descarga por dia durante 16 dias.

Como foi dito através da apresentação dos trabalhos na literatura, as biocélulas a combustível enzimáticas proporcionam meios de se obter energia de maneira mais limpa e renovável e tem despertado cada vez mais interesse no meio científico e tecnológico, apresentando vários avanços já obtidos e características promissoras para futuras aplicações. Apesar disso, muitos desafios ainda persistem e precisam ser contornados. Por isso que até hoje existem muitos estudos em relação ao tempo de vida, estabilidade e aprimoramento de técnicas de imobilização das enzimas, como obter uma maior densidade de potência e como facilitar a transferência eletrônica entre enzimas e eletrodos.

1.3 Desempenho de biocélulas a combustível

Um dos parâmetros mais importantes em um processo eletroquímico é o potencial total da célula (E_{cel}) na equação 1: [14, 66-68]

$$E_{cel} = E_c – E_a - \Sigma IR_e \quad (1)$$

Onde: E_c e E_a = potenciais do cátodo e do ânodo, respectivamente;

I = corrente obtida pelo sistema

R_e = resistências encontradas no sistema em questão

Para um melhor desempenho da biocélula a combustível é sempre necessário maximizar o PCA (potencial de circuito aberto), ou seja, a diferença entre os potenciais do cátodo e do ânodo (Ec – Ea, chamada janela de potencial), e minimizar todas as resistências envolvidas no sistema (como diminuir ao máximo possível a distância

entre os eletrodos ou trabalhar em baixas densidades de corrente), seja em relação aos eletrodos, às conexões ou eletrólito [14, 66-68]. Por isso, Aquino-Neto [2] descreve que as pesquisas na área de biocélulas enzimáticas visam otimizar os bioeletrodos do dispositivo para facilitar a reação catalítica, aumentar o PCA, buscando protótipos que diminuam ao máximo possível as resistências de cada sistema, melhorando a passagem de corrente elétrica.

Outro parâmetro fundamental de avaliação de desempenho e eficiência para qualquer tipo de célula combustível é a potência (P) gerada pelo sistema [2], determinada pela seguinte relação (2):

$$P_{cel} = E_{cel} \int I \, dt \quad (2)$$

Caso a corrente seja constante: $P_{cel} = E_{cel} \, . \, I$ (3)

Para a aplicação desses sistemas, é importante considerar o tamanho do dispositivo. Pois não adianta comparar dispositivos com áreas diferentes; apesar de haver outros fatores que afetam, com uma área maior geralmente se obtém uma potência maior. Então com a finalidade de padronizar esse parâmetro de acordo com a área (A) do bioeletrodo empregado, utiliza-se a densidade de potência [15] (4):

$$\mathrm{DP} = \frac{Pcel}{A} \quad (4)$$

Na qual a corrente (*I*) produzida pelo sistema de uma biocélula, reflete a quantidade de elétrons gerados na catálise enzimática, além dos processos de transporte [2]. Lembrando que esse parâmetro não depende só da área da superfície, mas também é afetada pela morfologia do eletrodo, estrutura e espessura das enzimas adsorvidas, distância entre os eletrodos e pelos processos de transporte de massa e carga [56]. A densidade de potência deve ser associada à potência real gerada pelo sistema, a fim de determinar quais as aplicações podem realmente ser consideradas [56].

1.4 Enzimas e cofatores

Associada à escolha do método de transferência eletrônica, outro parâmetro de grande importância é a escolha do par enzima/cofator que será estudado, de acordo com o substrato a ser oxidado ou reduzido. Lehninger [69] traz que em 1850, Louis Pasteur chegou à conclusão de que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”, e que estes eram inseparáveis da estrutura das células vivas de levedura. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedura podiam fermentar o açúcar até álcool, provando que elas funcionavam mesmo fora das células. Frederick W. Kuhne denominou tais moléculas de enzimas. Uma quebra de paradigma veio com o isolamento e cristalização da urease, em 1926, por James Sumner, que propiciou um grande avanço nos estudos das enzimas. Ele demonstrou que esses cristais consistiam inteiramente de proteína, postulando que essas moléculas de fato, eram proteínas. [69]

A partir daí, as enzimas foram definidas como polipeptídios que catalisam uma determinada reação com certo grau de especificidade. Deste modo, todas as enzimas são proteínas (com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que possuem propriedades catalíticas) e, sua funcionalidade depende diretamente da integridade da sua conformação proteica nativa (estrutura primária – sequência de aminoácidos). E não apenas essa, mas as outras estruturas, secundária (maneira pela qual esses aminoácidos da estrutura primária estão em uma determinada conformação), terciária (interações das cadeias laterais de aminoácidos) e quaternária (natureza do arranjo das subunidades proteicas) também são fatores determinantes para o papel da enzima (função que ela irá desempenhar). Apesar das centenas dos resíduos de aminoácidos que compõem as enzimas, apenas parte deles está envolvido diretamente na catálise e no mecanismo cinético, mais precisamente os que estão no sítio ativo da enzima que vão participar da ligação enzima-substrato [2, 69]. O restante dos aminoácidos está diretamente ligado à distribuição espacial das enzimas,

que determina a entrada/saída de substrato/produto além de coenzimas que participam do processo catalítico, segundo Aquino-Neto [2]. O tamanho molecular das enzimas (em unidades de Daltons – Da) pode variar bastante, porém a grande maioria delas se encontra entre 30 a 50 kDa. [2].

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que elas catalisam [69]:

→Oxirredutases: reações com transferência de elétrons;

→Transferases: reações com transferência de grupo;

→Hidrolases: reações de hidrólise;

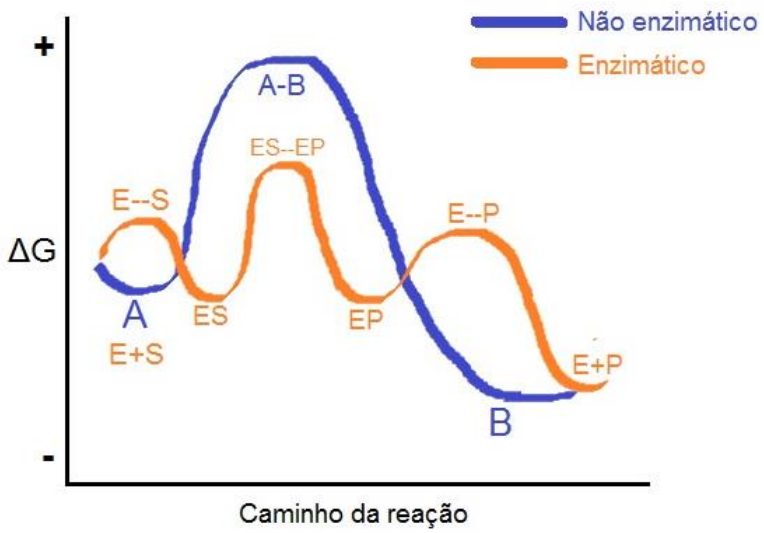
→Liases: reações de quebra de duplas ligações;

→Isomerases: reações de isomerização;

→Ligases: reações de formação de ligações.

A catálise enzimática é baseada na catálise tradicional de reações químicas, ou seja, a presença do catalisador faz um processo lento ser acelerado sem que esse "agente acelerador" seja consumido durante a reação. A figura 4 ilustra o processo catalítico enzimático e se baseia no fato de que a enzima oferece uma rota alternativa de reação, proporcionando um ambiente adequado com uma menor energia de ativação; ou seja, diminui a barreira energética que dificulta a ocorrência de uma determinada reação. Com isso, as enzimas afetam a velocidade da reação e não seu equilíbrio [69].

Figura 4: Diagrama do processo catalítico enzimático e não enzimático. A = reagente; B = produto; E = enzima; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; EP = complexo enzima-produto.



Fonte: Adaptado de [69]

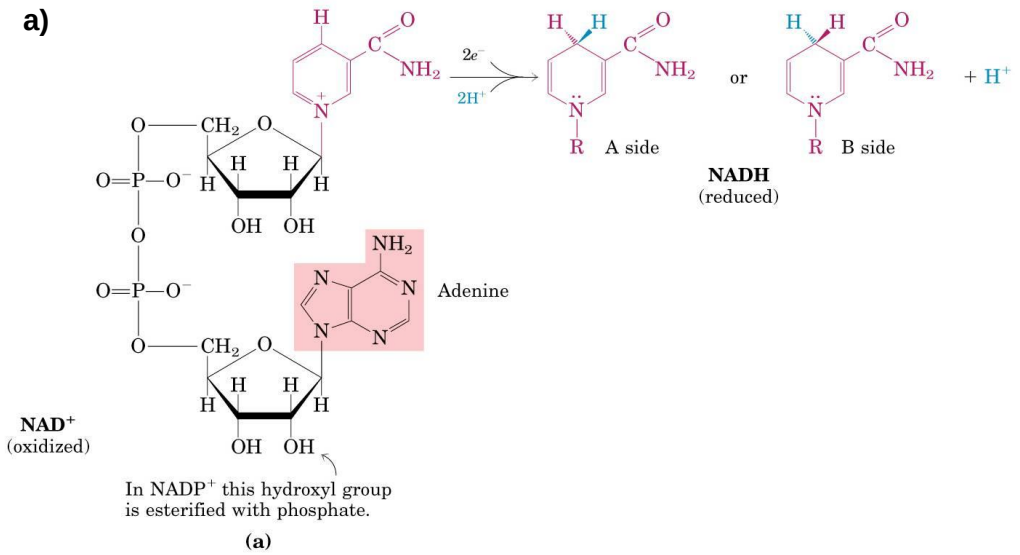
A atividade enzimática é descrita em Unidades (U), onde 1 U corresponde à 1 µmol de substrato convertido à produto por minuto por miligrama (mg) de enzima (atividade específica) [69-70].

Toda reação química é influenciada pelo meio reacional. Com enzimas não é diferente. Em relação à temperatura, a faixa ideal da maioria das enzimas é entre 20 - 50 ºC, ainda que muitas mantenham sua estrutura mesmo em elevadas temperaturas (acima de 100 ºC) [71]. Já o efeito do pH do meio é característico de cada biomolécula e substrato por estar relacionado à ionização reversível do substrato ou da enzima [2, 70].

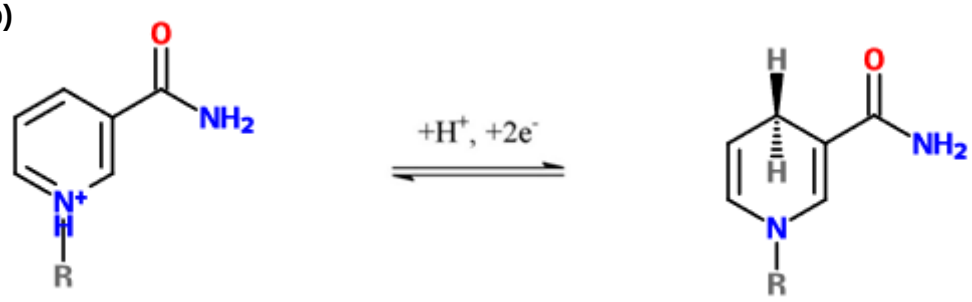
Apesar da associação com o substrato, formando um complexo enzima-substrato durante a reação, muitas enzimas trabalham em associação com espécies chamadas de cofatores, os quais não estão ligados permanentemente à enzima, mas, sem eles, a enzima torna-se inativa. Esses cofatores podem ser íons metálicos tais

como Cu^{2+}, Fe^{3+} ou Zn^{2+}, ou moléculas orgânicas, as coenzimas, que se ligam, covalentemente ou ionicamente, ao sítio ativo da enzima promovendo a reação [69]. Dentro desta classe de compostos, um dos mais conhecidos é o NAD^+ [7-8, 69] (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo), molécula formada por dois nucleotídeos, contendo a base nitrogenada adenina e uma molécula de nicotinamida, unidos por uma ligação fosfoanidrido, conforme mostra a figura 5A. A oxidação do substrato (desidrogenação) liberam dois hidrogênios, um é transferido para o cofator (na forma de hidreto), reduzindo a molécula à NADH, enquanto o outro é liberado na solução [69]. Portanto, trata-se de um composto que funciona recebendo átomos de hidrogênios, atuando nas transferências de hidretos conforme mostra em uma melhor visualização a figura 5B, os quais, dependendo da etapa do metabolismo envolvida, são posteriormente transferidos a outras substâncias e compostos, em reações que liberam energia (como na respiração celular e no ciclo de Krebs por exemplo) [69]. Além das coenzimas, alguns cofatores são temporariamente associados à enzima, e, portanto também funcionam como co-substratos.

Figura 5: a) Estrutura no NAD^+ e b) Esquema reacional da oxirredução do cofator NAD^+.



b)



NAD^+ **NADH**

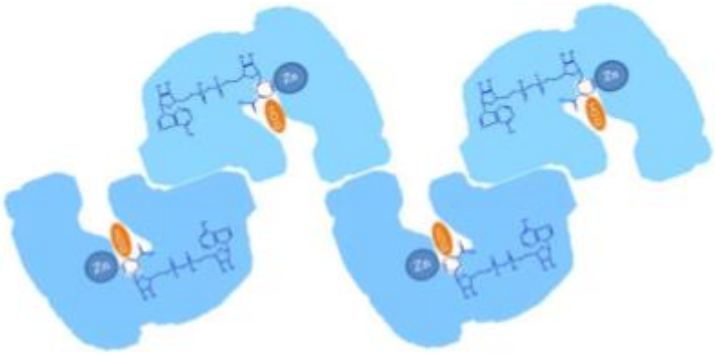
Fonte: a) Ref [69] e b) Autoria Própria

Vários pesquisadores se interessaram em estudar a estrutura e catálise da enzima ADH [71-76]. Através da cristalografia por dispersão de raio-x, os pesquisadores concluíram que a enzima álcool desidrogenase (ADH), obtida a partir de levedura Saccharomyces cerevisiae e utilizada neste trabalho, é um tetrâmero compostos por 4 subunidades idênticas (peso molecular de 36 KDa) constituída de dois dímeros, o sítio catalítico (bastante acessível à solução) e o sítio de ligação do cofator NAD^+ (estreito, enterrado na estrutura), além de ter um átomo de zinco que é essencial na reação de oxidação do substrato, pois estabiliza o íon alcoolato para a etapa de transferência de hidreto entre o álcool e o cofator oxidado, quando a enzima se liga a eles; conforme mostrado na reação redox abaixo [2,71-76]:

$$CH_3{-}CH_2{-}OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3{-}CHO + NADH + H^+$$

A estrutura da enzima está apresentada na figura 6.

Figura 6: Figura representativa da estrutura da enzima ADH obtida por cristalografia de raios X



Fonte: ref. [2]

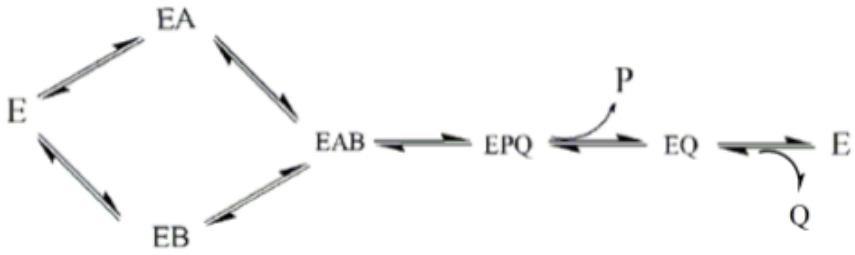
Em sistemas empregando BFCs, alimentar um ânodo constantemente com um combustível líquido, sem a presença de um reformador (empregando o combustível diretamente), é ideal para aplicação em pequenos dispositivos (telefone, celulares, computadores, etc). Sendo assim, há combustíveis que podem ser, em princípio, completamente oxidados pela enzima como o metanol (MeOH) e etanol (EtOH). O grande inconveniente da utilização do MeOH é devido a sua alta toxicidade tanto para ingestão e inalação como para o manuseio [77]. Por conta disso, sua substituição pelo etanol tem despertado interesse, inclusive deste trabalho cujo combustível utilizado foi o etanol.

Além da especificidade restrita da enzima ADH a essa classe de alcoóis (primários e secundários), Eys [75] traz que há três fatores principais que governam a efetividade da formação do complexo enzima-substrato: dimensão molecular do substrato (tamanho da molécula), caráter nucleofílico e orientação do álcool.

O mecanismo, apresentado na figura 7 e descrito por Aquino-Neto [2] e Trivic, S. *et al* [76] mostra que o cofator oxidado, NAD^+, se liga à enzima (EA) antes do combustível - etanol (EB) - para depois formar um complexo ternário desses elementos (EAB) e assim, forma o complexo EPQ após uma reação intramolecular,

com o cofator reduzido NADH; cuja dissociação do complexo EQ é a etapa determinante da reação (é mais lenta quando comparada com a dissociação da espécie NAD^+ do complexo EA). A regeneração do complexo EQ é acompanhada por uma competição direta entre os cofatores oxidado e reduzido pelo sítio ativo da enzima.

Figura 7: Esquema do mecanismo de ação da enzima ADH na catálise de oxidação do etanol. (E = ADH, A = NAD+, B = etanol, P = acetaldeído, Q = NADH)



Fonte: ref. [2, 76]

Devido às enzimas álcool dehidrogenases serem NAD^+ dependentes e a oxidação de NADH ocorrer em altos sobrepotenciais (sendo o potencial redox formal de - 0,52 vs ECS , mas com uma sobretensão cerca de 1 V em eletrodos de carbono vítreo e ainda maior em superfícies de platina) [1, 17, 78], torna-se necessário o uso de um composto capaz de fazer essa transferência de elétrons em um potencial mais baixo (~0,1/0,2V) gastando menos energia. Nesse caso, dentre alguns compostos está o polímero de verde de metileno (poli-VM) [79-80] que atua como mediador para catalisar a transferência eletrônica para NAD^+ e, posterior, transferência de elétrons do NADH para a superfície eletródica. Esse eletrocatalisador, também chamado de mediador de NADH, já é bastante conhecido e vem sendo muito utilizado em outros trabalhos da literatura para este fim. [1, 12, 43-44, 47, 78-83].

Dentre as enzimas que reduzem o oxigênio molecular no cátodo de biocélulas a combustível, as mais estudadas são as pertencentes à família das multicobre

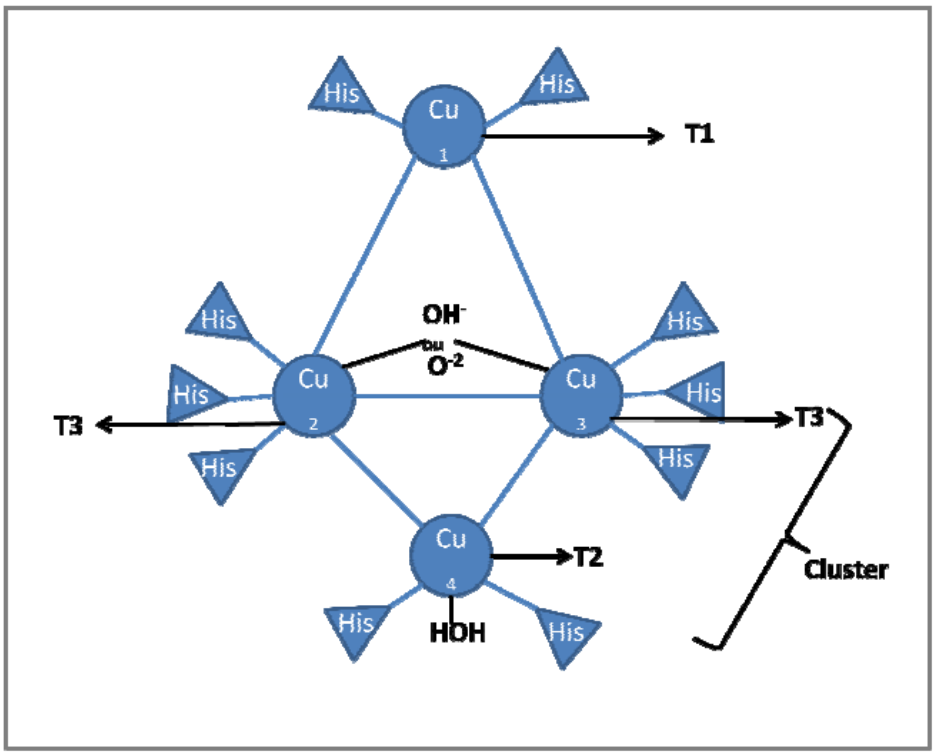
oxidases. Cardoso, F., [84] e colaboradores [85] descrevem que a enzima Lacase é uma polifenol oxidase (EC 1.10.3.2), ou multicobre oxidase, que contém átomos de cobre em seu centro catalítico, cada um com uma função, os quais são diferenciados de acordo com suas propriedades espectrofotométricas: o cobre tipo 1 (T1) possui banda de absorção no UV em 600 nm e confere coloração azul para a enzima, o tipo 2 (T2) apresenta baixa absorção na luz visível, e o tipo 3 (T3) contém um par de íons cobre [86]. Yoshida demonstrou esta enzima pela primeira vez em 1883 (originada de uma arvore japonesa *Rhus vernicifera),* mas só dois anos mais tarde que ela foi caracterizada como uma oxidase [87]. Podem ser encontradas tanto em fungos (mais comum) como também em plantas, bactérias e insetos [87-91]. Possuem uma massa molar que varia entre 50 e 130 kDa [91] e conseguem catalisar, através da capacidade redox dos íons cobre na sua estrutura, a oxidação de vários compostos simultaneamente com a redução do oxigênio à água, tendo uma maior atividade, normalmente, em pH mais ácido. Em relação à catálise, o cobre T1, como aceptor de elétrons, oxida o substrato e transfere os elétrons para os outros dois sítios formando um cluster trinuclear que reduz o oxigênio molecular à água, [84,90] como pode ser visto nas figuras 8 e 9.

Figura 8. Representação da Lacase mostrando os átomos de Cu como esferas coloridas, sendo o sítio T1 em azul e o par T2 e T3 em amarelo

.

Fonte: ref. [87]

Figura 9. Esquema representativo dos sítios catalíticos da enzima Lacase



Fonte: ref. [84]

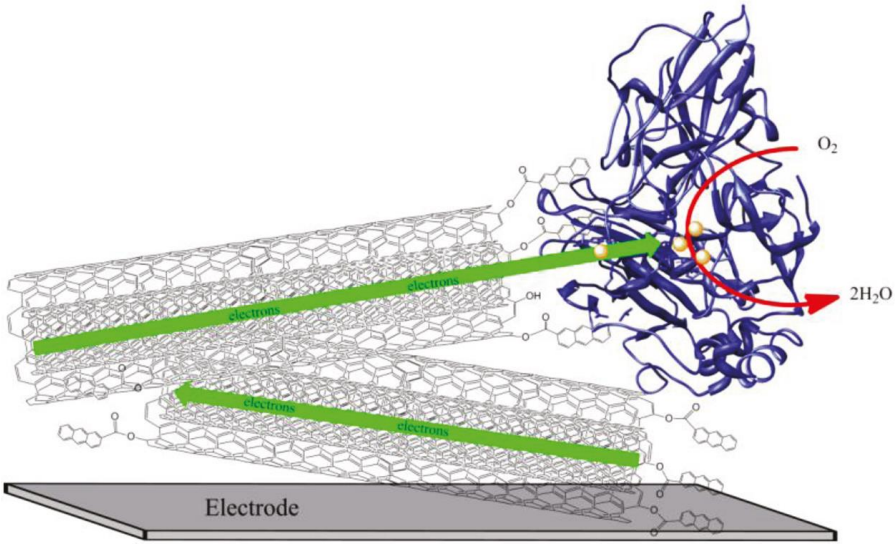
Segundo Cardoso, F. [84], à medida que o substrato vai sendo oxidado pela enzima, os átomos de cobre que estão no estado de oxidação +2 vão reduzindo e se reorganizando dentro da própria molécula através da transferência de elétrons, de forma que o sitio ativo 1 fique sempre na forma reduzida e pronto para oxidar o substrato recebido. Isso ocorre até que todos os átomos estejam reduzidos, e por fim, ocorre a re-oxidacao da enzima, resultando na concomitante redução do oxigênio, envolvendo 4 elétrons no total.

Diferentemente de outras enzimas (inclusive a citada anteriormente), a Lacase não necessita de um cofator para funcionar, já que utiliza o oxigênio molecular do ambiente como co-substrato, diminuindo o seu custo de produção [92]. Entretanto, devido ao tamanho (grande) da enzima ou ao elevado potencial redox do susbtrato, pode-se tornar necessário o uso de mediadores para facilitar a conexão entre enzima e substrato (assim como no caso do NADH já citado anteriormente). No caso da

Lacase, o primeiro mediador é o ABTS [84, 90].

O funcionamento da Lacase imobilizada no biocátodo se dá pelos grupos aromáticos hidrofóbicos do antraceno do MWCNTs modificado. Ele se liga de maneira não covalente e direciona a enzima para ficar na posição ideal para ocorrer a transferência eletrônica direta (TED), fazendo com que os sítios ativos da enzima fiquem mais próximos da superfície condutora. De acordo com Meredith, M.T. *et al* [93], a presença de porções aromáticas nas superfícies dos eletrodos imita os substratos fenólicos naturais da Lacase, criando locais de ancoragem para a bolsa hidrofóbica que circunda seus locais ativos. Um esquema proposto para a forma como os grupos antraceno dirigem a orientação da enzima Lacase é mostrado na Figura 10, com a bolsa hidrofóbica em torno do sítio ativo T1 da enzima orientada próximo aos grupos antraceno nos MWCNTs.

Figura 10. Funcionamento do MWCNTs-Ac sobre a Lacase



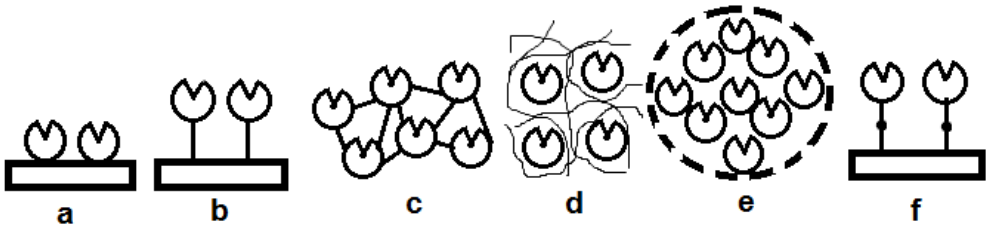
Fonte: ref. [93]

1.5 Imobilização de enzimas

Além do processo de transferência eletrônica, outro ponto que merece destaque nos sistemas BFCs é a imobilização das enzimas na superfície do eletrodo. Essa é uma etapa bastante importante, e muito estudada, pois influencia diretamente na eficiência do bioeletrodo preparado, no tempo de vida da enzima imobilizada e, consequentemente, de certo modo, na estabilidade do sistema. Uma das maiores vantagens da imobilização enzimática é o aumento do tempo de vida da enzima quando esta é comparada com a enzima livre em solução e o fato de poderem ser reutilizadas e usar uma quantidade menor. Porém é muito importante a escolha de um método de imobilização que previna ou diminua a perda da atividade enzimática, especificidade e produtividade da enzima [2, 68, 94-97].

Existem vários métodos de imobilização enzimática (conforme apresentado na Figura 11), os quais podem ser descritos como adsorção (união entre a molécula enzimática e um suporte inerte através de atrações eletrostáticas), ligação covalente (a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes entre os resíduos de aminoácidos da enzima e os grupos reativos do suporte), encapsulamento (enzima imobilizada no interior de esferas que constitui um polímero geliforme e semipermeável), ligação cruzada (as biomoléculas ficam ligadas entre si sem a necessidade de um suporte, formando agregados), aprisionamento (moléculas de enzimas ficam presas entre as malhas de um polímero geliforme) e afinidade. [94-97]

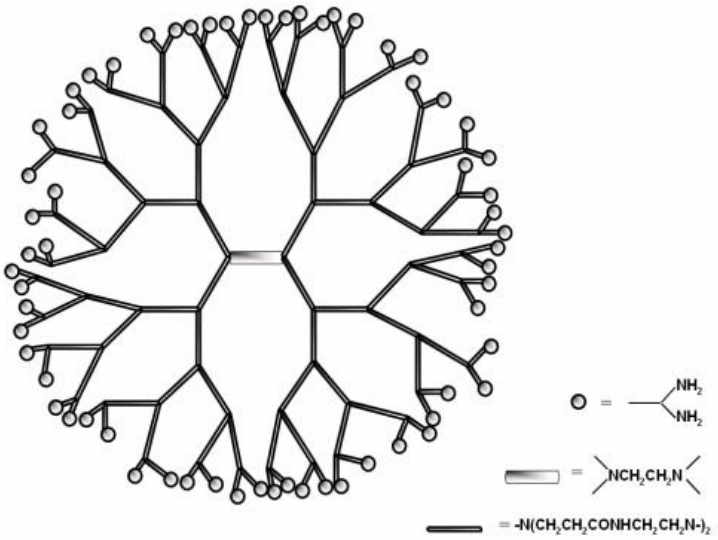
Figura 11: Esquema dos principais métodos de imobilização enzimática. (a) adsorção direta, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) aprisionamento, (e) encapsulamento e (f) afinidade química e/ou física.



Fonte: Adaptado da ref. [98]

Para aproveitar os elétrons gerados em um sistema enzimático a enzima precisa ser imobilizada na superfície do eletrodo para poder catalisar a reação de modo mais eficiente e viável. Para isso, utiliza-se agentes ancorantes, como alguns polímeros, por exemplo, que irão ajudar nessa imobilização, a "segurar" a enzima na superfície do eletrodo. Os polímeros são macromoléculas formadas por uma grande quantidade de unidades repetitivas, denominadas meros ou monômeros que se juntam para formar longas cadeias poliméricas [99]. Dentro deste contexto, há vários compostos poliméricos que se destacam por sua boa atuação como matriz ancorante de diversos tipos de enzimas onde podemos citar os dendrímeros, "*moléculas construídas através de crescimento radial de camadas, de forma repetitiva, a partir de um núcleo polifuncionalizado, sendo o número de unidades de monômeros incorporado a cada camada sucessivamente dobrado ou triplicado em relação ao do ciclo anterior*" [100]. Isso resulta em uma estrutura final altamente ramificada e com um grande número de grupamentos funcionais na superfície, promovendo uma estrutura bem definida e versatilidade química para esse polímero. Atualmente, um dendrímero que merece destaque, pelo grande número de aplicações [81-83,85,101], é a poliamidoamina (PAMAM) cuja estrutura (Figura 12), de acordo com Crespilho [101], possui um núcleo de etilenodiamina que pode estar ligado a ramificações (unidades de poliamidas) que, a partir do núcleo, determina a geração do dendrímero.

Figura 12: Estrutura molecular da poliamidoamina (PAMAM) geração 4 (G4) contendo 4,5 nm de diâmetro, 32 grupos interiores de amina terciária e 64 grupos funcionais periféricos



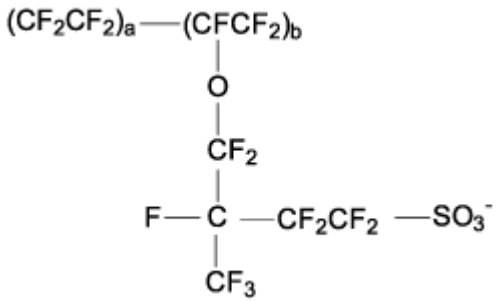
Fonte: ref. [101]

De acordo com a Figura 12, Crespilho [101] mostra que a molécula de PAMAM G4 (geração 4) possui um núcleo de etilenodiamina onde estão ligados quatro unidades de poliamidas, fornecendo cavidades intramoleculares e alta solubilidade em água. Essas ramificações ajudam a estabilizar nanopartículas metálicas. Os grupamentos aminas ($-NH_2$) ao redor podem ser protonados em solução aquosa, dando cargas positivas à molécula e possibilitando a automontagem em processos enzimáticos. Assim, como a enzima apresenta carga negativa, tem-se uma imobilização enzimática através da afinidade física (atração eletrostática) [81-82, 101].

Outro polímero interessante utilizado em imobilização enzimática, da classe dos ionômeros, servindo de agente ancorante, é o Nafion. Esse polímero foi desenvolvido pela DuPont no final de 1960 para ser utilizado, principalmente, como eletrólito na indústria de Cloro/Soda [102]. Mas devido às suas propriedades condutoras, estabilidade em meio oxidante e redutor, resistência mecânica, seu uso foi

crescendo também para a área de células e biocélulas a combustível. A cadeia do Nafion é um copolímero produzido a partir do tetrafluoretileno (TFE), que é a unidade monomérica, onde grupos laterais de éter-vinila perfluorados com grupos sulfônicos ácidos terminais (parte hidrofílica responsável pela absorção de água e condução de prótons) são incorporados à matriz de politetrafluoretileno (PTEE, parte hidrofóbica) como mostra a figura 13. [44, 102-104]

Figura 13. Estrutura do Nafion



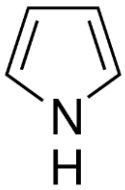
Fonte: [105]

Segundo Akers, N. L *et al* [44], para ser utilizado de modo eficiente na imobilização de enzimas, a molécula de Nafion precisa ser tratada com sal de brometo de amônio quaternário (TBAB). Este procedimento fornece o ambiente ideal para a imobilização da enzima, pois as propriedades físicas do polímero são retidas e aumenta o transporte de íons e espécies neutras. O Nafion modificado ancora a enzima pelo processo de encapsulamento (Fig. 11 d) retendo as enzimas na sua estrutura nos “buracos” criados com o tratamento do TBAB [44]. O Nafion também é utilizado na membrana trocadora de prótons, PEM, nas células e biocélulas com membrana, formando um filme rígido e mecanicamente estável. Os grupos sulfônicos nas extremidades das cadeias formam uma espécie de bolha na estrutura, que, em contato com água, incha, permitindo a condução de prótons e água pela membrana sob o efeito de um campo elétrico [4].

1.6 Polímero condutor

Os polímeros condutores são formados por cadeias carbônicas contendo duplas ligações C=C conjugadas, permitindo um fluxo de elétrons em condições específicas, já que os elétrons π da dupla ligação podem ser facilmente removidos ou adicionados para formar um íon, fazendo o polímero adquirir propriedades condutoras [106-107]. Um polímero bastante interessante é o polipirrol (poli-PYR) [85,108-112], muito utilizado devido à boa estabilidade química em condições ambientes, facilidade de síntese, reatividade redox e capacidade de apresentar alta condutividade [111]. O monômero pirrol (PYR), representado na Figura 14, é um composto orgânico aromático (C_4H_4NH) solúvel em água, sendo utilizado como precursor na síntese do poli-PYR, que pode ser quimicamente ou eletroquimicamente. Com a oxidação, ânions são incorporados na estrutura e o polímero torna-se condutor [111].

Figura 14: Representação da estrutura química do monômero pirrol (PYR).

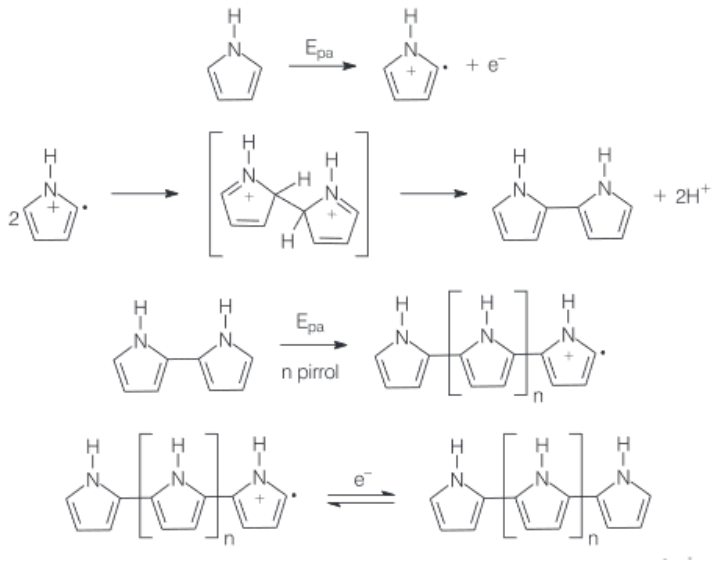


Fonte: Autoria própria

De acordo com Mattos, L.L. [111], cada método de síntese tem suas vantagens e desvantagens e a escolha por qual deles deve ocorrer em função da aplicação que se deseja. Uma grande produção do polímero de baixo custo pode ser obtida pela síntese química. Aqui, um agente oxidante com um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero, é introduzido no meio reacional, provocando a formação do radical catiônico altamente reativo que se acopla com outro formando um dímero neutro com a eliminação de prótons. Esse dímero neutro é convertido em radical catiônico várias vezes até completar a síntese do polipirrol [112, 117]. Já na

eletropolimerização (síntese eletroquímica), ocorre a oxidação do polímero pela aplicação de um potencial na célula eletroquímica, e depois neutraliza-se a carga através da incorporação de contra íons. Sucessivos passos eletroquímicos (oxidação e neutralização) ocorrem até que o composto fique insolúvel e precipita-se sobre a superfície do eletrodo [107, 111]. É uma boa técnica quando se deseja ter controle da espessura do filme e de outros parâmetros na polimerização. Representada na Figura 15, a polimerização do poli-PYR, assim como na polimerização química, começa com a oxidação do monômero, formando um intermediário cátion-radical; que se acopla com outro e, através de uma transferência de carga, dois prótons são eliminados formando um dímero dicatiônico neutro. Este se oxida mais facilmente que o monômero e, então é imediatamente convertido a um novo cátion-radical, e assim, através de sucessivas etapas de oxidação, acoplamento e liberação de prótons (neutralização), vão sendo formadas cadeias de oligômeros que formam o poli-PYR, com acoplamentos mais comumente nas posições 2 e 5 do anel pirrólico, com a possibilidade de defeitos, formando ramificações, com ligações nas posições 3 e 4. [107, 111-112]

Figura 15: Mecanismo da eletropolimerização do Pirrol



Fonte: ref. [107]

É possível realizar a eletropolimerização através das técnicas de voltametria cíclica, cronoamperometria (deposição potenciostática) ou cronopotenciometria (deposição galvanostática) [113].

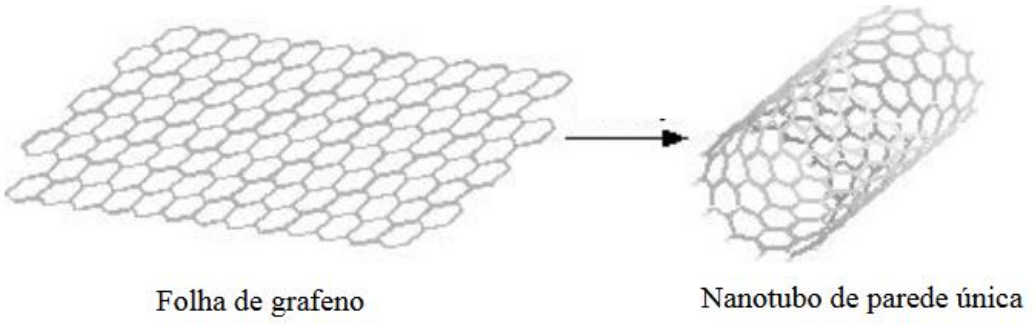
Devido às suas propriedades químicas, como já dito, e sua facilidade de síntese, esse polímero condutor vem sendo muito utilizado na literatura em biocélulas a combustível e biosensores [5-6, 85, 108, 114-120].

1.7 Nanotubos de carbono

Sabe-se que o carbono é um dos elementos mais abundantes do planeta e que quando ligados entre si, podem gerar diferentes materiais e compostos com características e propriedades muito distintas entre si [121]. Como descrito no histórico das biocélulas a combustível, nos últimos anos, os materiais nanoestruturados vem sendo bastante utilizados. O utilizado neste trabalho foi o nanotubo de carbono. Apesar de outros pesquisadores terem produzido estruturas similares, sua descoberta propriamente dita foi só em 1991, por Iijima [121]. Em geral existem dois tipos de nanotubos de carbono: os de paredes simples (NCPSs) (SWNT, do inglês single-wall nanotubes) e os de paredes múltiplas (NCPMs) (MWNT, do inglês multiwalled nanotube). São compostos muito resistentes, flexíveis, possuem alta condutividade térmica, elevada proporção de superfície por volume e são condutores ou semicondutores [122-123].

Uma maneira fácil de representar os nanotubos de carbono é considerar uma camada simples de grafeno enrolada, formando um cilindro ou um tubo em nano-escala, conforme mostrado na figura 16. Essa camada é como uma rede hexagonal de átomos de carbono, com diâmetro 100000 vezes mais fino que um fio de cabelo humano e com ligações simples e duplas, sendo a distância entre dois átomos mais próximos da ordem de 0,14 nm. Entre as camadas, as ligações são do tipo Van der Waals, com distância entre elas da ordem de 0,34 nm [121,123-124].

Figura 16. Estrutura do Nanotubo de carbono de parede única ou simples (SWNT)

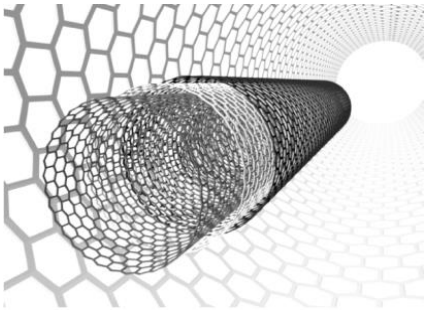


Fonte: Ref. [121].

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) têm tido grande aplicabilidade em diversas áreas com o intuito de aumentar a área superficial e facilitar a transição eletrônica. Isso em comparação com outras arquiteturas de eletrodos de carbono, pois a imobilização dos MWCNTs na superfície eletródica melhora a condutividade, o desempenho e a capacidade de promover as reações de transferência eletrônica de biomoléculas importantes. Com a modificação (adição de espécies específicas na estrutura), essas vantagens podem ser aumentadas devido à presença de espécies oxigenadas, nas extremidades dos tubos [124-125].

Estruturalmente, estes compostos são constituídos por duas ou mais camadas simples de cilindros coaxiais, conforme mostra a Figura 17, podendo conter tubos quirais e/ou aquirais, e vários ângulos quirais [121]; como se fossem vários cilindros, um dentro do outro formando as múltiplas paredes. A distância entre as camadas é da ordem de 3,4 Å. O comprimento e diâmetro dos MWCNTs variam bastante sendo que o primeiro varia desde décimos de nanômetros até vários micrômetros, e o diâmetro exterior varia na faixa de 2 nm a 100 nm [121].

Figura 17: Estrutura do nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs)



Fonte: ref. [122]

Os nanotubos de carbono vêm sendo muito utilizados na literatura com a finalidade de melhorar a atividade do bioânodo, facilitando a transferência eletrônica, aumentando a condutividade e área superficial em sistemas de biocélulas a combustível, por serem materiais biocompatíveis, condutores e com uma estrutura particular, permitindo que esses materiais tenham alta superfície específica [83, 126-134]. Devido à estrutura de tubos finos, os nanotubos mostraram-se muito apropriados para estabelecer comunicações eletrônicas com enzimas redox, pois conseguem se aproximar dos sítios ativos mais facilmente, fazendo com que seja possível uma transferência eletrônica direta no sistema [134].

1.8 Histórico das biocélulas empregando etanol como combustível

Como forma de produzir energia de maneira mais limpa e sustentável, os estudos de biocélulas a combustível enzimáticas geralmente buscam utilizar combustíveis renováveis. Um grande exemplo é o etanol, que é um composto orgânico de fórmula C_2H_6O. Esse composto foi o escolhido neste trabalho para sua utilização como combustível, uma vez que é abundante em nosso país e na região de Ribeirão Preto. O Brasil, devido ao grande cultivo da cana-de-açúcar, é o pioneiro no uso do etanol, ou álcool etílico, como combustível e o segundo produtor mundial, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que produz etanol do milho [135-136]. Mesmo assim, as terras destinadas ao produto representam apenas 1% de toda área cultivável. Com o

dobro, poderíamos abastecer toda a frota de veículos leves com o etanol [135]. Tudo isso graças a uma experiência de mais de 30 anos na produção do álcool (desde o Pró-alcool, em meados da década de 70), enquanto a ideia de se utilizar esse combustível é mais recente em outros países, fazendo com que tenhamos a melhor tecnologia de produção de etanol [135-136]. Durante a fotossíntese da cana-de-açúcar, as plantas absorvem o gás carbônico da atmosfera e liberam oxigênio. Em combustíveis fósseis, é lançado o CO_2 extraído da terra (petróleo) na atmosfera, ocasionando um aumento da concentração deste gás [135]. Segundo dados IEA (Agência Internacional de Energia), a utilização de etanol produzido da cana-de-açúcar faz com que a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa – como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (NO_2), seja reduzida em uma média de 89% [135].

Devido à facilidade de muitas enzimas oxidarem álcoois de cadeia curta, muitos trabalhos na literatura estão utilizando o etanol como combustível com as mais diversas combinações de bioânodo e biocátodo. Alguns exemplos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Exemplos da literatura de biocélulas a combustível utilizando etanol como combustível

Biocélula	**Combustível**	**PCA (V)**	**DP ($\mu W/cm^2$)**	**Fonte**
QH-ADH//MP-8/AOx	EtOH	0,240	1,5	[45]
SWCNT/AlcDH// Pt NP/BOD	EtOH	0,620	200	[137]
ADH+AldDH// $Ru(bpy)_3^{+2}$/BOD	EtOH	0,510	460	[103]
POLI-VM/ADH//Pt	EtOH	0,340	53	[138]

VM + PYR + MWCNTs + ADH/NAD^+	EtOH	0,224	24	[44]
VM + PAMAM + ADH/NAD^+ (36 bicamadas)// Pt E-TEK	EtOH	-	63	[82]
poly-VM + PAMAM + MWCNTs + ADH/NAD^+// Pt E-TEK	EtOH	0,459	278	[83]

1.9 Eletroquímica

Para poder oxidar o etanol através das enzimas, neste trabalho recorreu-se à eletroquímica. A eletroquímica é uma área da química que estuda sistemas capazes de gerar trabalho útil elétrico a partir de reações redox (células galvânicas) ou de sistemas que recebem trabalho útil elétrico e geram reações redox (eletrólise) [66-68].

Como a condução elétrica é uma característica intrínseca dos materiais envolvidos, considera-se um sistema eletroquímico sendo composto por pelo menos dois condutores eletrônicos (eletrodos), e separados por um meio eletrolítico que também é condutor. Os eletrodos ficam imersos em um eletrólito que transporta íons, sendo então esses dois – eletrodo e eletrólito, os componentes básicos de um sistema eletroquímico sobre os quais são focalizados os estudos [66-68]. Várias técnicas vão utilizar esse sistema de eletrodos e eletrólito a fim de se obter informações quali e quantitativas dos mesmos.

1.10 Técnicas de caracterização de eletrodos

1.10.1 Voltametria

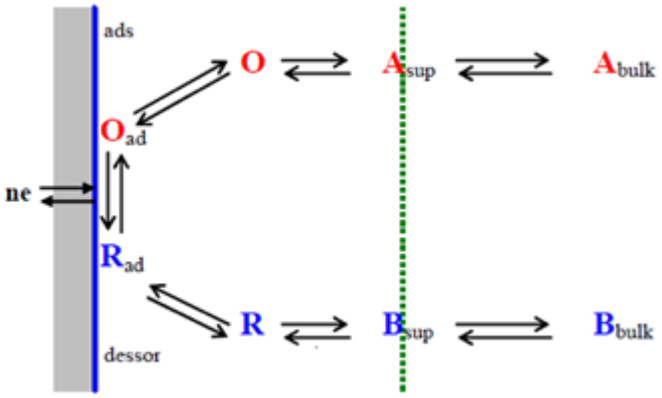
A voltametria é uma técnica eletroquímica que faz uso de propriedades elétricas mensuráveis a partir dos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Aleixo [139] traz que as informações qualitativas e quantitativas do composto de interesse são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial,

feitas durante a oxidação ou redução desse composto em uma célula eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos (eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência). A corrente elétrica é obtida em função do potencial aplicado em forma de varredura (variando-o a uma velocidade constante em função do tempo). Ambos, o potencial e a corrente resultantes, são registrados simultaneamente, obtendo-se um voltamograma (curva de corrente versus potencial); cuja magnitude da corrente resultante da diferença de potencial entre os eletrodos, pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, pode ser relacionada à concentração de analito presente no sistema. [139-141]

Segundo Pacheco, W. F. *et al* [140], nos sistemas de dois eletrodos, o eletrodo de trabalho possui uma superfície relativamente pequena e o eletrodo de referência uma área relativamente grande. Como as áreas são diferentes, quando o potencial é aplicado no eletrodo de trabalho frente a um eletrodo de referência, apenas o eletrodo de trabalho se polariza. Isso apresenta alguns inconvenientes que inviabiliza a utilização dessa técnica nessas condições: a corrente resultante da varredura percorre o eletrodo de referência; no caso de um meio não aquoso, a resistência da célula aumenta, fazendo aumentar a corrente que passará através dos eletrodos provocando distorções nos voltamogramas [140]. Para acabar com essas limitações, sistemas com três eletrodos são mais utilizados. O terceiro eletrodo, o eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo, pode ser de platina, ouro, carbono vítreo, etc. Nesse sistema, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional que atuará fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua quando for aplicada uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e referência [140]. Assim, a corrente passará entre esses eletrodos evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência, que conseguirá realizar seu papel (manter o seu potencial constante durante as medidas) sem interferência. De modo geral, essa célula é mais adequada para soluções diluídas, podendo ser usada tanto para soluções altamente resistentes como para eletrólitos suporte mais diluídos [140-141].

A reação eletródica é composta por uma série de etapas, pois cargas negativas, positivas ou neutras podem ou não interagir com a superfície do eletrodo. Para se descrever qualquer processo eletródico, primeiramente deve ser considerado o transporte das espécies presentes até a superfície do eletrodo, e depois a reação que ocorre no mesmo [140]. A figura 18 mostra as etapas ocorridas na interface eletrodo/solução.

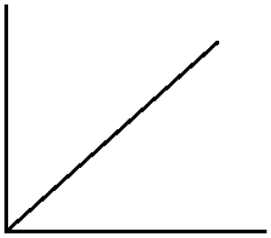
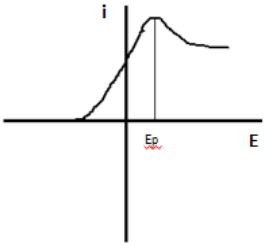
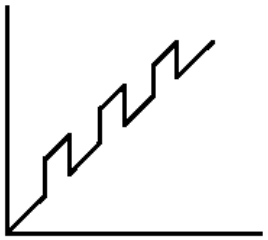
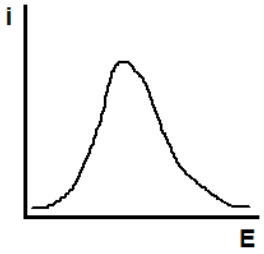
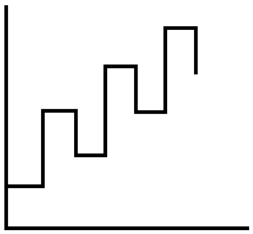
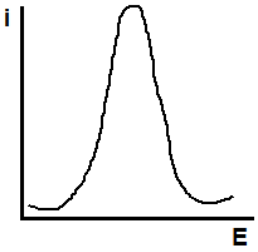
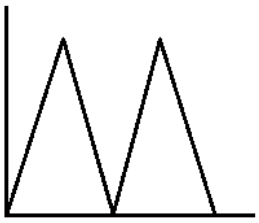
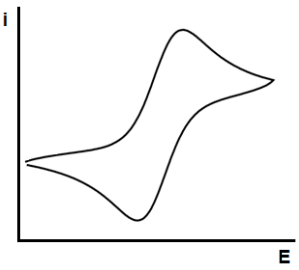
Figura 18. Etapas ocorridas em uma reação na interface eletrodo/solução resultando na medida voltamétrica



Fonte: ref. [140]

Durante os testes voltamétricos, a atração ou repulsão entre as espécies iônicas da solução e o eletrodo de trabalho fazem os íons se movimentarem pela solução causando o chamado *transporte por migração*. Além disso, há também a movimentação de espécies causadas por perturbação mecânica do fluxo da solução, conhecida como *convecção*. Por isso, as condições experimentais são ajustadas para que esses fenômenos sejam minimizados. A forma na qual o potencial é aplicado, e a corrente (sinal analítico) é obtida, irá denominar o tipo de técnica voltamétrica em questão, como mostra a figura 19. [139-141].

Figura 19. Forma de aplicação do potencial e resposta resultante para cada tipo de voltametria

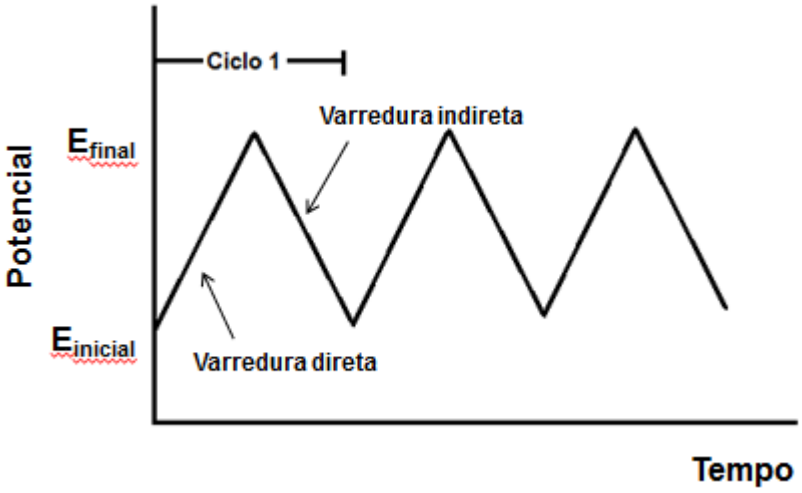
Tipo de voltametria	Sinal de excitação	Corrente resultante
Varredura Linear		
Pulso Diferencial		
Onda quadrada		
Voltametria Cíclica		

Fonte: Adaptada da ref. [141]

A voltametria cíclica é a técnica mais comum utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos ocorridos na reação eletródica, bem como sobre a reversibilidade dessa reação, obtendo-se, ou não, picos anódicos e catódicos referentes ao processo redox do analito em questão [140-141]. Sua eficiência está na habilidade de fornecer informações rápidas sobre a termodinâmica de processos de oxirredução, da cinética de reações heterogêneas de transferência eletrônica e sobre o acoplamento de reações químicas e processos adsortivos [140-141].

O sinal de excitação obtido para o sistema eletroquímico em uma voltametria cíclica corresponde a uma onda triangular, onde o potencial é variado entre o valor inicial e final, retornando à mesma velocidade para o valor inicial, completando um ciclo, como mostrado na figura 20 [66-68].

Figura 20. Variação do potencial em função do tempo em uma voltametria cíclica.



Fonte: Adaptado da ref. [141]

Primeiro, então, aplica-se um potencial onde não ocorre nenhuma reação. A redução começa a ocorrer conforme o potencial aumenta indo para regiões mais negativas (catódica), gerando um pico de corrente proporcional à concentração do analito de interesse. Quando já não há mais nenhuma redução ocorrendo, o potencial

é varrido no sentido inverso até o valor inicial, e, se a reação for reversível, os produtos gerados serão oxidados, surgindo um pico simétrico ao pico da redução. [139-141].

O voltamograma obtido pode indicar o mecanismo ocorrido no eletrodo, que pode ser transferência de massa (por difusão) ou de carga do analito em solução para a superfície do eletrodo. Além desses, em alguns casos ainda pode ocorrer reações químicas junto com esses processos [68, 140].

1.10.2 Cronoamperometria

A cronoamperometria é uma técnica que determina a corrente gerada pela oxidação ou redução das espécies presentes na superfície do eletrodo de trabalho, como função do tempo em um potencial constante; por meio da equação de Cottrell (5) [142]:

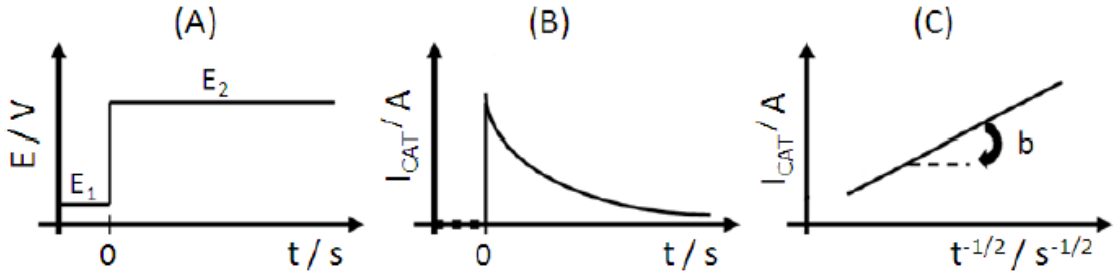
$$i = \frac{nFAc_j^0\sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}} \quad (5)$$

onde: I é a corrente, t é o tempo, n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, A é a área do eletrodo, C é a concentração das espécies oxidadas e D é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas.

Como resultado, então, obtém-se um gráfico da corrente em função do tempo como resposta ao potencial aplicado, onde a carga (Q) envolvida no processo pode ser calculada através da área sob a curva. A figura 21 (A) mostra um exemplo de cronoamperograma onde são aplicados dois potenciais. O primeiro se refere ao carregamento da dupla camada elétrica na superfície do eletrodo, e o segundo é o potencial onde ocorre a redução ou oxidação das espécies. A figura 21(B) apresenta o comportamento da corrente com o tempo em função do potencial; e a (C), apresenta a correlação linear entre I e $t^{-1/2}$ da equação de Cottrell, representada pelo coeficiente

angular da reta (b) que é diretamente proporcional à concentração das espécies oxidadas [142].

Figura 21. (A) Aplicação do salto de potential na cronoamperometria; (B) comportamento da corrente com o tempo e (C) coeficiente angular da relação entre corrente e $t^{-1/2}$ segundo a equação de Cottrell



Fonte: ref.[142]

1.10.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Basicamente, a principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao ser humano tudo o que for muito pequeno para enxergara olho nu. Segundo Dedavid *et al* [137], um microscópio óptico convencional utiliza fótons enquanto que um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons, solucionando o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. É um instrumento muito versátil e comumente usado para a análise microestrutural de sólidos. Apesar da complexidade para a obtenção da imagem, o resultado é de fácil interpretação. Em biocélulas, essa técnica pode ser realizada com o intuito de avaliar a formação e espessura de filmes [138-139]. Essa técnica vem sendo muito utilizada devido à capacidade de fornecer informações em detalhes, com aumentos de até 300.000 vezes. A imagem neste equipamento é formada pela incidência de um feixe de elétrons na amostra num ambiente a vácuo, emitindo, assim, elétrons secundários, retroespalhados, *e* absorvidos. Com a emissão desses elétrons secundários e retroespalhados pelo

material analisado, a imagem final obtida representa em tons de cinza o mapeamento e a contagem dos tais elétrons. É comum também acoplar ao MEV o sistema de EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy X-ray*), ou espectroscopia de energia dispersiva de raio-x, quando se deseja determinar a composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. [146-147]

Todas essas técnicas foram utilizadas para a caracterização, estudo de eficiência e estabilidade do bioânodo com eletropolimerização simultânea do verde de metileno e pirrol, na presença e ausência da(s) enzima(s) e MWCNTs para construir, finalmente, a biocélula enzimática completa (com catalisador enzimático no ânodo e cátodo).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação é o preparo de biocélulas a combustível enzimáticas ADH/NAD,etanol//Pt/O_2, e ADH/NAD,etanol,Lacase/O_2 para obtenção de energia, com a eletropolimerização simultânea do mediador/eletrocatalisador poli-verde de metileno com o polímero condutor polipirrol no bioânodo. Como objetivos específicos para alcançar a finalidade do trabalho, foram realizados estudos visando caracterização e otimização dos bioânodos para se obter maior ganho energético, adicionando MWCNTs, além de investigar a estabilidade do sistema formado em modo estático e dinâmico (biocélula em operação) e os produtos formados. E por fim, operar o bioânodo otimizado com o biocátodo contendo a enzima Lacase em uma célula sem membrana.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 REAGENTES E INSTRUMENTAÇÃO

Todas as enzimas da Sigma-Aldrich utilizadas neste trabalho, ADH (EC 1.1.1.1), AldDH (EC 1.2.1.5) e Lacase (1.10.3.2) foram empregadas sem nenhum tratamento prévio. Tanto a ADH quanto a AldDH são obtidas a partir do pó liofilizado de *Saccharomyces cerevisiae*, apresentando 331 Unidades mg^{-1} e 1,02 Unidades mg^{-1} respectivamente. A Lacase é obtida a partir do pó liofilizado de *Trametes versicolor* (21 Unidades mg^{-1}). A coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleótideo hidratado (NAD^{+}), além do Pirrol (PYR), PAMAM, Nafion, e o corante Verde de Metileno (VM), também foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) foram obtidos da Cheap Tubes Inc. apresentando, em média, 8,0 nm de diâmetro, 10-30 μm de comprimento e > 95% de pureza.

Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica e não tiveram nenhuma purificação prévia. As enzimas, mediadores e coenzimas foram mantidos na temperatura de armazenamento adequados recomendado pelo fabricante. Estudos de atividades foram realizados periodicamente visando estabelecer a atividade das enzimas a serem empregadas nos ensaios eletroquímicos.

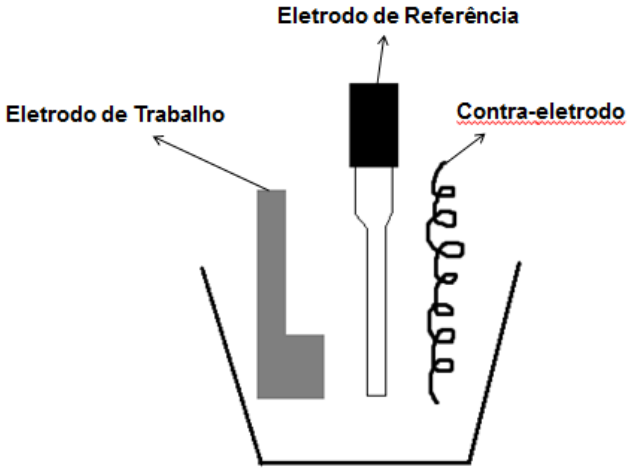
Todas as soluções (mediadores, enzimas e coenzimas) foram preparadas com água ultrapura do sistema Millipore Milli-Q (18 $m\Omega\ cm^{-1}$) e rapidamente utilizadas. As medições de pH foram realizadas com eletrodo de pH acoplado a um pHmetro Quimis modelo Q400RS.

Para o registro de todas as medidas eletroquímicas (testes de densidade de potência, polimerização dos filmes, caracterização voltamétrica), utilizou-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30 (Metrohm Autolab) cujas medições foram realizadas à temperatura ambiente (25 ± 1° C). Para o registro das atividades enzimáticas, utilizou-se um espctofotômetro da Agilent Technologies, cary 60 UV-Vis.

Para o registro dos possíveis produtos formados durante a oxidação do etanol por eletrólise, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência, (CLAE) em um cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC-10AT) equipado com duas bombas e um injetor automático (volume de injeção de 20 µL) acoplado a um sistema duplo de detecção on-line com ultravioleta (UV) e índice de refração (RID-10). A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87H (Bio-Rad). As melhores condições experimentais otimizadas sob o modo isocrático foram: fase móvel = ácido sulfúrico 5 mmol L^{-1}, vazão = 0,6 mL min^{-1} e a temperatura da coluna de 35°C.

Para os testes voltamétricos e cronoamperométricos, tanto para caracterização quanto eletropolimerização dos filmes, utilizou-se uma célula contendo três eletrodos; eletrodo de trabalho, EW (papel de carbono ou carbono vítreo para a deposição dos filmes e presença ou não da enzima e nanotubos de carbono); eletrodo auxiliar, EA (fio de platina); e eletrodo de referência, ER (ECS); como apresentado na figura 22.

Figura 22. Representação da célula de três eletrodos utilizada nos testes voltamétricos e cronoamperométricos.

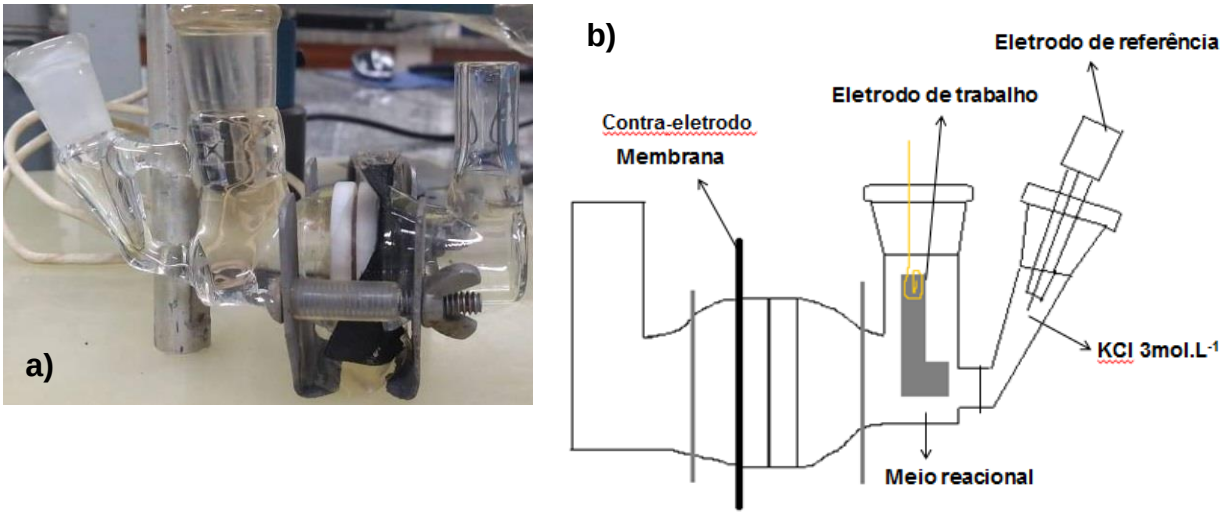


Fonte: Autoria Própria

Para os experimentos de eletrólise, utilizou-se uma célula de vidro com uma separação de compartimentos por uma membrana trocadora de prótons (Nafion® 112)

[148]; como eletrodo auxiliar foi empregado um tecido de carbono (E-TEK) contendo 20 n% de platina, prensado à quente na membrana (130 ^{o}C, pressão de 35 kgf cm^{-2} por 180 s [148-149]); um eletrodo de referência (Ag(s)|AgCl(s)| KCl 3 mol L^{-1},) e o eletrodo de trabalho (nas mesmas condições que para os testes voltamétricos especificado acima), preso em um fio de ouro apenas para fazer a conexão com o potenciostato. A figura 23 mostra uma fotografia e, para melhor visualização, um esquema da célula utilizada.

Figura 23. a) Fotografia da célula de eletrólise e b) Esquema da célula de eletrólise utilizada

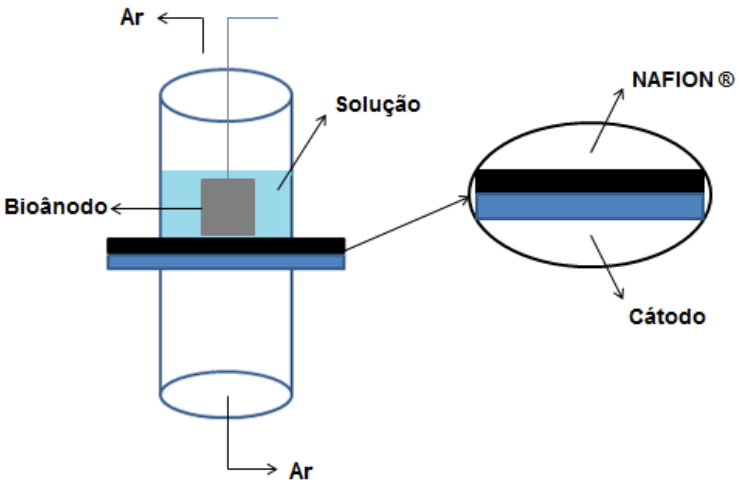


Fonte: Autoria Própria

A figura 24 mostra a célula de dois compartimentos separados por uma membrana de Nafion® 112 [148] (a mesma citada acima) utilizada para determinar a densidade de potência (DP) dos bioânodos estudados. Nesta célula, o cátodo foi preparado da mesma forma descrita para a eletrólise sendo mantido em contato direto com o ar. Antes da realização de cada medida experimental, a célula foi mantida com ácido sulfúrico concentrado por uma noite para garantir a condutividade da membrana.

Após lavagem exaustiva foi feita a adição de um volume apropriado de solução tampão fosfato (tampão fosfato; pH 7,4 ou pH 8,9) e realizada as medidas eletroquímicas. Lembrando que entre as medidas realizadas, a membrana também era mantida em contato com ácido sulfúrico concentrado durante 20-30 minutos, depois lavada. Em seguida, adicionava-se o tampão e deixava-se também 20-30 minutos para posterior lavagem. E por fim, o bioânodo estudado foi imerso na solução de análise onde esperou-se estabilizar o potencial de circuito aberto (PCA) durante 20-30 minutos para fazer a medida de densidade de potência (DP).

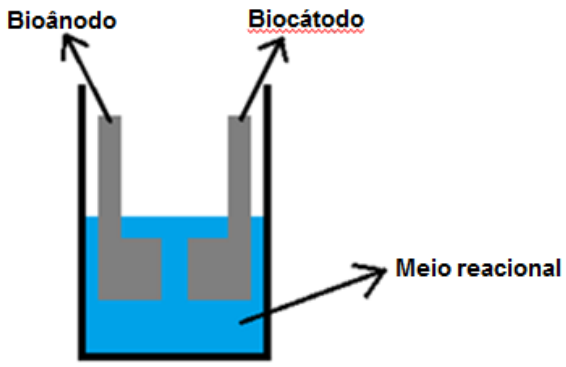
Figura 24: Esquema da célula utilizada para ensaios de densidade de potência da biocélula.



Fonte: Adaptado da ref. [2]

A figura 25 mostra o esquema de biocélula completa sem membrana empregada nas medidas. Os eletrodos utilizados foram o bioânodo contendo a enzima ADH na presença e ausência de MWCNTs e o biocátodo com a enzima Lacase conforme descrito na literatura [150].

Figura 25: Esquema da célula utilizada para ensaios de densidade de potência da biocélula completa



Fonte: Autoria Própria

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 POLIMERIZAÇÃO do (poli-VM-poli-PYR)

Os bioânodos foram confeccionados em camada difusora composta de papel de carbono Toray® (papel fibra de carbono, TGP-H-060, Fuel Cell Earth, Stoneham, MA), com área de 1 cm^2. Esta foi modificada com o eletrocatalisador poli-VM polimerizado juntamente com o poli-PYR na superfície eletródica. O processo de polimerização simultânea do poli-VM e poli-PYR foi realizado adicionando-se 0,25 mol L^{-1} do monômero PYR em 7 mL da solução de poli-VM utilizando-se 0,4 mmol L^{-1} de VM, 10 mmol L^{-1} de $Na_2B_4O_7$ e 0,1 mmol L^{-1} de $NaNO_3$ registrando-se 12 ciclos sucessivos com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}, num intervalo de potencial de -0,3 a + 1,3 V *vs.* ECS [44]. Após a formação dos filmes, os eletrodos modificados C/(poli-VM-poli-PYR), foram lavados com água deionizada Milli-Q em abundância e secos em dessecador por 24 horas estando, após esse período, em perfeitas condições para a realização do processo de imobilização enzimática e para a adição do filme de MWCNTs.

Para fins de comparação também foi preparada a eletropolimerização dos filmes de verde de metileno e seguido do filme de polipirrol. O processo de polimerização do poli-VM, por voltametria cíclica, sobre o suporte eletródico foi feito como descrito acima (porém sem o pirrol). A posterior polimerização do poli-Pyr foi realizada por cronoamperometria aplicando-se +0.70 V *vs.* ECS por 15 segundos em meio reacional contendo 0,25 mol L^{-1} do monômero PYR (112 µL de PYR em 1000 µL de EtOH) [151]. Em todas as eletropolimerizações utilizou-se a célula apresentada na figura 22.

3.2.2 REVESTIMENTO DE MWCNTs NO SUPORTE ELETRÓDICO

A mistura contendo 1 mg de MWCNTs comercial foi adicionada em 400 µL de isopropanol e 600 µL de tampão fosfato (pH 7,4) e submetida à dispersão por uma hora, sendo 15 minutos no vórtex e 15 minutos no ultrassom, alternadamente. Após este tempo de dispersão, 50 µL da tinta de MWCNTs foi depositada, via gotejamento, sobre os eletrodos modificados C/(poliVM+PYR), seguida de secagem, em dessecador a vácuo, durante 24 horas [152].

3.2.3 MODIFICAÇÃO DO NAFION®

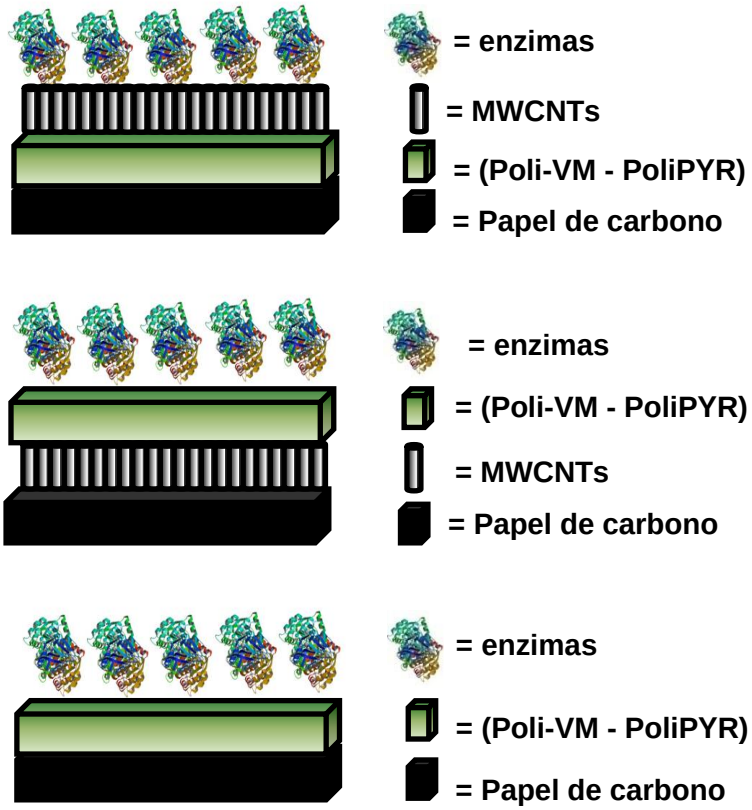
De acordo com Moore, C.M. *et al* [103], o tratamento da membrana de Nafion® para seu uso como matriz ancorante na imobilização da enzima é importante, pois a atividade da biomolécula fica retida já que essa modificação torna o ambiente favorável a isso; uma vez que que ela mantém as propriedades da membrana original, mas diminui sua acidez e aumenta o transporte de massa através dela [103]. A modificação dessa membrana foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura [103]. Primeiramente, mistura-se 2 mL da solução de Nafion® 117 5 % (Sigma - Aldrich) com excesso (3 vezes maior) de TBAB em relação a concentração

de ácido sulfônico presente na membrana não modificada (correspondendo a 0,07838 g do sal). Em seguida, agita-se a mistura no *Vórtex* por 10 - 15 minutos, para posterior secagem em uma “barquinha” de pesagem durante 24 horas em dessecador. Depois disso a membrana é lavada com bastante água deionizada onde fica em repouso por mais 24 horas. Após esse período, essa água de lavagem é retirada e a membrana fica no dessecador por pelo menos 24 horas até secar completamente. Para finalizar e ficar pronta para utilização, realiza-se a re-suspensão da membrana modificada com 2 mL de etanol [103].

3.2.4 PREPARAÇÃO DOS BIOELETRODOS: IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

A solução enzimática a ser imobilizada foi preparada segundo o protocolo desenvolvido por FORTI *et al*, 2011 [81] no qual a partir das soluções estoque da enzima ADH (3,375 mg L^{-1}) e do cofator NAD^+ (7,5 mg L^{-1}), preparou-se uma solução contendo 100 µL de PAMAM ou de Nafion-TBAB, 100 µL de NAD^+ , 300 µL de ADH e 100 µL de tampão fosfato (pH 7,4 / pH 8,9). Após a homogeneização, foi adicionado 50 µL desta solução sobre os eletrodos modificados C/(poliVM-PYR) contendo ou não MWCNT. Em seguida, os bioânodos foram secos por 24 horas, em dessecador a vácuo e depois hidratados em tampão (pH 7,4 / pH 8,9) em uma temperatura de 4 ^oC. A figura 26 mostra a configuração dos bioânodos estudados.

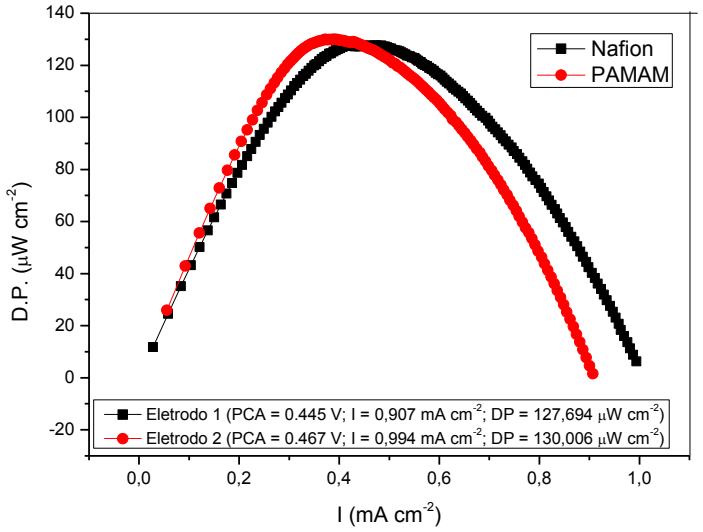
Figura 26: Esquema da arquitetura final do bioânodo na presença e ausência de MWCNTs



Fonte: Autoria Própria

Neste trabalho, ambos os agentes ancorantes (PAMAM e Nafion modificado) foram utilizados nos testes iniciais e apresentaram similaridades nos resultados obtidos. Desta forma, os resultados apresentados nesta dissertação são com o Nafion modificado. A figura 27 mostra um exemplo dessa similaridade com o teste de densidade de potência.

Figura 27. Comparação do efeito dos ancorantes (NAFION e PAMAM) da enzima ADH nos valores de densidades de potência das semi-biocélulas a combustível $EtOH/O_2$ para o filme (poli-VM-poli-PYR). Meio reacional: PBS (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: tecido de carbono (área = $1cm^2$).



Fonte: Autoria Própria

O biocátodo de Lacase foi preparado de acordo com procedimento descrito na literatura [150]. Resumidamente, a solução foi preparada misturando 7,5 mg de MWCNTs – Ac (nanotubos de carbono modificados com antraceno) cedido por Aquino-Neto; 1,5 mg da enzima e 75 µL de tampão fosfato pH 5,0. Para a homogeneização, a solução foi agitada por 1 minuto em vórtex e 15 segundos no ultrassom (repetindo este procedimento por 4 vezes). Em seguida, adiciona-se 25 µL de TBAB-Nafion e repete o procedimento citado anteriormente para a homogeneização. Com a solução pronta, pintou-se os eletrodos e estes foram secos por 24 horas em dessecador a vácuo. Posteriormente, eles foram transferidos para solução de tampão pH 5,0 e estocados à temperatura de 5 ^oC.

3.2.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

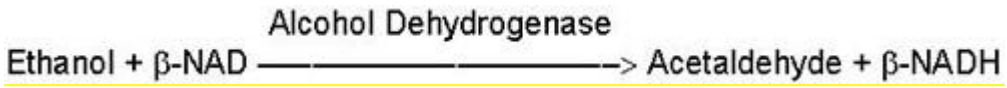
As análises voltamétricas foram realizadas em uma célula de compartimento único contendo tampão fosfato de pH 7,4 ou pH 8,9 para os testes dos bioânodos; para os testes dos biocátodos o pH foi 5,0. Esses testes de voltametria cíclica foram feitos em uma célula convencional constituída por um sistema de três eletrodos contendo o eletrodo de trabalho (papel de carbono ou carbono vítreo no caso da atividade do NADH), um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de ECS como mostrado na figura 22 do item anterior, a uma velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}. O meio reacional era composto por 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} contendo $NaNO_3$ 0,1 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e depois com a adição de NADH, 10 mg, com borbulhamento de gás nitrogênio durante 15 minutos. Para a redução de oxigênio no caso do biocátodo, as voltametrias foram feitas na mesma velocidade, no tampão de pH adequado na presença e ausência de oxigênio. Os voltamogramas lineares para o cálculo das densidades de potência foram registrados utilizando-se velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} de maneira similar à descrita anteriormente.

Em testes de semi biocélula a combustível, o compartimento da célula (10 mL) foi preenchido com o tampão acima e foi adicionado 0,1 mol L^{-1} de etanol e NAD^+ 1.9 mmol L^{-1} [2]. O potencial de circuito aberto da célula (PCA) foi medido por um período aproximado de 30 minutos antes da polarização linear realizada a uma taxa de varredura de 1 mV s^{-1} do valor obtido de PCA até 0,0 V. As densidades de potência (E x I) foram calculadas a partir os dados obtidos. Todas as experiências foram realizadas em triplicatas, e todos os experimentos feitos à temperatura ambiente. Os testes de biocélula completa sem membrana, foram feitos com uma solução contendo tampão fosfato ou acetato pH 6,5 (pH intermediário entre os pH ótimos das enzimas utilizadas [153]), etanol 0,02 mol L^{-1} e NAD^+ 1.9 mmol L^{-1}. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente (25°C). O cofator está presente na solução de imobilização

da enzima e no meio reacional para garantir seu excesso na dupla camada e assim, maior transferência eletrônica.

Os experimentos de eletrólise a potencial controlado e constante, 0,6 V vs Ag/AgCl, foram realizados com a técnica de cronoamperometria durante 12 horas ininterruptas. Manteve-se o lado do cátodo em contato direto com o ar. O compartimento contendo o eletrodo de trabalho foi vedado para que os possíveis produtos formados após a eletrólise não fossem perdidos para o meio. Os produtos obtidos após 12 horas de eletrólise foram analisados por CLAE UV/RID no modo Full-Scan [154].

3.2.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA (μmol min^{-1} mg^{-1} = U mg^{-1})



As medidas foram realizadas num espectrofotômetro UV-Vis (Reactions Kinects – λ = 340 nm). As soluções foram preparadas separadamente em tubos de Eppendorfs e colocadas em banho de gelo.

No método [2], utilizou-se 790 μL de tampão fosfato sem nitrato pH= 7,4 ou 8,9; 100 μL de etanol 1,0 M; 100 μL de cofator NAD^+ (10 mg mL^{-1}); dissolvido em tampão fosfato; 10 μL da enzima ADH (1,0 mg mL^{-1}), dissolvido em tampão (volume final de 1 mL). O tempo de reação na cubeta (com 1 cm de caminho óptico) foi de 3 minutos, com intervalo de medida de 2 segundos, e a velocidade foi calculada por regressão linear durante os primeiros minutos de reação.

O volume de solução da enzima depende do valor final da absorbância obtida pelo espectrofotômetro. Caso os valores sejam muito pequenos (< 0,1), aumenta-se o volume de solução de ADH e vice-versa.

Cálculo utilizado (6):

$$\alpha/\varepsilon = \frac{\text{Abs min}^{-1}/\text{absortividade molar}}{\text{Massa de enzima adicionada (mg)}} \quad (6)$$

Absortividade molar = 6,22 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$

A catálise da hidrólise do substrato pela enzima lacase foi realizada a 25°C, de acordo com o procedimento já descrito na literatura [84], acompanhando-se a oxidação do ABTS em 420 nm (ε420nmpH 4,5 = 36.00 $M^{-1}cm^{-1}$), utilizando-se a mesma cubeta de quartzo utilizada para a atividade da ADH descrita anteriormente. O tampão empregado foi acetato pH 5,0 contendo o substrato e a enzima em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima na cubeta contendo tampão. Os valores de absorbância foram coletados conforme o descrito anteriormente para a ADH. Para um volume final de solução igual a 1 mL, a concentração final dos reagentes foi mantida em 1 mmol L^{-1} de ABTS.

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para verificar se as enzimas utilizadas estavam ativas ou não, realizou-se ensaios de atividade enzimática em diferentes pH (tanto nos pH ótimos das enzimas quanto nos pH dos testes de biocélula, tanto a semi-biocélula com o cátodo de $Pt_{E\text{-}TEK}$, quanto com a biocélula completa com o biocátodo de MWCNTs-Ac/Lacase), e os valores obtidos encontram-se na tabela 2. Unidade enzimática é definida como a quantidade catalisada de 1 µmol do produto por minuto. Considerando o volume de extrato enzimático utilizado na reação, tem-se a atividade enzimática por mL (U/mL = µmol. min^{-1}. mL^{-1}). A atividade específica será a atividade enzimática em U/mL, dividida pela concentração de proteína em mg/mL [69]. Como é uma unidade que

exprime velocidade de conversão, quanto maior o valor, mais ativa está a enzima, ou seja, mais produto está sendo formado.

Tabela 2. Atividade enzimática

ENZIMA	Atividade Enzimática (U/mg)	Atividade Enzimática (U/mL)	pH
ADH	18,7 ± 2,6	10,7 ± 2.6	6,5
ADH	43,8 ± 4,7	24,8 ± 4,7	7,4
ADH	57,3 ± 5,9	34,3 ± 5,9	8,9
Lacase	7,1 ± 1,0	5,6 ± 1,0	5,0
Lacase	4,84 ± 0,8	2,89 ± 0,8	6,5

Como já dito, todas as enzimas adquiridas foram da Sigma-Aldrich, e, segundo o fabricante, a atividades reportadas nos frascos (331 $U.mg^{-1}$, e 23,1 $U.mg^{-1}$ para ADH, e Lacase respectivamente) são bem maiores do que as apresentadas na Tab. 2. Os valores obtidos são bem menores que os relatados pelo fabricante e ainda estão abaixo de alguns valores apresentados na literatura como 100 U/mL [155] para a ADH em pH 8,5 e 83,6 U/mg [156], 40 U/mg [157] para Lacase. No entanto, ainda assim as enzimas se mostraram funcionais, principalmente nos pH ótimos, básico no caso da ADH (8,9) e ácido no caso da Lacase (5,0), onde apresentaram maiores valores de atividade.

4.2 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA DO NADH

4.2.1 FILME POLIVERDE DE METILENO+POLIPIRROL

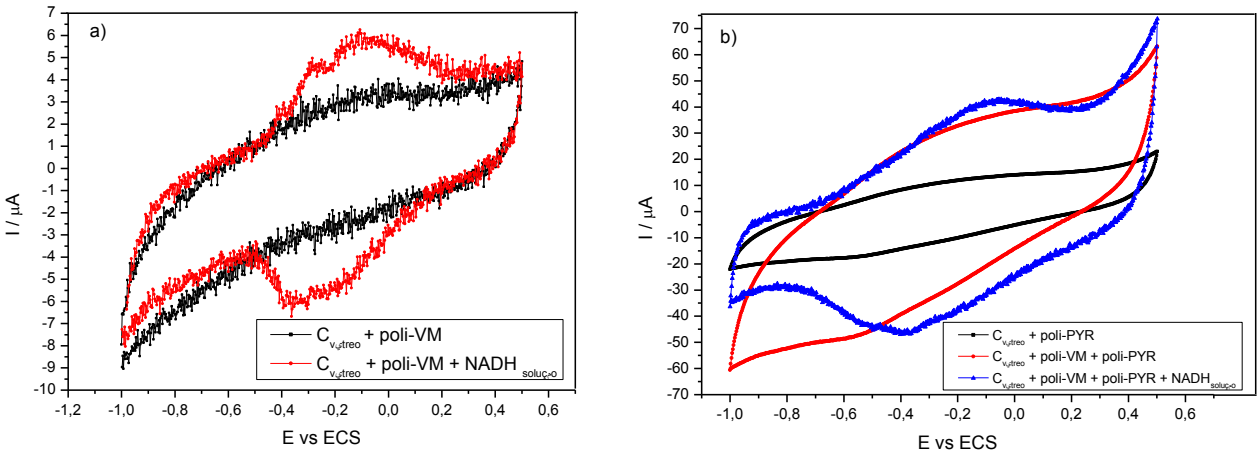
A oxidação de NADH em eletrodo de carbono ocorre com alta sobrevoltagem [1, 78,158-161]. A investigação da difusão de NADH sobre filmes poliméricos não é um assunto novo mais sempre é de grande interesse dos pesquisadores visto que mais de 450 enzimas requer NADH como cofator para sua atividade [162]. A oxidação de NADH para a forma ativa NAD^+ envolve a transferência de um equivalente de hidreto. Dois mecanismos são propostos para esta reação: transferência de 1 hidreto [158]; retirada sequencial de um elétron-próton-elétron [159]. De acordo com Gorton *et al* [159] a aceitação definitiva do mecanismo pela comunidade bioeletroquímica ainda é motivo de grande discussão. Para acelerar a cinética da oxidação de NADH gastando menos energia, é empregado o uso de mediadores/catalisadores que reagem rapidamente com NADH [1, 158, 160, 163]. E, como já descrito na introdução, o verde de metileno é bastante utilizado pra esse fim e, na sua presença, a oxidação de NADH é deslocada para potenciais tão baixos quanto 0 V [161].

No processo de construção de uma BFC, torna-se necessário a avaliação dos bioeletrodos com relação à sua eficiência na transferência eletrônica e seletividade enzimática, bem como o design da matriz eletródica. Sendo assim, realizou-se o estudo do comportamento eletroquímico dos filmes poliméricos, depositados em suporte de carbono vítreo (A = 0,70 cm^2). O primeiro filme investigado foi o poli-VM+poli-PYR sendo polimerizado o eletrocatalisador (VM) e posteriormente o filme de polipirrol (eletropolimerizados separadamente).

A figura 28 mostra o voltamograma cíclico representativo dos diferentes filmes na ausência e presença de NADH em solução. A análise da Figura 28 B mostra que na presença de poli-PYR a carga anódica e catódica do VC aumenta consideravelmente. O filme de poli-PYR não apresenta picos voltamétricos nem na

ausência nem na presença de NADH no meio reacional similarmente ao descrito na literatura [164]. Aqui, foi apenas representada uma das curvas para exemplificar o formato da curva. A oxidação de NADH no eletrodo contendo o filme de poli-VM (Fig. 28 A) apresenta um pico de oxidação bem definido em -0,112 V vs. ECS indicando o efeito benéfico deste eletrocalatisador [1, 44, 78, 163]. Quando se acrescenta o poli-PYR, eletrodo poli-VM+poli-PYR, observa-se um pequeno pico de oxidação do NADH em -0,043 V vs. ECS. Um dos possíveis motivos da baixa definição do pico anódico do NADH deve ter sido o preparo do filme em camadas, onde o mediador de NADH/NAD^+ (poli-VM) encontra-se separado da enzima pela camada de polipirrol. Portanto, muito provavelmente a difusão do NADH no filme de polipirrol, apesar de ser condutor, é dificultada.

Figura 28. Voltamogramas cíclicos representativos na ausência e presença de NADH (1 mg mL^{-1}) em a) filme poli-VM na ausência e presença de NADH e b) diferentes filmes contendo poli-PYR e poli-VM. Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,4) e $NaNO_3$ 0,1mol L^{-1} (v = 10 mV s^{-1}), suporte carbono vítreo (A = 0,70 cm^2)

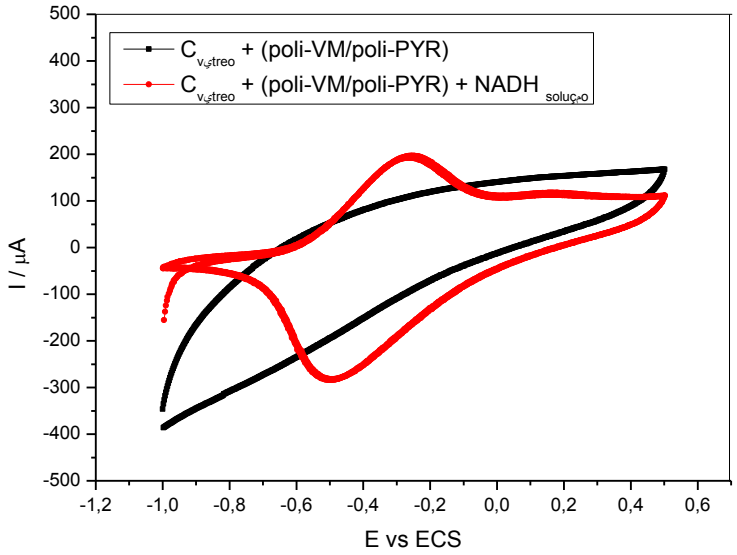


Fonte: Autoria Própria

4.2.2 FILME (POLI-VM-POLI-PYR)

Durante os experimentos do item anterior, observou-se que a solução de armazenamento dos eletrodos ficava levemente esverdeada com o tempo, mostrando perda do verde de metileno da superfície do eletrodo. Tendo como objetivo, então, aumentar a estabilidade do filme na superfície do eletrodo, optou-se por fazer uma polimerização simultânea do eletrocatalisador verde de metileno com o polímero condutor pirrol, ainda não presente na literatura. A figura 29 mostra os voltamogramas cíclicos representativos dos eletrodos preparados com filme polimérico simultâneo (poli-VM-Poli-PYR) na ausência e presença do cofator reduzido (NADH) no meio reacional. Na presença do cofator observa-se a presença de um pico anódico bem definido do NADH em -0,261 V vs. ECS. Comparando-se com a figura 28, pode-se verificar uma maior definição dos picos, um aumento bastante significativo na carga dos picos, da corrente anódica, (cerca de 5x) e, além disso, a polimerização simultânea fez com que o NADH permeasse com mais facilidade o filme, facilitando a transferência eletrônica, tendo deslocamento do sobrepotencial de oxidação de cerca de 200 mV para valores mais negativos indicando um efeito benéfico para a preparação da biocélula a combustível na presença da enzima ADH.

Figura 29: Voltamograma cíclico na ausência e presença do NADH (1 mg mL^{-1}) do filme (poli-VM-Poli-PYR) com eletropolimerização simultânea sobre o eletrodo de carbono vítreo (A = 0,70 cm^2) : Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,4) e $NaNO_3$ 0,1mol L^{-1} (v = 10 mV s^{-1}).



Fonte: Autoria Própria

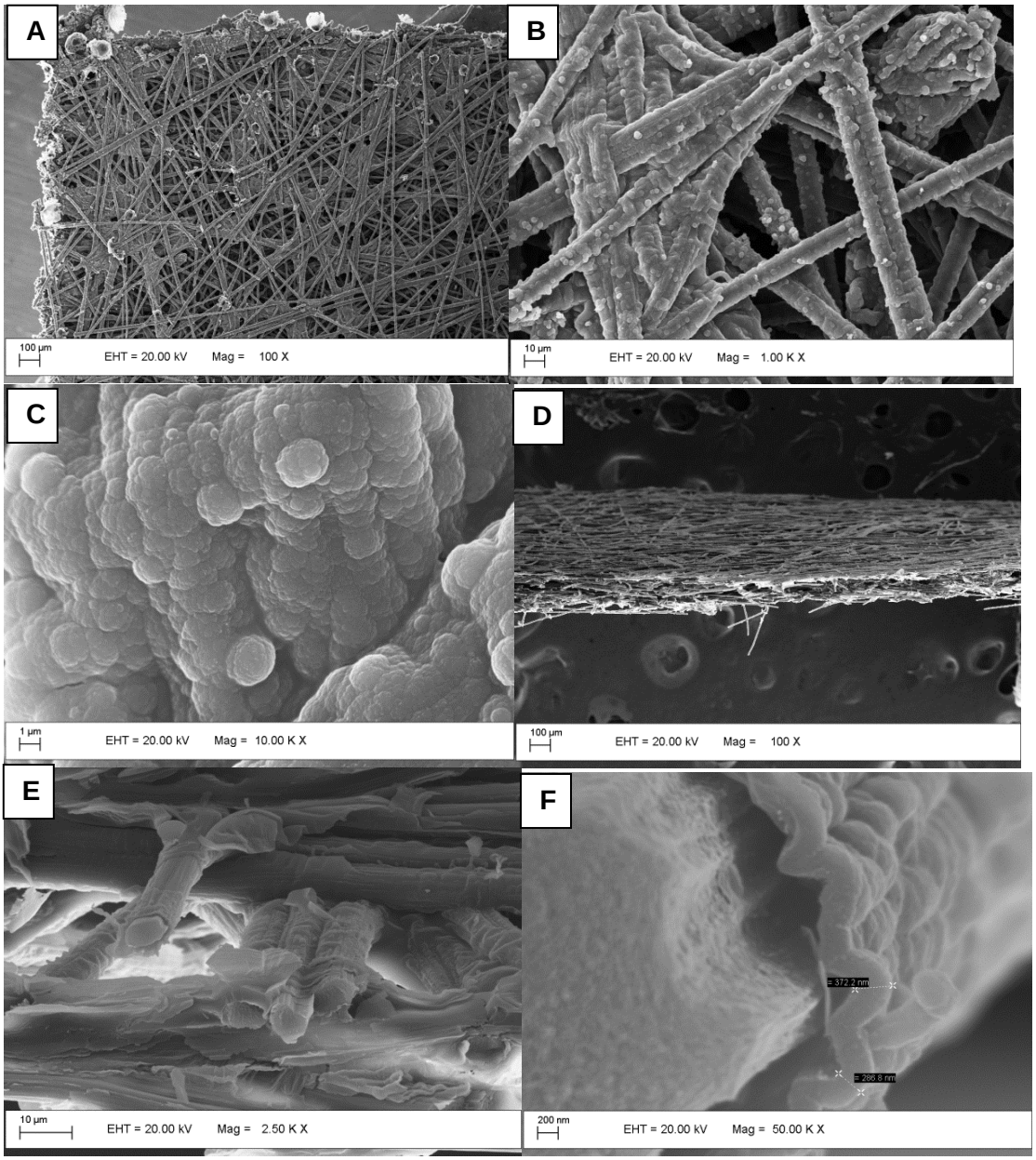
4.3 MICROSCOPIA DO FILME POLIMÉRICO (Poli-VM+Poli-PYR)

Outra técnica utilizada na caracterização do filme de verde de metileno com polipirrol foi a microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de verificar a espessura e homogeneidade do filme. A figura 30 mostra a Microscopia de varredura do filme de (poli-VM - poli-PYR).

A figura 30 mostra diferentes aproximações do filme de eletropolimerização simultânea do verde de metileno com pirrol. A figura 30 (f) apresenta uma espessura média do filme de 329 nm. Há estudos com filmes de poli-PYR na faixa de 90 até 8000

nm de espessura [165], portanto, o filme obtido é relativamente fino. Além disso, o filme se mostrou homogêneo e uniforme, com boa cobertura da superfície do eletrodo.

Figura 30. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do filme de eletropolimerização simultânea do verde de metileno com pirrol em diferentes aproximações.

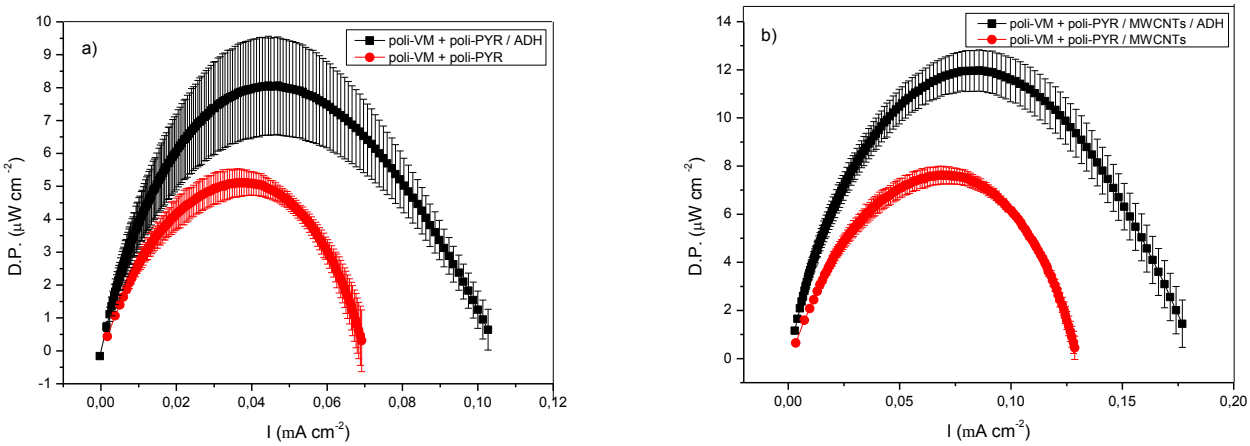


Fonte: Autoria Própria

4.4 ESTUDOS COMPARATIVOS DE DENSIDADE DE POTÊNCIA ENTRE OS FILMES poli-VM + poli-PYR e (poli-VM-poli-PYR)

Na figura 31 são apresentadas as curvas de densidade de potência (D.P.) obtidas para o sistema poli-VM+poli-PYR-ADH/NAD^+ | $Pt_{E\text{-}TEK}$ com e sem MWCNT. A figura 31A, na ausência de MWCNT, mostra que os valores médios máximos encontrados para a D. P. e potencial de circuito aberto (PCA) na ausência da enzima foi de 5 ± 1 μW cm^{-2} e 0,265 ± 0,010 V, respectivamente. Na presença da enzima os valores foram de 8 ± 3 μW cm^{-2} e 0,384 ± 0,021 V. Ao adicionar MWCNTs (figura 31B) com a finalidade melhorar a transferência eletrônica, os valores aumentaram respectivamente para 8 ± 2 μW cm^{-2} e 0,295 ± 0,013V, na ausência da enzima. Na presença da ADH, os valores foram de 12 ± 1 μW cm^{-2} e 0,401 ± 0,029V; ou seja, introduzir MWCNTs próximo à enzima apresenta uma ligeira melhora da transferência eletrônica e observa-se um aumento na densidade de potência e uma maior reprodutibilidade dos eletrodos. A tabela 3 mostra alguns valores de densidade de potência de bioânodos obtidos da literatura.

Figura 31. Curvas representativas de densidade de potência das semi-biocélulas a combustível EtOH/O_2 contendo ou não enzima ADH para o filme poli-VM+poli-PYR na plataforma de tecido de carbono (a) na ausência de MWCNTs e (b) na presença de MWCNTs. Meio reacional: Tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).



Fonte: Autoria Própria

Tabela 3. Comparação dos valores médios de densidade de potência e PCA para diferentes conformações de bioânodos com a literatura.

Bioânodo	**Combustível**	**PCA (V)**	**DP (μW/cm²)**	**Fonte**
VM + PAMAM + ADH/NAD^+	EtOH	0,720	280	[2]
VM + PAMAM + ADH/NAD^+ (36 bicamadas)	EtOH	-	60	[82]
VM + PAMAM + MWCNTs + ADH/NAD^+	EtOH	0,459	278	[83]
VM + MWCNTs + PAMAM +	EtOH	0,356	189	

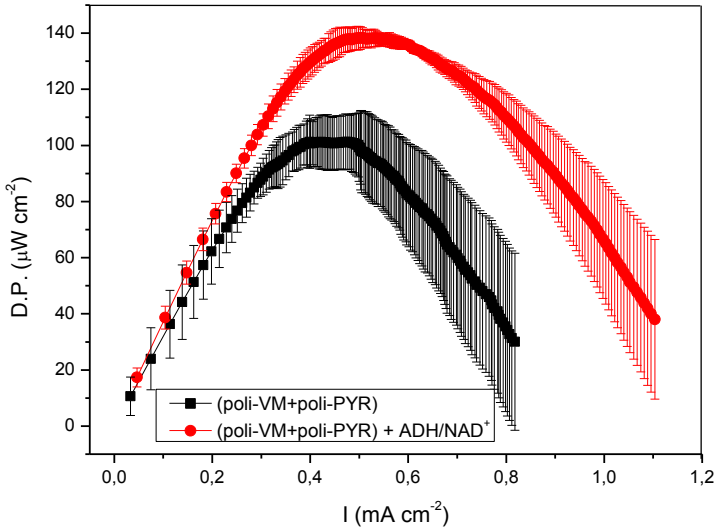
ADH/NAD^+				[83]
VM + PYR + MWCNTs + ADH/NAD^+	EtOH	0,224	24	
VM + MWCNTs + PYR + ADH/NAD^+	EtOH	0,186	29	
VM + PYR + ADH/NAD^+	EtOH	0,454	17	
VM + PAMAM + ADH/NAD^+	EtOH	0,371	5	

Verifica-se que os valores de densidade de potência para a biocélula poli-VM+poli-PYR-ADH/NAD^+│$Pt_{E\text{-}TEK}$ não foram muito significativos comparados com alguns valores apresentados na literatura [tabela 3], pois alguns apresentam valores na ordem de 10^2 μW cm^{-2}, apesar de outros (minoria) estarem na mesma faixa de grandeza. Esses valores baixos de densidade de potência mostram uma possível resistividade dos filmes que impede uma boa permeação do cofator da solução para ocorrer a transferência eletrônica na superfície do eletrodo.

Na figura 32 são apresentadas as curvas de densidade de potência (D. P.) obtidas para o sistema com eletropolimerização simultânea, (poli-VM-poli-PYR)-ADH/NAD^+│$Pt_{E\text{-}TEK}$. Aqui, os valores médios encontrados para a DP e PCA foram de 101,2 ± 12,7 μW cm^{-2} e 0,381 ± 0,011 V, respectivamente, para o sistema sem a enzima. Ao adicionar ADH os valores aumentaram respectivamente para 138,3 ± 20,3 μW cm^{-2} e 0,512 ± 0,038 V. O aumento da DP na presença da enzima para este filme foi expressivo, portanto, pode-se inferir, que a eletropolimerização simultânea do eletrocatalisador com o polímero condutor formou um filme onde o NADH tem uma boa permeação para ocorrer a transferência eletrônica gerando muito mais energia

(~38 µW cm^{-2}) em comparação com o filme em separado (4 µW cm^{-2}). Uma outra vantagem deste sistema pode ser vista quando se compara a faixa de corrente de operação da célula, pois o filme simultâneo apresenta correntes 10 vezes maiores.

Figura 32. Curvas representativas de densidade de potência das semi-biocélulas a combustível $EtOH/O_2$ contendo enzima ADH para o filme de eletropolimerização simultânea (poli-VM-poli-PYR). Meio reacional: Tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = $1cm^2$).

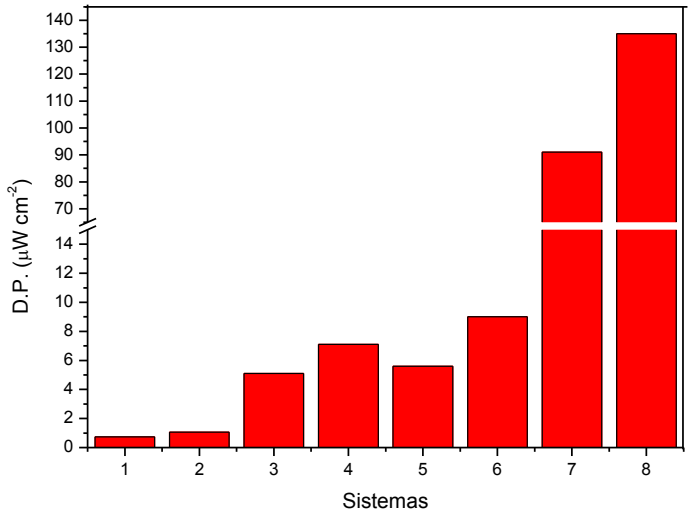


Fonte: Autoria Própria

Para visualizar melhor o efeito da matriz, na figura 33 é apresentada a comparação das densidades de potência dos diferentes sistemas para verificar a produção de energia pelo processo enzimático. Observa-se que a eletropolimerização simultânea do verde de metileno com o pirrol apresenta uma melhora muito significativa na densidade de potência, em comparação com os resultados obtidos com os filmes polimerizados separadamente (figura 31). Além disso, o filme apresenta uma alta densidade de potência mesmo na ausência da

enzima, sendo, então, a densidade de potência atribuída à enzima em torno de 40 μW cm^{-2}. A fim de verificar a reprodutibilidade do sistema, novos eletrodos foram feitos, utilizando as condições experimentais previamente otimizadas e descritas acima (ou seja, foram feitos da mesma maneira que os da figura 32), verificando-se um comportamento similar com os apresentados aqui.

Figura 33. Gráfico comparativo dos valores de densidade de potência máxima na presença e ausência da enzima ADH. 1 = poli-VM, 2 = poli-VM + ADH/ NAD^+, 3 = poli-PYR, 4 = poli-PYR + ADH/ NAD^+, 5 = poli-VM+poli-PYR, 6 = poli-VM+poli-PYR + ADH/ NAD^+, 7 = (Poli-VM-Poli-PYR), 8 = (Poli-VM- Poli-PYR) + ADH/ NAD^+. Meio reacional: PBS (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}; Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = $1cm^2$).



Fonte: Autoria Própria

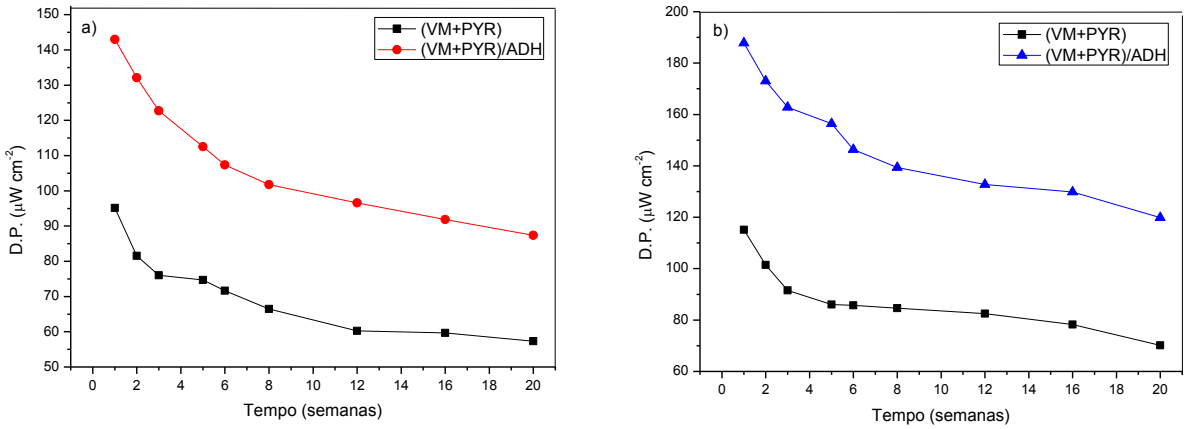
De acordo com esses resultados, observa-se que só o filme de eletropolimerização simultânea (VM-PYR), sem a enzima, já apresenta um aumento muito significativo na densidade de potência e corrente. Isso mostra que o próprio filme já tem uma boa atividade, boa estabilidade e que além de mediador é também

um eletrocatalisador, podendo ser utilizado em outros sistemas além de biocélulas, como em biosensores por exemplo.

4.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO FILME (poli-VM-poliPYR) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA ENZIMA ADH

Para verificar a eficiência dos eletrodos em função do tempo de estocagem, em outras palavras, verificar o tempo de vida do filme, testes de densidade de potência foram feitos semanalmente nos pHs 7,4 e 8,9 durante 20 semanas. A figura 34 mostra o estudo de estabilidade realizado. Em ambos os pHs investigados, verifica-se que houve uma queda durante a estocagem dos biofilmes em tampão (T = 5°C), sendo mais acentuada nas primeiras semanas. Para os filme na ausência da enzima ADH, (poli-VM-poli-PYR), registrou-se um decréscimo de 40% e 39%, em relação ao valor inicial, respectivamente para pH 7,4 e pH 8,9, indicando que o filme (poli-VM-poli-PYR) apresenta uma estabilidade moderada de estocagem nos tampões em ambos os pH. Quando se adiciona a enzima, (poli-VM-poli-PYR)/ADH, observa-se um decréscimo de 39% de 36% em relação ao valor inicial, para pH 7,4 e pH 8,9 respectivamente. Este valor é bem próximo ao decréscimo apresentado pelo filme na ausência da enzima, podendo ser atribuído, possivelmente, à degradação do filme (poli-VM-poli-PYR) durante o armazenamento da solução podendo-se, então, inferir que a enzima foi imobilizada de maneira eficiente. Para facilitar a visualização dos resultados, eles foram reunidos na tabela 4.

Figura 34. Estudo da estabilidade dos filmes (poli-VM+poli-PYR) com e sem enzima em função do tempo em (a) tampão fosfato (pH 7,4) e (b) tampão fosfato (pH 8,9).



Fonte: Autoria Própria

Tabela 4. Teste de estabilidade dos bioânodos (poli-VM-poli-PYR)/ADH

pH 7,4	**Semana 1**		**Semana 20**	
Sistema	**PCA (V)**	**D. P (μW cm^{-2})**	**PCA (V)**	**D.P (μW cm^{-2})**
poli-VM-poli-PYR | $Pt_{E\text{-}TEK}$	0,409 ± 0,010	95 ± 8	0,319 ± 0,001	57 ± 7
poli-VM-poli-PYR-ADH/NAD^+ | $Pt_{E\text{-}TEK}$	0,456 ± 0,018	143 ± 17	0,343 ± 0,035	87 ± 11
pH 8,9	**Semana 1**		**Semana 20**	
Sistema	**PCA (V)**	**D. P (μW cm^{-2})**	**PCA (V)**	**D.P (μW cm^{-2})**
poli-VM-poli-PYR | $Pt_{E\text{-}TEK}$	0,445 ± 0,074	115 ± 10	0,456 ± 0,057	70 ± 2
poli-VM-poli-PYR-ADH/NAD^+ | $Pt_{E\text{-}TEK}$	0,521 ± 0,009	188 ± 13	0,496 ± 0,049	120 ± 17

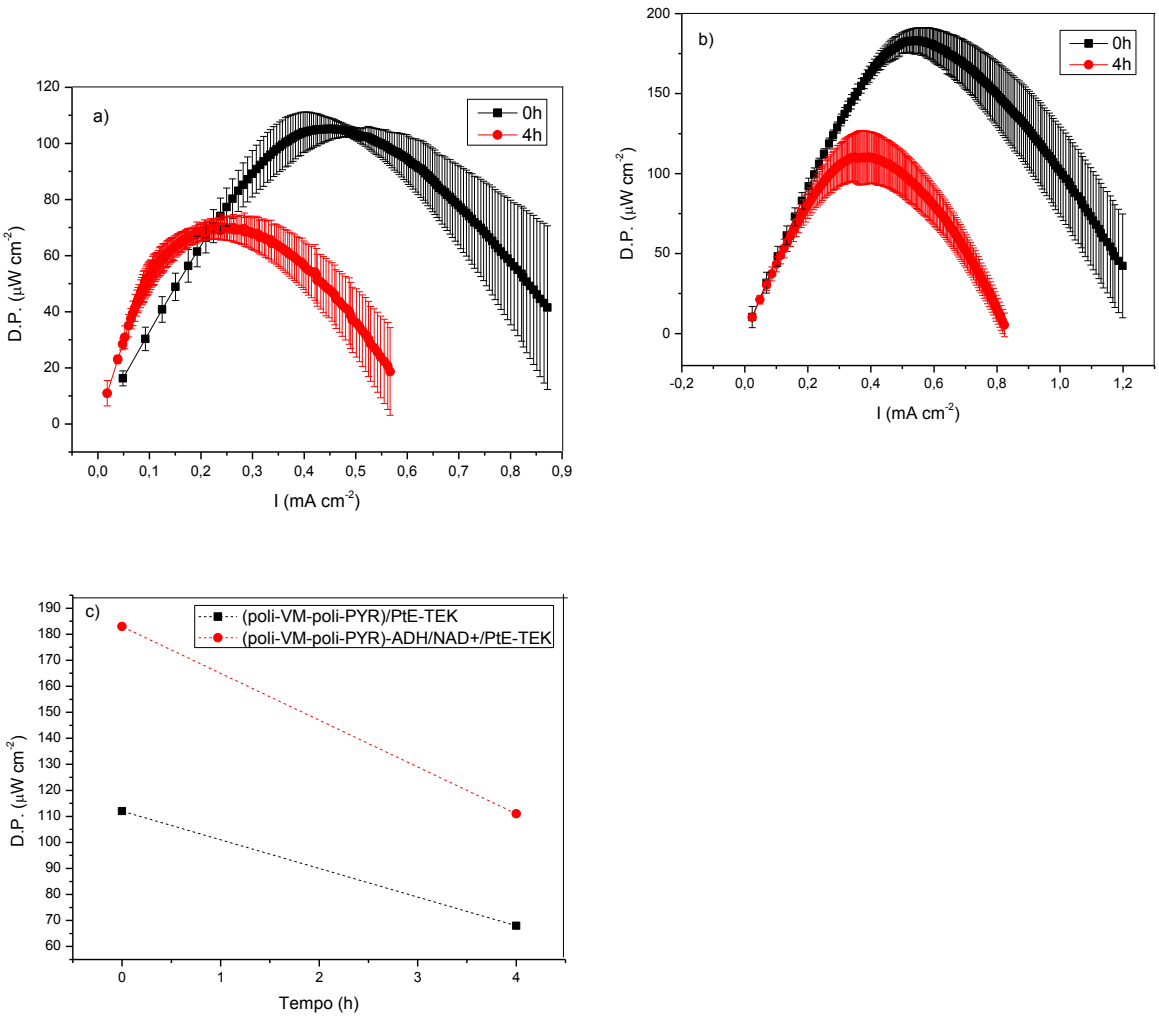
Moore, C. M. *et al* [103] realizaram testes de estabilidade de bioânodo contendo a enzima ADH imobilizada em Nafion modificado (o mesmo utilizado neste trabalho) sobre o verde de metileno. Ao invés de densidade de potência, eles mediram a estabilidade com testes de fluorescência a cada 5 dias, chegando na conclusão de que o eletrodo apresentou boa atividade catalítica e tempo de vida útil enzimático superior a 45 dias. Akers, N. L. *et al* [44] obtiveram um decréscimo de 6,1% da densidade de potência máxima nos primeiros 7 dias para o eletrodo contendo a enzima ADH e verde de metileno. O presente trabalho obteve a média de 8% de decréscimo, mostrando estar de acordo com valores encontrados na literatura.

Moore, C. M. *et al* [103] traz que tempos de vida superiores a 30 dias são necessários quando se considera a viabilidade dos eletrodos modificados por enzimas para uso como biossensores ou como eletrodos para biocélulas a combustível. O resultado obtido para o presente trabalho se mostra bastante atrativo já que apresenta valores satisfatórios de densidade de potência por 140 dias.

Além do teste de estabilidade em função do tempo de estocagem apresentada na Tabela 4, realizou-se também o teste de estabilidade com operação “contínua” no pH 8,9, já que nesse pH os eletrodos apresentaram maiores densidades de potência. Para tal, foram realizadas medidas de densidade de potência antes e após 4 horas de operação do bioânodo no potencial equivalente à metade do potencial de circuito aberto de cada eletrodo. A figura 35 e a tabela 5 mostram os valores obtidos para os eletrodos com e sem enzima. Verifica-se um decaimento de 39% da eficiência dos eletrodos. Na literatura temos um exemplo de bioânodo de biocélula a combustível utilizando a enzima ADH imobilizada com PAMAM sobre o verde de metileno que teve um funcionamento contínuo de eletrolise e não apresentou perda significativa de densidade de potência após 14h de operação [81]. No presente trabalho, apesar dos valores de densidade de potência serem muito bons, a estabilidade em operação

contínua ainda foi baixa. É necessário testar outros valores de potenciais (modo potenciostático) ou correntes (modo galvanostático).

Figura 35. Gráficos representativos das densidades de potências médias dos bioeletrodos com polimerização simultânea (poli-VM + poli-PYR) após 4h de operação (a) filme (poli-VM - poli-PYR), (b), bioânodos (poli-VM - poli-PYR)/ADH, (c) comparação da estabilidade entre sistemas. Meio reacional de tampão fosfato (pH 8,9), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).



Fonte: Autoria Própria

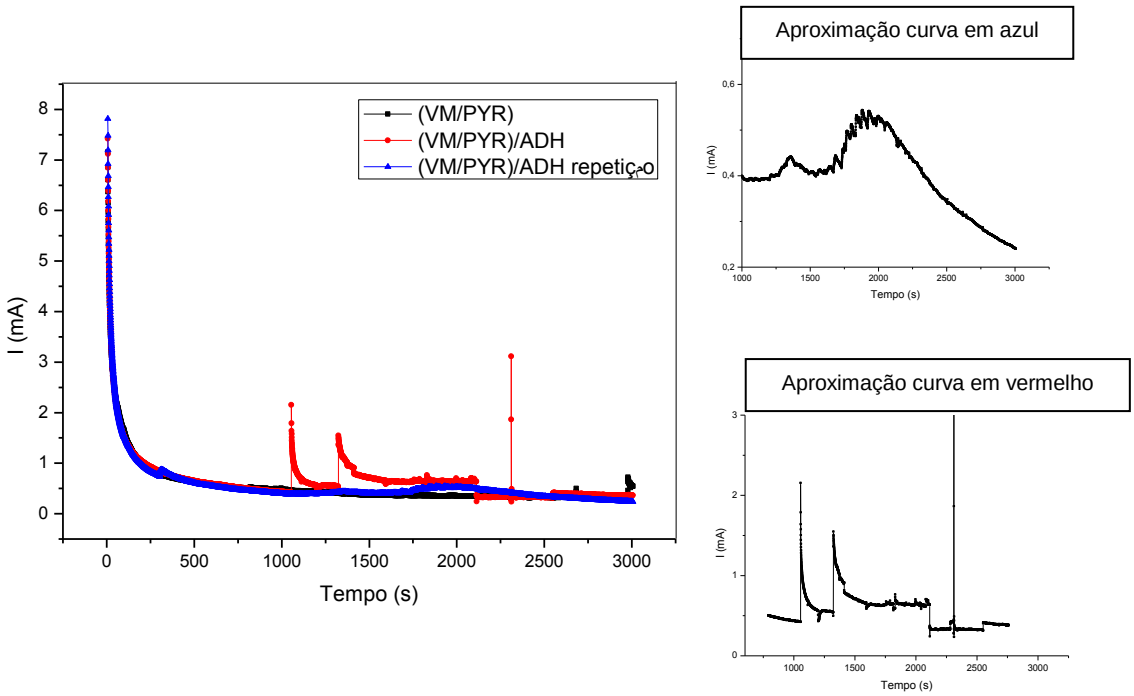
Tabela 5. Estabilidade dos bioânodos em sistema de operação contínua por 4 horas na ausência e presença da enzima ADH.

	t = 0h		t = 4h	
Sistema	**PCA (V)**	**D. P (μW cm^{-2})**	**PCA (V)**	**D. P (μW cm^{-2})**
(poli-VM-poli-PYR) $\vert$ $Pt_{E\text{-}TEK}$	0,462 $\pm$ 0,027	112 $\pm$ 9	0,399 $\pm$ 0,015	68 $\pm$ 8
(poli-VM-poli-PYR-ADH/NAD^+) $\vert$ $Pt_{E\text{-}TEK}$	0,488 $\pm$ 0,009	183 $\pm$ 10	0,447 $\pm$ 0,012	111 $\pm$ 11

4.6 ESTUDOS CRONOAMPEROMÉTRICOS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA ADH DO FILME (poli-VM-poli-PYR)

Com a finalidade de visualizar melhor a bioeletrocatálise do etanol no sistema preparado, realizou-se estudos cronamperométricos com um potencial de oxidação fixo (0,6 V) aumentando gradualmente a concentração de etanol na solução eletrolítica (3 mmol/min). A figura 36 mostra os resultados obtidos dessa adição. Observa-se que a reprodutibilidade do teste é baixa, já que os testes na presença da enzima (curvas coloridas) não foram muito similares. Apesar disso, houve um aumento na corrente, ainda que de maneira irregular, com a adição de etanol no meio reacional nos eletrodos com presença da enzima provando a funcionalidade da enzima ADH utilizada. A concentração de etanol saturou em 115 $\pm$ 10 mmol aproximadamente.

Figura 36. Teste cronoamperométrico de adição de etanol (3 mmol/min). Comparação entre os eletrodos com e sem enzima ADH. Potencial: 0,6 V. Meio reacional: Tampão fosfato pH 7,4.



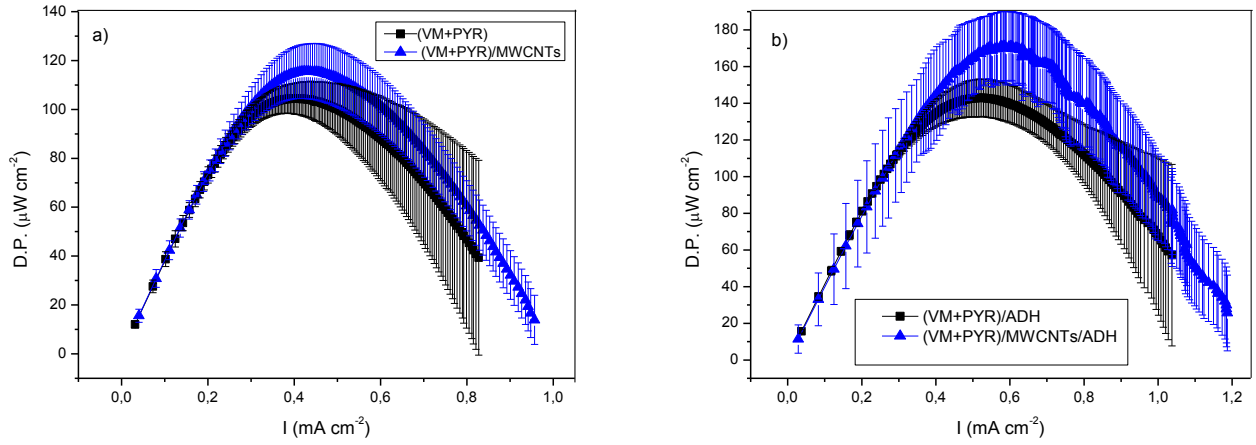
Fonte: Autoria Própria

4.7 ESTUDO/INVESTIGAÇÃO DA DENSIDADE DE POTÊNCIA DO FILME (POLI-VM - POLI-PYR)/ADH NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE MWCNTs em pH 7,4 e pH 8,9

Os nanotubos de carbono são muito conhecidos por serem materiais resistentes, flexíveis e apresentarem alta condutividade, conforme já dito na introdução deste trabalho. Sendo assim, podem ser utilizados com a finalidade de melhorar a transferência eletrônica do sistema [83]. Portanto, realizou-se testes de densidade de potência sempre em triplicata, em meio de etanol 100 mmol; com presença e ausência de MWCNTs. A figura 37 apresenta os resultados obtidos em pH fisiológico (7,4). Os valores médios encontrados para a DP e PCA para o sistema (poli-VM-poli-PYR) foram de 102 $\pm$ 8 µW cm^{-2} e 0,403 ± 0,053V, respectivamente, na figura (a). Com adição de MWCNTs sobre o filme de eletropolimerização simultânea, os valores foram 115 $\pm$ 11 µW cm^{-2} e 0,413 ± 0,009V. Verifica-se que a adição dos MWCNTs na

ausência da ADH não melhorou significativamente a densidade de potência, corrente e/ou o potencial de circuito aberto. Com a adição da enzima ADH (b) observa-se o mesmo comportamento, isto é, tem-se 143 ± 11 μW cm^{-2} e 0,442 ± 0,070 V e na presença de MWCNTs foi de 155 ± 16 μW cm^{-2} e 0,461 ± 0,033 V. A combinação de nanotubos de carbono (MWCNTs) sobre o filme mediador, além de reduzir o sobrepotencial para a oxidação do NADH, aumenta a densidade de sítios eletrocatalíticos ativos via aumento da área superficial e facilita a adsorção destas enzimas sobre a superfície do eletrodo [80, 83]. Entretanto, no sistema, verifica-se que não houve melhora significativa na densidade de potência com a adição do nanotubo de carbono; podendo ser devido à arquitetura do bioânodo que não favoreceu.

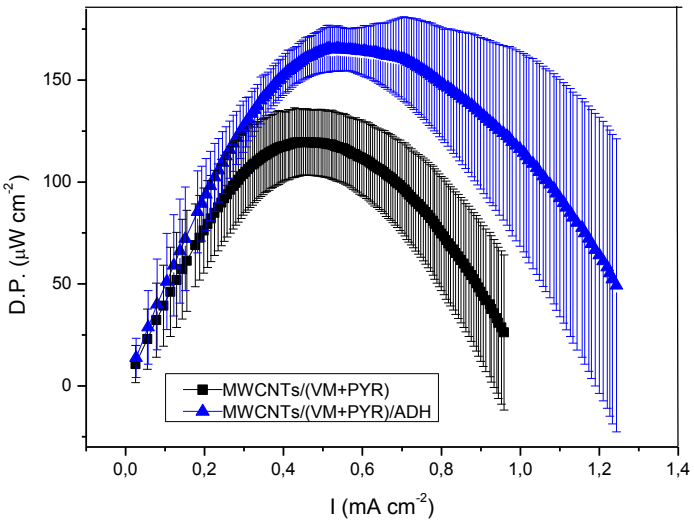
Figura 37. Gráficos representativos das densidades de potências médias dos eletrodos com polimerização simultânea (poli-VM + poli-PYR) na (a) comparação entre os brancos na ausência e presença de MWCNTs, (b) comparação entre os eletrodos com enzima na ausência e presença de MWCNTs. Meio reacional de tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).



Fonte: Autoria Própria

Para tentar uma melhora na transferência eletrônica com a utilização de nanotubos de carbono, repetiu-se os testes, porém depositando MWCNTs antes da deposição do filme de (poli-VM-poli-PYR), ou seja, sobre o papel de carbono. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 38. A análise da Figura 38 mostra que os valores médios encontrados para a DP e PCA, empregando o sistema MWCNTs/(poli-VM-poli-PYR), na ausência de enzima (a) foi de 120 $\pm$ 15 µW cm^{-2} e 0,399 ± 0,088V, respectivamente. Na presença de ADH (b) foi de 164 $\pm$ 13 µW cm^{-2} e 0,476 ± 0,061V. Comparando a figura 38 com a figura anterior (37), houve uma ligeira melhora na densidade de potência e corrente com essa disposição do nanotubo de carbono no eletrodo. Além disso, observa-se um aumento de cerca de 21 µW cm^{-2} com a adição do nanotubo de carbono em comparação com eletrodos com enzima na ausência dele. Este aumento se deve provavelmente a uma melhora na rugosidade do filme devido à presença do MWCNT.

Figura 38. Comparação entre as densidades de potências médias dos eletrodos com MWCNTs + (poli-VM + poli-PYR) na ausência e presença da ADH. Meio reacional de tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L-1 e EtOH 100 mmol L-1 como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: tecido de carbono (área = 1 cm^2).



Fonte: Autoria Própria

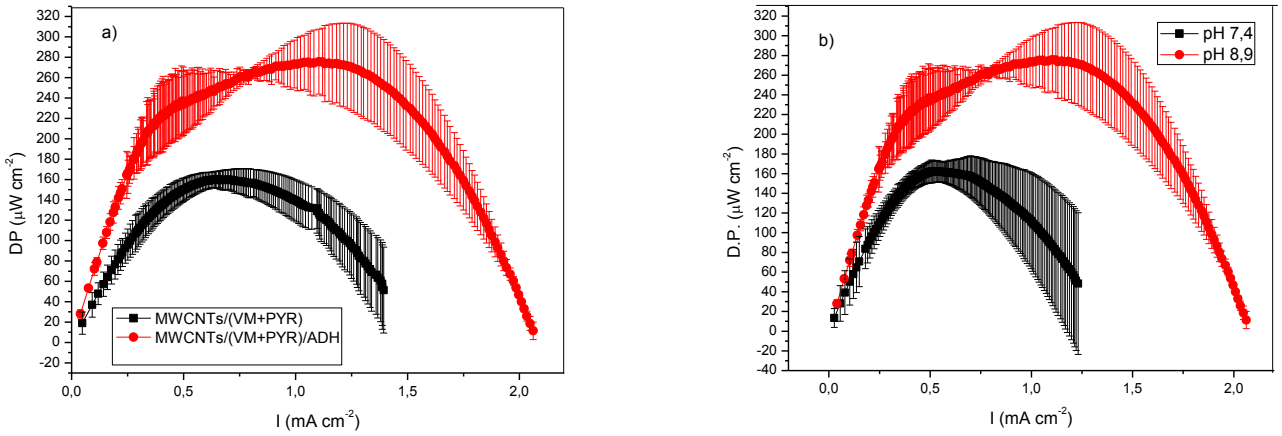
Com a adição do nanotubo, a superfície base (do eletrodo suporte), provavelmente, ficou mais rugosa, com uma área superficial maior e mais condutora. Assim, ao eletropolimerizar o filme sobre essa superfície, ele também ficou mais rugoso, com uma área superficial maior e mais condutor, facilitando ainda mais a transferência eletrônica e a imobilização da enzima.

Observa-se que os valores obtidos para o bioânodo (poli-VM - poli-PYR) estão superiores ou próximos a muitos resultados (literatura) da tabela 2, mostrando que o bioânodo produzido apresenta valores interessantes e em concordância com bons resultados apresentados na literatura e possivelmente poderão ser empregados para construção de dispositivos de baixa demanda energética.

Segundo a Sigma-Aldrich, o pH ótimo da enzima ADH é 8,9, assim foi investigada a operação dos bioânodos neste pH na presença de MWCNTs antes da deposição do filme. A figura 39 apresenta as densidades de potência do filme polimerizado sobre os nanotubos de carbono na ausência e presença da enzima. Na ausência da ADH, obteve-se uma densidade de potência e PCA de 160 $\pm$ 7 μW cm^{-2} e 0,409 ± 0,033 V respectivamente, e na presença da enzima, 275 $\pm$ 12 μW cm^{-2} e 0,503 ± 0,025 V. Verifica-se então, uma melhora bastante significativa neste pH, em comparação com o pH 7,4 mostrado na figura anterior. Os valores obtidos para esse pH são bastantes significativos quando comparado com a literatura (Tabela 3), com atividade enzimática na ordem de 115 μW cm^{-2}. O nanotubo se mostrou muito eficiente na melhoria da transferência eletrônica e aumento da área superficial, deixando o filme (poli-VM+poli-PYR) mais rugoso, com maior área, facilitando a imobilização enzimática, assim como o teste anterior para o pH 7,4.

Neste pH também foram realizadas medidas adicionado o MWCNTs sobre o filme (poliVM-poliPYR) porém não houve melhora muito significativa na ausência e presença da enzima (resultados não apresentados).

Figura 39. Curvas representativas das densidades de potências médias dos eletrodos com polimerização simultânea MWCNTs / (poli-VM - poli-PYR) sendo (a) comparação na ausência e presença de ADH em pH 8,9 e (b) comparação entre os pH estudados (7,4 e 8,9). Meio reacional de tampão fosfato, NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}. (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).



Fonte: Autoria Própria

A fim de facilitar a visualização dos resultados obtidos nos testes de densidade de potência, a tabela 6 mostra esses resultados para os diferentes bioânodos estudados em ambos os pH.

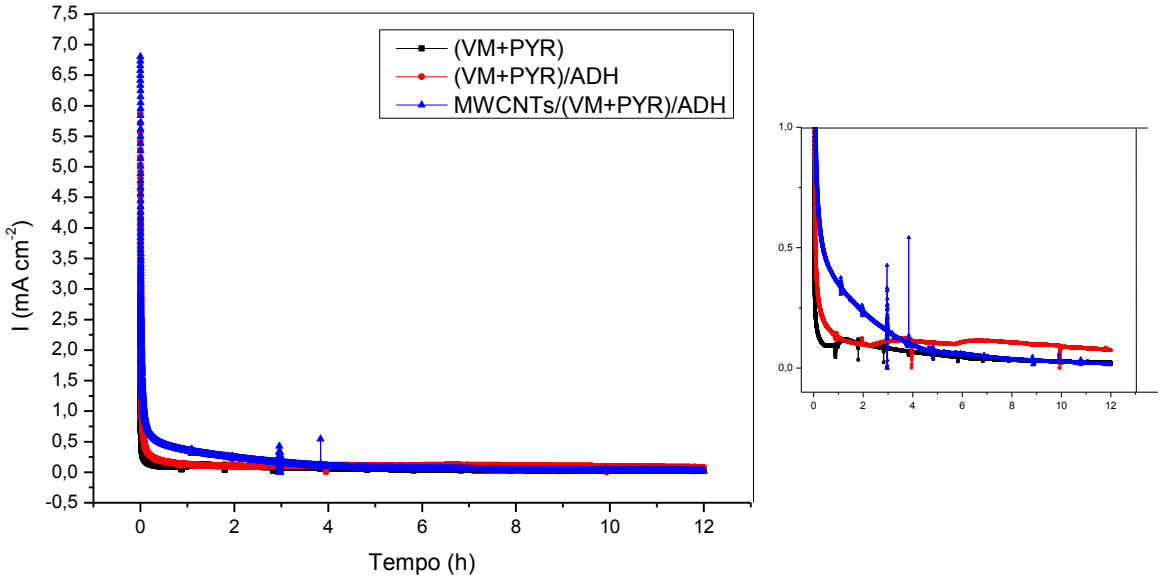
Tabela 6. Valores médios obtidos do teste de densidade de potência dos diferentes sistemas de bioânodos na ausência e presença de enzima(s) e MWCNTs

Sistema	pH	PCA (V)	I_f (mA cm^{-2})	DP (μW cm^{-2})
(poli+VM-poli-PYR)|$Pt_{E\text{-}TEK}$	7,4	0,403 ± 0,033	0,827 ± 0,033	101 ± 8
(poli+VM-poli-PYR)- MWCNTs|$Pt_{E\text{-}TEK}$	7,4	0,413 ± 0,009	0,957 ± 0,025	115 ± 11
(poli+VM-poli-PYR)-ADH/NAD^+|$Pt_{E\text{-}TEK}$	7,4	0,442 ± 0,070	1,109 ± 0,126	143 ± 10
(poli+VM-poli-PYR)-MWCNTs/ADH/NAD^+|$Pt_{E\text{-}TEK}$	7,4	0,461 ± 0,033	1,190 ± 0,083	155 ± 16
MWCNTs -poli-VM-poli-PYR|$Pt_{E\text{-}TEK}$	7,4	0,399 ± 0,088	1,040 ± 0,077	120 + 15
MWCNTs-(poli+VM-poli-PYR)/ADH/NAD^+|$Pt_{E\text{-}TEK}$	7,4	0,476 ± 0,061	1,240 ± 0,069	164 ± 13
(poli+VM-poli-PYR)|$Pt_{E\text{-}TEK}$	8,9	0,456 + 0,057	0,872 ± 0,26	115 ± 10
(poli+VM-poli-PYR)-ADH/NAD^+|$Pt_{E\text{-}TEK}$	8,9	0,488 + 0,009	1,200 ± 0,056	183 ± 10
MWCNTs -(poli+VM-poli-PYR)|$Pt_{E\text{-}TEK}$	8,9	0,409 ± 0,033	1,390 ± 0,043	160 ± 7
MWCNTs-(poli+VM-poli-PYR)/ADH/NAD^+|$Pt_{E\text{-}TEK}$	8,9	0,503 ± 0,025	2,060 ± 0,071	275 ± 12

4.8 ELETRÓLISE E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR HPLC

Outra forma interessante de analisar a funcionamento do bioânodo é realizar eletrólises com posterior análise dos produtos gerados e o consumo dos substratos por HPLC. Foram feitos testes com várias configurações de bioânodos (VM, PYR, (VM-PYR), na ausência e presença de MWCNT). A figura 40 mostra as eletrólises dos bioânodos que apresentaram formação de acetaldeído. O sistema com MWCNTs apresentou variação mais significativa da corrente em função do tempo. As curvas amperométricas para os eletrodos contendo a enzima imobilizada apresentaram valores maiores de densidade de corrente em comparação com o branco (ausência da enzima) comprovando que a enzima imobilizada no bioânodo está realmente funcionando, o que indica, possivelmente, a ocorrência da oxidação do etanol com subsequente formação de produtos.

Figura 40. Curva de corrente versus tempo medida durante a eletrólise (12h) de etanol (50 mmol) para os bioânodos na ausência e presença da enzima ADH bem como a ausência e presença de MWCNT. Potencial aplicado: 0,6 V. Eletrólito utilizado: tampão fosfato, pH = 8,9. Temperatura = 19º C.

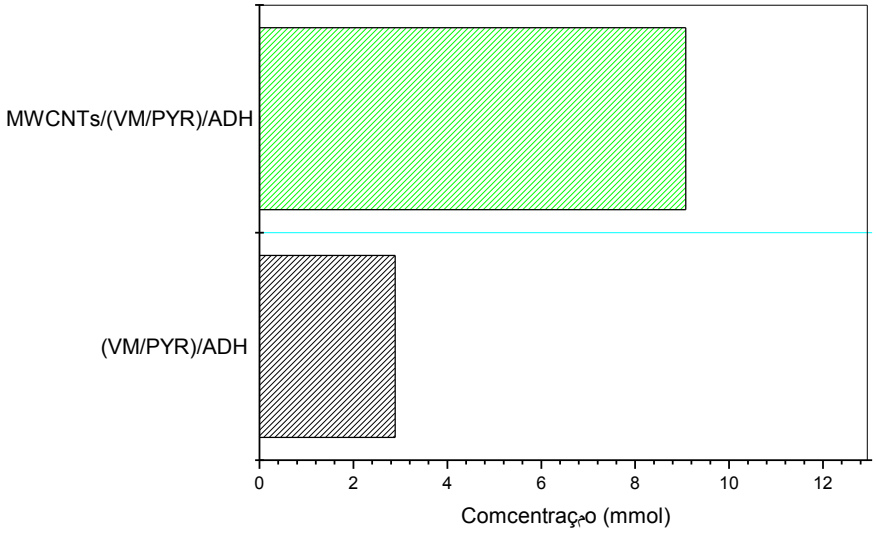


Fonte: Autoria Própria

A figura 41 mostra a concentração de acetaldeído obtido pela integração dos picos cromatográficos após as 12 horas de eletrólise no pH 8,9. Todas as medidas realizadas no tempo zero detectaram apenas os picos referentes ao etanol e ao tampão utilizado. Apenas em dois sistemas dos diversos estudados obteve-se a formação de acetaldeído depois de 12 horas de eletrólise, (VM-PYR)/ADH e MWCNTs/(VM-PYR)/ADH. No melhor sistema investigado MWCNTs/(VM-PYR)/ADH e pH 8,9, obteve-se 9,08 mmol/L de acetaldeído formado que corresponde a 25% de etanol oxidado, obtendo-se um balanço de massa de 71%. Esses resultados corroboram com a maior densidade de potência obtida para esse sistema. Já para o bioânodo na ausência de MWCNT, sistema (VM-PYR)/ADH obteve-se 2,89 mmol/L de

acetaldeído. O balanço de massa para esse sistema foi de 30%. É importante lembrar que pode haver perda de acetaldeído por volatização durante a eletrólise e medidas de HPLC, mesmo com o ambiente climatizado, a célula utilizada estando vedada e a temperatura de análise sendo de 19º C. Além disso, a membrana da célula é porosa, podendo haver passagem de etanol para o lado do cátodo (análise não realizada). Para melhor visualização, os resultados obtidos estão resumidos na tabela 7.

Figura 41. Concentração do produto obtido durante a eletrólise (12h) para os sistemas na presença e ausência de MWCNTs. Etanol 50 mmol L^{-1}, pH 8,9, Eap = 0,6 V vs Ag/AgCl



Fonte: Autoria Própria

Tabela 7. Resultados obtidos das eletrólises (12h) de etanol (50 mmol/L) empregando bioânodos na presença e ausência de MWCNT em pH 8,9 a 0,6V vs Ag/AgCl

Eletrodo	Consumo de etanol (%)	Formação de acetaldeído (%)	Balanço de massa (%)	Eficiência Faradaica (%)
(VM-PYR)/ADH	19,7	5,8	30	22
MWCNTs/ (VM-PYR)/ADH	25,04	18,2	71	44
VM/MWCNTs/ADH [154]	4,04	3,3	81	64

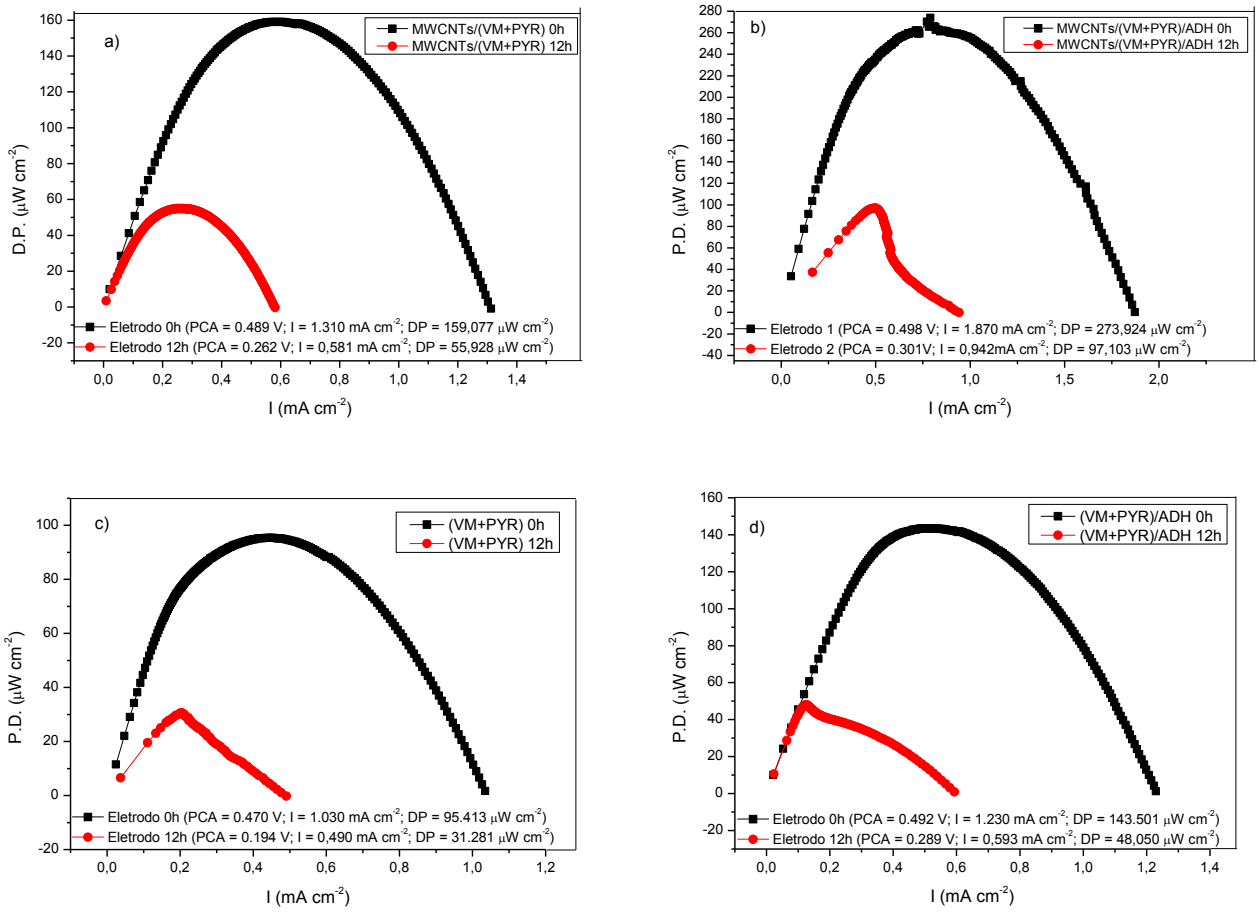
Comparando os resultados obtidos neste trabalho, com o descrito na literatura, [154] observa-se que o consumo de etanol foi maior, assim como a formação de acetaldeído. Embora o balanço de massa e eficiência faradáica sejam menores, devido, possivelmente, à perda de acetaldeído e/ou etanol, os valores obtidos mostram que a biocatálise está operando de forma relativamente eficiente e a produção em um sistema de biocélula a combustível de etanol pode ser promissora.

Para todas as eletrólises com a presença do poli-PYR realizadas observou-se a eluicão de dois produtos com tempo de retenção de 25-26 minutos. A atribuição deste pico não foi realizada. Muito provavelmente esses picos são devido à oxidação do pirrol e/ou difusão do monômero já que foram observados quando se realizou uma eletrólise para o sistema contendo apenas o filme de polipirrol no eletrólito de suporte. Esta pode ser uma possível explicação para a perda de estabilidade do filme e diminuição da densidade de potência com o tempo conforme mostrado na figura 34.

Para verificar a estabilidade do sistema após a eletrólise (12 horas de operação continua da bioânodo), realizou-se medidas de densidade de potência no pH 8,9 para os diversos sistemas investigados. A figura 42 apresenta as curvas de densidade de potência médias obtidas com os bioanodos preparados com a imobilização da enzima (para os sistemas que apresentaram formação de acetaldeído) e com os filmes (branco). Para os sistemas na ausência de MWCNTs, a perda de densidade de potência média foi de 66% enquanto que na presença dele foi de 64%. Esse valor foi

maior do que o trabalho comparado [154], onde a perda foi de 50%. Porém a densidade de potência deles foi bem menor; 29,5 ± 3,4 μW cm^{-2} para 15,5 ± 1,8 μW cm^{-2} depois de 12 horas de eletrólise, enquanto os valores do presente trabalho vão de 95 – 274 μW cm^{-2} iniciais para 32-97 μW cm^{-2} depois de 12 horas.

Figura 42. Densidades de potência antes e após a eletrólise de 12h. a) MWCNTs/(VM-PYR), b) MWCNTs/(VM-PYR)/ADH, c) (VM-PYR e d) (VM-PYR)/ADH. Meio reacional de tampão fosfato (pH 8,9), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).

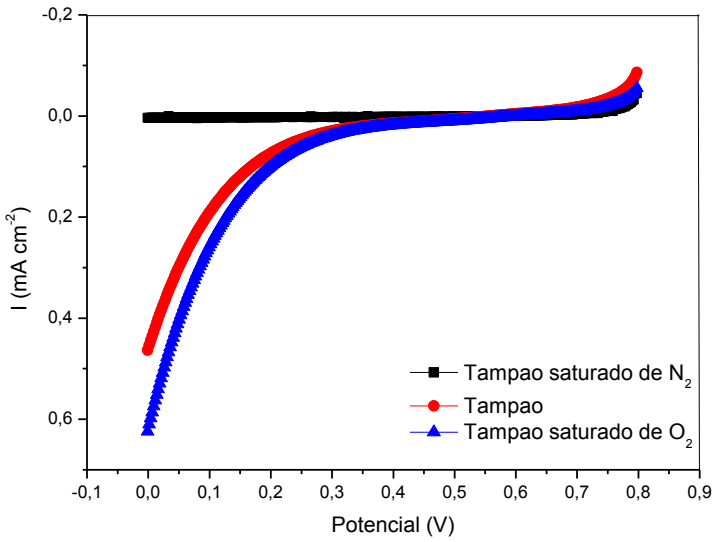


Fonte: Autoria Própria

4.9 PREPARO E ANÁLISE DO BIOCÁTODO COM ENZIMA LACASE

Para aproveitar um biocátodo já obtido com sucesso pelo próprio grupo de trabalho [150], a enzima escolhida para reduzir o oxigênio foi a Lacase. Mas antes de construir a biocélula completa, verificou-se a funcionalidade dessa enzima, em um biocátodo construído de acordo com o procedimento já descrito na literatura [152]. Realizou-se o teste de redução de oxigênio no pH ideal da atividade enzimática da Lacase, 5,0. O resultado obtido está apresentado na figura 43. O biocátodo (MWCNT-Ac/Lacase) apresenta um aumento da corrente catódica na presença de O_2 típico da redução do O_2 do meio pelo lacase [166]. O aumento da corrente catódica é maior na presença de oxigênio (tampão sem desaerar) e ainda maior quando tem-se saturação da solução com O_2 indicando a redução do mesmo (curvas coloridas). Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura [166] e comprova o funcionamento da enzima imobilizada no biocátodo.

Figura 43. Redução de O_2 pela enzima Lacase imobilizada no biocátodo MWCNT-Ac/Lacase. Meio reacional: Tampão citrato pH 5,0, Eletrodo suporte: Papel de carbono, A= 1cm^2



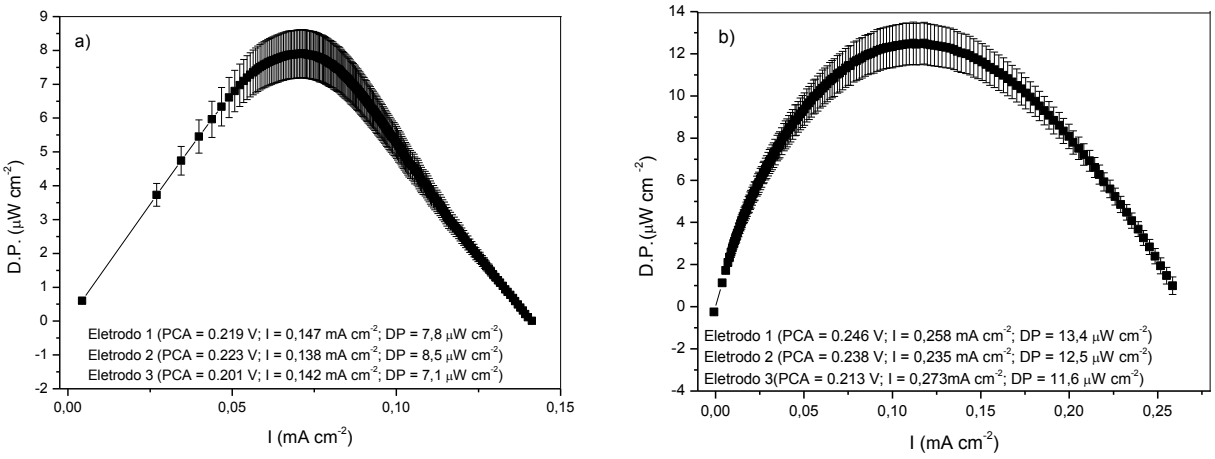
Fonte: Autoria Própria

4.10 TESTE COM UMA BIOCÉLULA COMPLETA NA AUSÊNCIA DE MEMBRANA (poli-VM+poli-PYR)/ADH/NAD^+ /etanol,Lacase/O_2

Em células na ausência da membrana polimérica, as perdas ôhmicas, cruzamento de combustíveis, problemas de incrustação devido à membrana são amenizados (ou até eliminados), e o tamanho da célula pode ser bastante reduzido, apesar da eficiência ser menor comparado às células com membrana [167]. O primeiro relato de uma biocélula a combustível sem membrana é de 1997 onde a redução de O_2 no biocátodo e a oxidação de compostos orgânicos no bioânodo ocorriam sumultaneamente em um único compartimento [11]. Como a ADH funciona melhor em meio básico (pH 8,9) e a Lacase em meio ácido (pH 5,0), o teste precisava ser feito em um pH intermediário, e como na literatura há um trabalho [153] que mostra o pH intermediário ideal entre as curvas dos pH ótimos dessas duas enzimas, optou-se por fazer nesse mesmo pH, ou seja, 6,5.

Realizou-se as medidas de densidade de potência da biocélula a combustível completa, contendo a enzima Lacase no cátodo e (VM-PYR)/ADH no ânodo. A figura 44 mostra os resultados obtidos na presença e ausência de MWCNTs no bioânodo. Os valores médios de densidade de potência e PCA obtidos para biocélula completa com o bioânodo (poli-VM-poli-PYR)/ADH foram de 7,8 +0,7 μW cm^{-2} e 0,210 ± 0,010 V. Os resultados para a biocélula completa com o bioânodo MWCNTs/(poli-VM-poli-PYR)/ADH foram de 12,5 ± 0,9 μW cm^{-2} e 0,232 ± 0,017 V. Observa-se que a presença do nanotubo tanto no biocátodo quanto no bioânodo foi mais eficiente que na ausência dele no eletrodo, apresentando um aumento da densidade de potência de 1,5 vezes.

Figura 44. Densidade de potência da biocélula a combustível completa na ausência de membrana a) bioânodo: (poli-VM-poli-PYR)/ADH, b) bioânodos: MWCNTs (poli-VM-poli-PYR)/ADH. Biocátodo: MWCNTs-Ac/Lacase. Meio reacional de tampão fosfato (pH 6,5), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1}.Suporte eletródico: tecido de carbono (área = 1cm^2).



Fonte: Autoria Própria

A tabela 8 mostra valores obtidos para algumas biocélulas a combustível sem membrana presentes na literatura, sendo que os dois últimos valores se referem aos resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 8. Valores médios de densidade de potência e PCA para diferentes conformações de biocélulas a combustível sem membrana presentes na literatura

Biocélula a combustível	**Bioânodo**	**Biocátodo**	**PCA (V)**	**DP (μW/cm^2)**	**Fonte**
Etanol/ O_2	MDB/AuNPs/PSSG-CHI-ADH	AuNPs/PSSG–CHI-laccase	0,860	1560	[168]
Etanol/ O_2	VM/CHIT/MWCNTs/NAD+/ADH	MWCNTs/PBSE/Lacase	0,618	22	[169]

Etanol/ O_2	$FcMe_2$-C_3-LPEI/MWCNTs-Au/PQQ-ADH	MWCNTs-Ac/BOx	0,657	85	[170]
Etanol/ O_2	VM/MWCNTs-Au/NAD^+-ADH	MWCNTs-Ac/BOx	0,560	111	
Etanol/ O_2	QH-ADH	AOx-MP-8	0,240	1,5	[171]
Etanol/ O_2	VM/PAMAM/MWCNTs-ADH	polyPYR-Os-Laccase (without ABTS)	0.226	20.96	[153]
Etanol/ O_2	VM/PAMAM/MWCNTs-ADH	polyPYR-Os-Laccase (with ABTS)	0.148	15.29	
Etanol/ O_2	VM/PAMAM/MWCNTs-ADH	polyPYR-Ru-Laccase (without ABTS)	0.170	13.52	
Etanol/ O_2	VM/PAMAM/MWCNTs-ADH	polyPYR-Ru-Laccase (with ABTS)	0.048	2.682	
Etanol/ O_2	**(VM/PYR)/ADH**	**MWCNTs-Ac/Lacase**	**0,210**	**7,8**	
Etanol/ O_2	**MWCNTs/(VM/PYR)/ADH**	**MWCNTs-Ac/Lacase**	**0,232**	**12,5**	

Analisando a tabela 8, observa-se que os valores variam bastante, mostrando que os resultados obtidos no presente trabalho estão dentro da faixa apresentada. Além disso, a arquitetura dos bioeletrodos utilizada neste trabalho é mais simples que outras presentes nessa tabela (como a do primeiro trabalho da tabela, [168] por exemplo) e não foi utilizado sistema de fluxo contínuo (como na segunda referência [169]) Os valores de pH desses trabalhos variam entre pH 6-7. Ao comparar o presente trabalho com outros valores de DP e PCA que utilizou exatamente o mesmo pH (6,5) [153], verifica-se que os valores obtidos foram relativamente próximos ou até maiores (no caso do PCA), indicando que está dentro do que vem sendo obtido na literatura.

5. CONCLUSÕES

A eletropolimerização simultânea do filme condutor (pirrol) com o eletrocatalisador/mediador (verde de metileno) mostrou uma atividade para a eletro-oxidação de NADH bem como na formação do bioânodo para oxidar etanol muito mais efetiva do que a formação dos filmes em separado. A definição do pico de NADH e o ganho energético de cerca de 200 mV para valores mais negativos de potencial de oxidação do NADH, evidencia a boa atividade catalítica deste filme. A formação deste filme composto é uma proposta inédita o que o habilita para seu uso em dispositivos do tipo de biocélula a combustível e também em outros sistemas como biosensores por exemplo, já que o próprio filme sem a presença da enzima mostrou uma alta densidade de potência (~100 μW cm^{-2}).

A caracterização do filme por MEV mostra que o mesmo tem uma espessura relativamente fina (329 nm) e homogênea, com uma boa cobertura do eletrodo. Em relação à estabilidade dos bioânodos, realizou-se as medidas de densidade de potência durante 20 semanas, obtendo-se um decaimento médio de 36% do valor inicial em pH 8,9 e 39% em pH 7,4, demonstrando a boa estabilidade do sistema. Estudos na ausência da enzima ADH mostraram ser o filme catalítico e o condutor o responsável pela perda de atividade. Já para a estabilidade contínua, com o eletrodo operando durante 4 horas, o decaimento foi de 39% e 66% para 12 horas de operação em pH 8,9.

Os valores de densidade de potência foram satisfatórios (~143 μW cm^{-2}) e apresentaram aumentos ainda mais significativos em pH 8,9 (~188 μW cm^{-2}), já que é o pH ideal da enzima ADH. Estes foram acrescidos com a adição de MWCNTs sobre o suporte de carbono, antes da deposição do filme, obtendo-se uma densidade de potência máxima média da ordem de 275 μW cm^{-2}, mostrando um resultado bem interessante frente a outros trabalhos que vem sendo publicados na literatura. Os testes de eletrólise mostraram resultados positivos para os sistemas (VM-PYR)/ADH na ausência e presença de MWCNTs, sendo o resultado mais significativo para o

segundo sistema (com a adição de nanotubo); onde 18% do etanol foi oxidado para acetaldeído, formando 9,08 mmol do produto, enquanto que na ausência dele, formou-se 2,85 mmol.

Para a biocélula completa na ausência de membrana, assim como para os testes de eletrólise e densidade de potência do bioânodo, os melhores resultados foram com a presença de MWCNTs no bioânodo, obtendo-se uma potência de 12,5 $\pm$ 0,9 $\mu W\ cm^{-2}$, mostrando que o resultado está dentro da faixa do que vem sendo obtido na literatura para biocélulas sem membrana.

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos nesta parte do trabalho, pode-se inferir que, em relação ao bioânodo, a metodologia de imobilização da enzima ADH/NAD^+, utilizando a eletropolimerização simultânea do agente ancorante (poli-PYR) e o mediador/eletrocatalisador (poli-VM) mostra-se bastante atrativa para seu uso em biocélulas a combustível a base de EtOH/O_2, principalmente com a adição de nanotubos de carbono, indicando resultados promissores para futura aplicação em sistemas miniaturizados. E, em relação à biocélula construída com esse bioânodo e o biocátodo com MWCNTs-Ac/Lacase também se mostrou relativamente satisfatória pois apresentou resultados coerentes com o que vem sendo obtido na literatura.

6. TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho abre novas perspectivas de análises:

* Identificar/atribuir todos os produtos obtidos nas eletrólises;

* Teste de estabilidade do bioânodo na presença de MWCNTs (contínua e por semana);

* Atividade enzimática da enzima imobilizada de tempos em tempos (podendo ser feita junto com o teste de estabilidade por semana, por exemplo, e relacionar com o decaimento da densidade de potência)

* Testes de impedância eletroquímica para o filme (poli-VM-poli-PYR);

* Teste de estabilidade da biocélula completa (contínua e por semana);

* Testes com cascata enzimática

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AQUINO-NETO, S. ANDRADE, A.R. New Energy Sources: *The Enzymatic Biofuel.* **Cell. J. Braz. Chem. Soc.,** v. 24, No. 12, p. 1891-1912, 2013.

2. AQUINO-NETO, S. Tese - *Preparação e caracterização de bioânodos para biocélula a combustível etanol/O_2".* Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012

3. JAIN, A. K. S., NEMA, R.K. *A review on fuel cell technologies and power electronic interface*. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.13, p. 2430–2440, 2009.

4. WENDT, H., GOTZ, M., LINARDI, M. *Tecnologia de células a combustível.* **Química Nova**, v. 23, Nº 4, 2000

5. NIAKOLAS, D.K., DELATOU, M., NEOPHYTIDES, S.G., VAYENAS, C.G. *Fuel cells are a commercially viable alternative for the production of "clean" energy.* **Ambio**, v. 45, (Suppl. 1), p. 32–37, 2016.

6. GUO, K, W. *Green Nanotechnology of Trends in Future Energy*. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 5, p. 76-88, 2011.

7. KIM, J., JIA, H., WANG, P., *Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells.* **Biotechnol. Adv.** 24, 296-308, 2006

8. BARTON, S. C.; GALLAWAY, J.; ATANASSOV, P. Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. **Chem. Rev**. *104* (10), 4867–4886, 2004.

9. AQUINO-NETO, S., FORTI, J.C., ANDRADE, A.R.; *An Overview of Enzymatic Biofuel Cells*. **Electrocatal** v. 1, p. 87-94, 2010.

10. RAMANAVICIUS, A.; RAMANAVICIENE, A*., Hemoproteins in Design of Biofuel Cells.* **Fuel Cells**, v. 9 (1), p. 25-36, 2009

11. GHINDILIS, A.L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E., *Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications.* **Electroanalysis,** v. 9 (9), p. 661-674, 1997.

12. KIM, H-H.; MANO, N.; ZHANG, Y.; HELLER, A. J. *A Miniature Membrane-less Biofuel Cell Operating under Physiological Conditions at 0.5 V.* **Journal of The Electrochemical Society.** v. 150, p. A209-A213, 2003.

13. FENGA, P. G. Tese - *Desenvolvimento de protótipos de biocélulas a combustível a base de etanol/O_2.* Ribeirão Preto, janeiro, 2014

14. BULLEN, R.A., ARNOT, T.C., LAKEMAN, J.B., WALSH, F.C., *Biofuel cells and their development.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 2015-2045, 2006.

15. www.enzyme-database.org.

16. GERMANO, M.G., LIMA, I.P.C., SILVA, A.P.B. *Pilha voltaica: entre rãs, acasos e necessidades.* **Cad. Bras. Ens. Fís.,** v. 29, Nº 1, p. 145-155, 2012.

17. COONEY, M.J.; SVOBODA, V.; LAU, C.; MARTIN, G.; MINTEER, S.D., *Enzyme catalysed biofuel cells.* **Energy & Environmental Science**, v. 1 (3), p. 320-337, 2008.

18. YAHIRO A.T.; LEE, S.M.; KIMBLE, D.O., *Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies.* **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects**, v. 88 (2), p. 375-383, 1964.

19. RASMUSSEN, M., ABDELLAOUI, S., MINTEER, S.D. *Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements.* **Biosensors and Bioelectronics**. v. 76, p. 91-102, 2016.

20. YEH, P.; KUWANA, T., *Reversible electrode reaction of cytochrome c*. **Chemistry Letters**, v. 6 (10), p. 1145-1148, 1977.

21. PLOTKIN, E.V.; HIGGINS, I.J.; HILL, H.A.O., *Methanol dehydrogenase bioelectrochemical cell and alcohol detector.* **Biotechnology Letters**, v. 3 (4), p. 187-192, 1981.

22. DAVIS, G..; HILL, H.A.O.; ASTON, W.J.; HIGGINS, I.J.; TURNER, A.P.F., *Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on a quinoprotein, alcohol dehydrogenase.* **Enzyme Microb. Technol**., v. 5, p. 383-388, 1983.

23. LAANE, C., PRONK, W., FRANSSEN, M., VEEGER, C. *Use of a bioelectrochemical cell for the synthesis of (bio)chemicals.* **Enzyme and Microbial Technology** v. 6, Issue 4, p. 165-168, 1984.

24. ARMOSTRONG, F., A., WILSON, G., S. *Recent developments in faradaic bioelectrochemistry* **Electrochimica Acta** v. 45, p. 2623-2645, 2000.

25. BARDEA, A., KATZ, E., BUCKMANN, A., F., WILLNER, I., NAD+-Dependent Enzyme Electrodes: *Electrical Contact of Cofactor-Dependent Enzymes and Electrodes.* **J. Am. Chem. Soc**., v. 119, p. 9114-9119, 1997.

26. WILLNER, B., KATZ, E., WILLNER, I. *Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means.* **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 589–596, 2006.

27. BRIAN, A., G., HELLER, A. *Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications*. **Anal. Chem**., v. 62 (3), p. 258–263, 1990.

28. HELLER, A. *Electrical wiring of redox enzymes.* **Acc. Chem. Res**., v. 23 (5), p. 128–134, 1990.

29. PALMORE, G.T.R.; BERTSCHY, H.; BERGENS, S.H.; WHITESIDES, G.M., *A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD+-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials.* **Journal of Electroanalytical Chemistry,** v. 443 (1), p. 155-161, 1998.

30. WILLNER, I.; ARAD, G.; KATZ, E., *A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes.* **Bioelectrochemistry and Bioenergetics,** v. 44 (2), p. 209-214, 1998.

31. PALMORE, G.T.R.; KIM, H-H., *Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 464 (1), p. 110-117, 1999.

32. ARECHEDERRA, R., MINTEER, S.D., Nanomaterials in Biofuel Cells. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, California, pp. 287–299, 2009

33. CHE, Ai-Fu, GERMAIN, V., CRETIN, M., CORNU, D., INNOCENTA, C., TINGRY., S. *Fabrication of free-standing electrospun carbon nanofibers as efficient electrode materials for bioelectrocatalysis*. **New J. Chem**. v. 35, p. 2848-2853, 2011

34. MINTEER. S., D. *Nanobioelectrocatalysis and Its Applications in Biosensors, Biofuel Cells and Bioprocessing*. **Top Catal**, v. 55, p. 1157–1161, 2012

35. WALCARIUS, A., MINTEER, S.D., WANG, J., LIN, Y., MERKOCI, A., *Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends.* **J. Mater. Chem**. v. 38, p. 4878–4908, 2013.

36. WEN, D., DENG, L., ZHOU, M., GUO, S., SHANG, L., DONG, S. *A biofuel cell with a single-walled carbon nanohorn-based bioanode operating at physiological condition*. **Biosensors and Bioelectronics** v. 25, p.1544–1547*,* 2010

37. YAN, Y., ZHENG, W., SU, L., MAO, L. *Carbon-nanotube-based glucose/O_2 biofuel cells.* **Adv. Mater**. v. 18, p. 2639–2643, 2006

38. CHEN, T.; BARTON, S.C.; BINYAMIN, G.; GAO, Z.; ZHANG, Y.; KIM, H-H.; HELLER, A., *A Miniature Biofuel Cell.* **Journal of the American Chemical Society**, v. 123 (35), p. 8630-8631, 2001.

39. HALLIWELL, C.M.; SIMON, E.; TOH, C.S.; CASS, A.E.G.; BARTLETT, P.N., *The design of dehydrogenase enzymes for use in a biofuel cell: the role of genetically introduced peptide tags in enzyme immobilization on electrodes.* **Bioelectrochemistry,** v. 55 (1–2), p. 21-23, 2002.

40. KATZ, E.; WILLNER, I., *A Biofuel Cell with Electrochemically Switchable and Tunable Power Output.* **Journal of the American Chemical Society**, v. 125 (22), p. 6803-6813, 2003.

41. VINCENT, K.A.; CRACKNELL, J.A.; CLARK, J.R.; LUDWIG, M.; LENZ, O.; FRIEDRICH, B.; ARMOSTRONG, F.A., *Electricity from low-level H_2 in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase.* **Chemical Communications**, v. (48), p. 5033-5035, 2006.

42. KARYAKIN, A.A.; KARYAKINA, E.E.; GORTON, L.; BOBROVA, O.A.; LUKACHOVA, L.V.; GLADILIN, A.K.; LEVASHOV, A.V.*, Improvement of electrochemical biosensors using enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent.* **Analytical Chemistry,** v. 68 (24), p. 4335-4341, 1996.

43. TOPCAGIC, S.; MINTEER, S. D. *Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell.* **Electrochim. Acta**, v. 51, 2168-2172, 2006.

44. AKERS, N. L.; MOORE, C. M.; MINTEER, S. D. *Development of alcohol/O_2 biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes*. **Electrochimica Acta.** v. 50, p. 2521-2525, 2005.

45. RAMAVICIUS, A.; KAUSAITE, A.; RAMAVICIENE, A., *Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24 (4), p. 761-766, 2008.

46. SOKIC-LAZIC, D.; MINTEER, S.D., *Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24 (4), p. 939-944, 2008.

47. SOKIC-LAZIC, D.; MINTEER, S. D. *Pyruvate/Air Enzymatic Biofuel Cell Capable of Complete Oxidation.* **Electrochem. Solid-State Lett.**, v. 12, p. 26-28, 2009

48. SOKIC-LAZIC, D. ANDRADE, A. R., MINTEER, S.D. *Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell*. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 10772– 10775, 2011.

49. FISCHBACK, M. B., YOUN, J. K., ZHAO, X., WANG, P., PARK, H. G., CHANG, H. N., KIM, J., HAA, S. *Miniature Biofuel Cells with Improved Stability Under Continuous Operation*. **Electroanalysis** v. 18, No. 19-20, p. 2016 – 2022, 2006.

50. SAKAI, H.; NAKAGAWA, T.; TOKITA, Y.; HATAZAWA, T.; IKEDA, T.; TSUJIMURA, S.; KANO, K. *A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions.* **Energy & Environmental Science**, v. 2 (1), p. 133-138, 2009.

51. CINQUIN, P., GONDRAN, C., GIROUD, F., MAZABRARD, S., PELLISSIER, A., et al. *A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats*. **PLoS ONE** v. 5, 2010.

52. HALÁMKOVÁ, L., HALÁMEK, J., BOCHAROVA, V. SZCZUPAK, A., ALFONTA, L., KATZ, E. *Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail.* **J. Am. Chem. Soc**. v. 134, p. 5040−5043, 2012.

53. MINTEER, S.D.; LIAW, B.Y.; COONEY, M.J., *Enzyme-based biofuel cells.* **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18 (3), p. 228-234, 2007.

54. BABADI, A.A., BAGHERI, S., HAMID, S.B.A. *Progress on implantable biofuel cell:Nano-carbon functionalization for enzyme immobilization enhancement.* **Biosensors andBioelectronics**, v. 79, p. 850–860, 2016.

55. ZEBDA, A., ALCARAZ, J-P., VADGAMA, P., SHLEEV, S., MINTEER, S.D., BOUCHER, F., CINQUIN, P., MARTINA, D.K*. Challenges for successful implantation of biofuel cells*. **Bioelectrochemistry**, v. 124, p. 57–72, 2018

56. COSNIER, S., GROSS, A.J., GIROUD, F., HOLZINGER, M. Beyond the hype surrounding biofuel cells: What's the future of enzymatic fuel cells? **Current Opinion in Electrochemistry**, in press.

57. IVANOV, I.; VIDAKOVIC-KOCH, T.; SUNDMACHER, K. *Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling.* **Energies**, v. 3 (4), p. 803-846, 2010.

58. OSMAN, M.H.; SHAH, A.A.; WALSH, F.C. *Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26 (7), p. 3087-3102, 2011.

59. OPALLO, M.; BILEWICZ, R., *Recent Developments of Nanostructured Electrodes for Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction.* **Advances in Physical Chemistry**, v. 2011, p. 21, 2011.

60. YANG, X.-Y.; TIAN, G.; JIANG, N.; SU, B.-L., *Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design.* **Energy & Environmental Science**, v. 5 (2), p. 5540-5563, 2012.

61. FALK, M.; BLUM, Z.; SHLEEV, S. *Direct electron transfer based enzymatic fuel cells.* **Electrochimica Acta,** v. 82, p. 191–202, 2012.

62. MEREDITH, M., T. MINTEER, S., D. *Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis.* **Annu. Rev. Anal. Chem.** V. 5, p. 157–79, 2012.

63. WU, X.E., GUO, Y.Z., CHEN, M.Y., CHEN, X.D. *Fabrication of flexible and disposable enzymatic biofuel cells*. **Electrochimica Acta** v. 98, p. 20– 24, 2013.

64. DESMAELE, D., RENAUD, D., TINGRY, S. *A wireless sensor powered by a flexible stack of membranelessenzymatic biofuel cells.* **Sensors and Actuators**,v. 220, p. 583–589, 2015

65. ICHI-RIBAULT, S.E., CALCARAZ, J.P., BOUCHER, F., BOUTAUD, B., DAMOLIN, R., BOUTONNAT, J., CINQUIN, P., ZEBDA, A., MARTIN, D.K. *Remote wireless control of an enzymatic biofuel cell implanted in a rabbit for 2 months*. **Electrochimica Acta** v. 269, p. 360-366, 2018.

66. TICIANELLI, E.A, GONZALEZ, E.R. *Eletroquímica: Princípios e Aplicações*, Edusp, São Paulo, 1998.

67. BARD, A. J. FAULKNER, L. R.,"*Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*," John Wiley and Sons, Inc., New York, 2001.

68. BRETT, A.M.O., BRETT, C.M.A. *Electroquímica: Princípios, métodos e aplicações*. Almedina Brasil, 2000

69. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 6. ed. Cap 6. São Paulo: Sarvier, 2014.

70. PARKIN, K.L., General Characteristics of Enzymes, in *Enzymes in Food Processing*, Nagodawithana. T.; REED, G., Editors., New York: **Academic Press,**. p. 7-25, 1993.

71. KLINMAN, J. P. *Probes of mechanism and transition-state structure in the alcohol dehydrogenase reaction.* Crit. Rev. **Biochem. Mol. Biol**., v. 10, p. 39-78, 1981.

72. EKLUND, H.; Branden, C.I., *Biological Macromolecules and Assemblies*, ed. Vol. 3. New York: Wiley Interscience. 1987

73. RAJ, S.B., RAMASWAMY, S., PLAPP, B.V. *Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis.* **Biochemistry**, v. 53, p. 5791−5803, 2014.

74. SILVERSTEIN, T. P., *The Alcohol Dehydrogenase Kinetics Laboratory: Enhanced Data Analysis and Student-Designed Mini-Projects.* **Journal of Chemical Education,** v. 93, p. 963−970, 2016.

75. EYS, J, V.; KAPLAN, N.O., *Yeast Alcohol Dehydrogenase. III. Relation of Alcohol Structure to Activity.* **Journal of the American Chemical Society**, v. 79 (11), p. 2782-2786, 1957.

76. TRIVIC, S.; LESKOVAC, V., *Structure and function of yeast alcohol dehydrogenase.* **Journal of the Serbian Chemical Society,** v. 65 (4), p. 207-227, 2000.

77. ASSIS, C.S., JESUS, L.D.F., MIRANDA, A.C., MOREIRA, M.F.R. *Uso do metanol e risco de exposição dos trabalhadores de uma usina de biodiesel*. **Rev Bras Med Trab.** v. 15, p. 29-41, 2017.

78. ZHOU, D.-M.; FANG, H.-Q.; CHEN, H.-y.; JU, H.-x.; WANG, Y. *The electrochemical polymerization of methylene green and its electrocatalysis for the oxidation of NADH.* **Analytica Chimica Acta**, v. 329, p. 41-48, 1996.

79. ZHU, H.-P.; MU, S.-L.; *Electrochemical polymerization of methylene green*. **Chin. J. Chem**., v. 19, p. 620-626, 2001.

80. BARSAN, M. M.; PINTO, E. M.; BRETT, C. M. A. *Electrosynthesis and electrochemical characterization of phenazine polymers for application in biosensors.* **Electrochim. Acta**, v. 53, p. 3973-3982, 2008.

81. FORTI, J. C.; AQUINO NETO, S.; ZUCOLOTTO, V.; CIANCAGLINI, P.; DE ANDRADE, A. R. *Development of novel bioanodes for ethanol biofuel cell using PAMAM dendrimers as matrix for enzyme immobilization*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2675-2679, 2011.

82. AQUINO-NETO, S., FORTI, J.C., ZUCOLOTTO, V., CIANCAGLINI, P., ANDRADE, A.R. *Development of nanostructured bioanodes containing dendrimers and*

dehydrogenases enzymes for application in ethanol biofuel cells. **Biosensors and Bioelectronics.** v. 26, p. 2922–2926, 2011.

83. FENGA, P.G., CARDOSO, F.P., AQUINO NETO, S., DE ANDRADE, S.R. Multiwalled carbon nanotubes to improve etanol/air biofuel cells. **Electrochimica Acta** v.106, p. 109– 113, 2013.

84. CARDOSO, F.P., *Biocelulas a combustivel metanol e etanol/O_2: Preparação e caracterização de biocátodos.* Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014

85. CARDOSO, F.P., AQUINO NETO, S., FENGA, P.G., CIANGAGLINI, P., ANDRADE, A.R. *Electrochemical characterization of methanol/O_2 biofuel cell: Use of laccase biocathode immobilized with polypyrrole film and PAMAM dendrimers.* **Electrochimica Acta**, v. 90, p. 90– 94, 2013

86. SOLOMON, E.I., SUNDARAM, U. M., MACHONKIN, T. E., *Multicopper Oxidases and Oxygenases.* **Chemical Review**, v. 96: p. 2563-2606, 1996.

87. MAYER, A.M., STAPLES, R. C., *Review - Lacase: New functions for an old enzyme.* **Phytochemistry**,.v. 60: p. 551-565, 2002.

88. FAURE D., B.M.L., BALLY, R. *Isolation of azospirillum lipoferum 4t tn 5 mutants affexted in melanization and lacase activity.* **Applied Environmental Microbiology**, v. 60: p. 3413-3415, 1994.

89. LEONOWICZ, A., BOLLAG, J. M. *Lacases in soil and the feasiblity of their extraction.* **Soil Biological Biochemistry**, v. **19, p.** 237-242, 1987.

90. SHRADDHA, SHEKHER, R., SIMRAN, S., KAMTHANIA, M., KUMAR, A. Review Article. *Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications.* **SAGE-Hindawi** v. 2011, 2011.

91. MOROZOVA, O.V., SHUMAKOVICH, G.P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S., YAROPOLOV A. I. Review Article. *" Blue" Lacases.* **Biochemistry,** v. 72: p. 1136-1150, 2007.

92. ARORA, D.S., SHARMA R. K., *Ligninolytic fungal lacases and their biotechnological applications.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160(6): p. 1760-1788, 2010.

93. MEREDITH, M.T., MINSON, M., HICKEY D., ARTYUSHKOVA K., GLATZHOFER, D.T., MINTEER, S.D. *Anthracene-Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes as Direct Electron Transfer Scaffolds for Enzymatic Oxygen Reduction.* **ACS Catal**. v. 1, p. 1683–1690, 2011.

94. CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A.; *Biocatalisadores Imobilizados*: *uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos.* **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento,** ano IX – nº 36 p.48-57, 2006.

95. CARDOSO, C.,L., MORAES., M., C., CASS, Q., B. *Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas.* **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 175-187, 2009

96. SCHOFFER, J.N. Tese: *Imobilização de ciclodextrina glicosiltrasnferase para produção de ciclodextrinas: Catálise em batelada e catálise contínua em reator de leito fixo.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013

97. PEREIRA, R.M. Tese: *Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas.* Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas – MG, 2014

98. Disponível em: http://bioeng-he.org/portfolio/enzyme-immoblization/ Acesso em: 9/08/2018

99. SILVA, A.L.B.B, SILVA, E.O. Conhecendo materiais poliméricos, Mato Grosso, 2003.

100. RUFFONI, L.D.G. Tese – *Efeito de nanopartículas de ouro sobre tecido ósseo, rim, fígado e coração de ratos. Centro de ciências biológicas e da saúde* – UFSCAR, São Carlos, 2012

101. CRESPILHO, F. N.; Tese - *Membranas eletroativas. Nanoestruturas: Estudo de transporte de carga e imobilização enzimática.* Instituto de Química de São Carlos-USP, São Carlos, 2007

102. DRESCH, M. A. Tese - *Aplicação de catalisadores PtSn/C e membranas Nafion-SiO_2 em células a combustível de etanol direto em elevadas temperaturas.* IPEN, São Paulo, 2014

103. MOORE, C.M.; AKERS, N.L.; HILL, A.D.; JONHSON, Z.C.; MINTEER, S.D., *Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides*. **Biomacromolecules**, v. 5 (4), p. 1241-1247, 2004.

104. ZAKIL, A. F., KAMARUDIN, S.K; BASRI, S. *Modified Nafion membranes for direct alcohol fue cells: An overview.* **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 65 p. 841–852, 2016.

105. PINHEIRO, S., C., L., RAIMUNDO JR, I., M. *Uso de membranas de Nafion para a construção de sensores ópticos para medidas de pH.* **Quim. Nova,** v. 28, No. 5, p. 932-936, 2005

106. ROCHA-FILHO, R., C. *Polímeros condutores: Descobertas e Aplicações***. Quimica Nova na Escola**, nº 12, 2000

107. FAEZ, R., REIS, C., FREITAS, P., S., KOSIMA, O., K., RUGGERI, G., PAOLI, M., A. *Polímeros Condutores. Aplicações.* **Quimica Nova na Escola**, nº 11, 2000

108. SONG H.-K.; PALMORE G. T. R.; *Conductive Polypyrrole via Enzyme Catalysis* **J. Phys. Chem. B**, V. 109, P. 19278-19287, 2005.

109. FEI, J.; SONG, H.-K.; PALMORE, *A Biopolymer Composite that Catalyzes the Reduction of Oxygen to Water* T. R. **Chem. Mater**., v. 19, p. 1565-1570, 2007.

110. INAMUDDIN, S; K. M.; KIM, S. I.; SO, I.; KIM, S. J. *A conducting polymer/ferritin anode for biofuel cell applications.* **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 3979-3983, 2009.

111. MATTOS, L.L. Membranas nanoestruturadas de polipirrol para aplicação em baterias. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – Florianópolis - SC, 2011

112. TEIXEIRA, A.O., ARAÚJO, Â. N., ALMEIDA, C. F., ABREU, D. M., OLIVEIRA, I. A., MARTINS, J. E., FONSECA, J. B., *Polímeros Condutores: Polipirrole*, Portugal 2014

113. NOGEUIRA, F.A.R. Dissertação – *Síntese e Caracterização de derivados de polipirrol para aplicação em dispositivos eletroquímicos.* Instituto de Química e Biotecnologia – Universidade Federal do Alagoas, Maceió, 2010

114. YU, E.H., SCOTT, K. *Enzymatic Biofuel Cells-Fabrication of Enzyme Electrodes*. **Energies**, v. *3*, p. 23-42, 2010.

115. INAMUDDINB, R.P., NASARA, A., BEENISHA, ASIRI, A.M. *Synthesis and characterization of a novel electron conducting biocomposite as biofuel cell anode.* **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 106, p. 755–762, 2018.

116. KIZLING, M., STOLARCZYK, K., TAMMELA, P., WANG, Z., NYHOLMD, L., GOLIMOWSKI, J., BILEWICZ, R. *Bioelectrodes based on pseudocapacitive cellulose/polypyrrole composite improve performance of biofuel cell*. **Bioelectrochemistry**, v. 112, p.184–190, 2016.

117. ZEBDAA, A., TINGRYA, S., INNOCENTA, C., COSNER, S., FORANO, C., MOUSTY, C. *Hybrid layered double hydroxides-polypyrrole composites for construction of glucose/O_2 biofuel cell.* **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 10378– 10384, 2011.

118. LALAOUI, N., ELOUARZAKI, K., LE GOFF, A., HOLZINGER, M., COSNIER, S. *Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes*. **Chem. Commun**. v. 49, p. 9281—9283, 2013.

119. LE GOFF, A., HOLZINGER, M., COSNIER, S. *Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells.* **Cell. Mol. Life Sci.** v. 72, p. 941–952, 2015.

120. ELOUARZAKI, K. CHENG, D., FISCHER, A.C., LEE, J-M. *Coupling orientation and mediation strategies for efficient electron transfer in hybrid biofuel cells*. **Nature Energy.** v. 3 , Nº 7, p. 574-581, 2018.

121. LARRUDÉ, D.R.G. Dissertação - *Nanotubos de carbono decorados com partículas de cobalto*, PUC – Rio de Janeiro, 2007

122. VELOSO, C.M., RANGEL, M.C .*Preparação de carbonos porosos por moldagem sequencial.* **Quim. Nova**, v. 32, Nº. 8, p. 2133-2141, 2009.

123. BARBOSA, G., M., Tese - Dispositivos de micro-ondas utilizando nanotubos de carbono e grafeno, Rio de Janeiro, 2014

124. JAVEY, A.; *The 2008 Kavli Prize in Nanoscience: Carbon Nanotubes***. ACS Nano**, v. 2, p. 1329-1335, 2008.

125. WOOD, J.; *The top ten advances in materials science*. **Materials Today**, v. 11, p. 40-45, 2008.

126. STOLARCZYK, K., LYP, D., Z'ELECHOWSKA, K.,BIENART, J.F., ROGALSKI, J., BILEWICZ, R. *Arylated carbon nanotubes for biobatteries and biofuel cells*. **Electrochimica Acta** v. 79, p.74– 81, 2012.

127. COSNIER, S., HOLZINGER, M., LE GOFF, A. *Recent advances in carbon nanotube-based enzymatic fuel cells*. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, Nº 45, 2014.

128. TANNE, C. GOBEL, G., LISDAT, F. *Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O2-biofuel cell.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 530–535, 2010.

129. BOGNER, M., SCHNAITHMANN, M., SAGEBARTH,J., SANDMAIER, H., *Bio-Fuel Cell based on modified Carbon Nanotubes with immobilized Enzymes.* **Procedia Engineering**, v. 5, p. 1047–1050, 2010.

130. STOLARCZYK, K., LYP, D., Z'ELECHOWSKA, K.,BIENART, J.F., ROGALSKI, J., BILEWICZ, R. *Arylated carbon nanotubes for biobatteries and biofuel cells*. **Electrochimica Acta** v. 79, p.74– 81, 2012.

131. COSNIER, S., HOLZINGER, M., LE GOFF, A. *Recent advances in carbon nanotube-based enzymatic fuel cells*. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, Nº 45, 2014.

132. TANNE, C. GOBEL, G., LISDAT, F. *Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O2-biofuel cell.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 530–535, 2010.

133. BOGNER, M., SCHNAITHMANN, M., SAGEBARTH,J., SANDMAIER, H., *Bio-Fuel Cell based on modified Carbon Nanotubes with immobilized Enzymes.* **Procedia Engineering**, v. 5, p. 1047–1050, 2010.

134. HOLZINGER, M., LE GOFF A., COSNIER, S. *Carbon nanotube/enzyme biofuel cells.* **Electrochimica Acta**, v. 82, p. 179– 190, 2012.

135. Benefícios em usar o etanol. Disponível em https://www.novacana.com/etanol/beneficios/. Acesso em 13/08/2018

136. MASIERO, G., LOPES, H. *Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia.* **Rev. bras. polít. int.** v. 51, No.2, p. 60-79, 2008.

137. YAN, Y.M., BARAVIK, I., TEL-VERED, R., WILLNER, I. *An Ethanol/O_2 Biofuel Cell Based on an Electropolymerized Bilirubin Oxidase/Pt Nanoparticle Bioelectrocatalytic O_2-Reduction Cathode*. **Adv. Mater**., v. 21, p. 4275–4279, 2009.

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

139. ALEIXO, L. M.; *Voltametria: Conceitos e Técnicas.* Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo – Brasil

140. PACHECO, W. F.;* SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. *Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos*- Rev. **Virtual Quim**., 5 (4), 516-537, 2013.

141. Voltametria – PUC/Rio, Certificação digital nº 0212140/CA – Disponível em: < http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/5180/5180_3.PDF> Acesso em: 09/08/2018

142. FERREIRA, R.Q., AVACA, L.A., *Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o crac assay*. **Quim. Nova**, v. 31, No. 8, p. 2169-2173, 2008

143. DEDAVID, B.A., GOMES, C.I., MACHADO, G. *Microsocpia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras.* Porto Alegre, 2007.

144. FEDERMAN, S. R. BUONO, V. T. L. VANCONCELOS, W. L. *Determinação da espessura de filme bioativo SiO_2-CaO-P_2O_5 obtido via sol-gel.* **Cerâmica**, v. 55, p. 177-180, 2009.

145. UZUMAKI, E. T., LAMBERT, C. S., ZAVAGLIA, C. A. C. *Morfologia da superfície de filmes de carbono tipo diamante (DLC) obtidos pelo processo de imersão em plasma para aplicações biomédicas.* **49º Congresso Brasileiro de cerâmica**, São Pedro, 2005

146. DUARTE L. C.; JUCHEM P. L.; PULZ G.M.; BRUM T.M.M; CHODUR N.; LICCARDO A., FISCHER A. C.; ACAUAN R. B. *Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros.* Instituto de Geociências, Porto Alegre, RS, **Pesquisas em Geociências**, 30(2): 3-15, 2003

147. MALISKA A. M. *Microscopia Eletrônica de Varredura.* Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Departamento de Engenharia Mecânica – EMC

148. MOEHLENBROCK, M. J.; MINTEER, S. D.; *Extended lifetime biofuel cells.* **Chem. Soc. Rev**, v. 37, p. 1188-1196, 2008.

149. KADHUM, A.A.H., MOHAMAD, A.B., DAUD, W.R.W.& SITANGGANG, R. *Water Permeability Study of Membrane Electrode Assembly (MEA) Fabrication Using XY Robotic Sprayer Machine*, **Regional Symposium on Membrane Science & Technology**, MST2004, 21 – 25 April 2004, Johor Bahru, Johor, Malaysia.

150. AQUINO-NETO, S., SILVA, R.G., MILTON, R.D., MINTEER, S., D. ANDRADE, A.R.*, Hybrid Bioelectrocatalytic Reduction of Oxygen at Anthracene-modified Multi-*

walled Carbon Nanotubes Decorated with Ni90Pd10 Nanoparticles. **Electrochimica Acta** v. 251, p. 195–202, 2017.

151. CARDOSO, F.P., AQUINO-NETO, S., CREPALDI, L.B., NIKOLAOU, S., BARROS, V.P., ANDRADE, A.R. *Biocathodes for Enzymatic Biofuel Cells Using Laccase and Different Redox Mediators Entrapped in Polypyrrole Matrix.* **Journal of The Electrochemical Society,** v. 161, p. 445-450, 2014.

152. AQUINO NETO, S., ALMEIDA, T.S., BELNAP, D.M., MINTEER, S.D. ANDRADE, A.R. *Enhanced Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide electrocatalysis onto multi-walled carbon nanotubes-decorated gold nanoparticles and their use in hybrid biofuel cell. S*. **Journal of Power Sources** v. 273, p. 1065-1072, 2015

153. FENGA, P.G., CARDOSO, F.P., MICOLAU, S., ANDRADE, A.R. *Membraneless Ethanol/O_2 Enzymatic Biofuel Cell Based on Laccase and ADH/NAD+ Bioelectrodes.* **Journal Brazilian Chemical Society** in press

154. FRANCO, J.H., MINTEER, S.D., ANDRADE, A.R. *Product Analysis of Operating an Ethanol/O_2 Biofuel Cell Shows the Synergy between Enzymes within an Enzymatic Cascade.* **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, p. 575-579, 2018.

155. TACIN, M.V., OLIVEIRA, R.C., GATTÁS, E.A.L. *Caracterização da enzima álcool desidrogenase de Saccharomyces cerevisiae e dosagem de etanol em bebidas.* **Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35 Supl 1, 2014

156. BATISTELA, D.M., *Estudo da atividade e estabilidade de lacases em líquidos iônicos*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

157. BOURBONNAIS, R. PAICE, M.G., REID, I. D., LANTHIER, P., YAGUCHI, M. *Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from Trametes versicolor and Role of the Mediator 2,29-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization.* **Applied and environmental microbiology**, v. 61, Nº 5, p. 1876-1880, 1995.

158. MUNTEANU, F.D., KUBOTA, L.T., GORDON, L.; J. *Effect of pH on the catalytic electrooxidation of NADH using different two-electron mediators immobilised on zirconium phosphate***. Electroanal. Chem**., v. 509, p. 2-10, 2001.

159. GORTON, L., J.; *Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of nicotinamide coenzymes*. **Chem. Soc. Faraday trans**, v. 1 p. 1245-1258, 1986.

160. KARYAKIN, A., KARYAKINA, E.E., SCHUMANN, W., SCHIMIDT, H-L. Electropolymerized Azines: Part II. In a Search of the Best Electrocatalyst of NADH Oxidation. **Electroanalysis**, v. 11, p. 553-557, 1999

161. RINCÓN, R. A.; ARTYUSHKOVA, K.; MOJICA, M.; GERMAIN, M. N.; MINTEER, S. D.; ATANASSOV, P.; *Structure and Electrochemical Properties of Electrocatalysts for NADH Oxidation.* **Electroanalysis.** v.22, p. 799-806, 2010.

162. WHITE H. B.; III, *Evolution of Coenzimes and origin of pyridine nucleotides*, Academic Press, N.Y., 1982, p.1-17.

163. CHEN-XIN C.; LU-HUA Y.; KUAN-HONG X. *Electrocatalysis of NADH oxidation at a glassy carbon electrode modified with pyrocatechol sulfonephthalein*. **J. Molec. Catal. A: Chem**., v. 152, p. 179-186, 2000.

164. GIACOMINI, M.T., TICIANELLI, E.A. ***Influência da acidez do meio sobre a síntese e o comportamento redox do polipirrol.*** **Quím. Nova, v.22 Nº 5, 1999**

165. SILK, T., HONG, Q., TAMM, J., COMPTON, R.G. *AFM studies of polypyrrole film surface morphology I. The influence of film thickness and dopant nature.* **Synthetic Metals** v. 93, p. 59-64, 1998.

166. STRACK, G., LUCKARIFT, H.R., NICHOLS, R., COZART, K., KATZD, E., JOHNSON, G.R. *Bioelectrocatalytic generation of directly readable code: harnessing cathodic current for long-term information relay*. **Chem. Commun.,** v. 47, p. 7662–7664, 2011.

167. GOWDHAMAMOORTHI, M., ARUN, A., KIRUTHUKA, S., MUTHUKUMARAN, B. *Enhanced Performance Of Membraneless Fuel Cells.* **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, Nº.3, p. 1143-1151, 2013.

168. DENG, L., SHANG, L., WEN, D., ZHAI, J., DONG, S. *A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage*. **Biosensors and Bioelectronics,** v. 26, p. 70–73, 2010.

169. RINCÓN, R.A., LAU, C., LUCKARIFT, H.R., GARCIA, K.R., ADKINS, E., JOHNSON, G.R., ATANASSOVA, P. *Enzymatic fuel cells: Integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design***. Biosensors and Bioelectronics**, v. 27, p.132– 136, 2011.

170. AQUINO-NETO, S., MILTON, R.D., HICKEY, D.P., ANDRADE, A.R., MINTEER, S.D. Membraneless enzymatic ethanol/O_2 fuel cell: *Transitioning from na air-breathing Pt-based cathode to a bilirubin oxidase-based biocathode.* **Journal of Power Sources**, v. 324, p. 208-214, 2016.

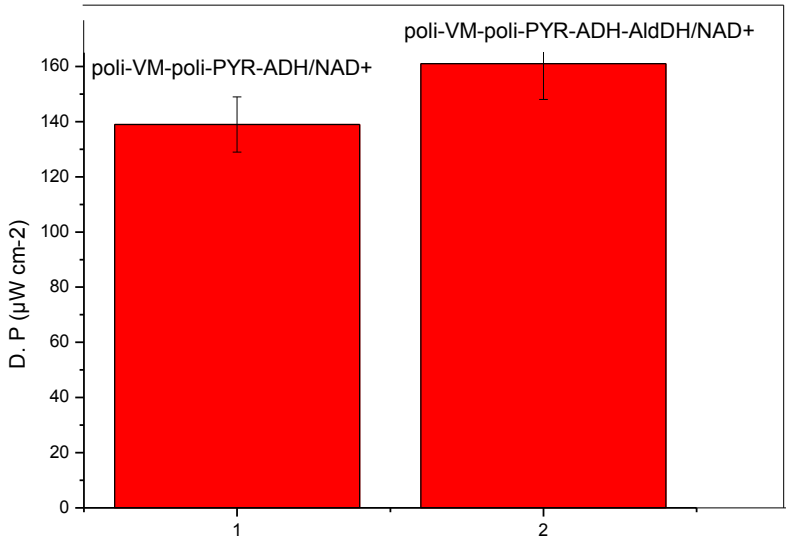
171. RAMANAVICIUS, A., KAUSAITEA, A., RAMANAVICINEA, A. *Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by etanol.* **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 761–766, 2008.

8. APÊNDICE

8.1 Testes eletroquímicos na presença de duas enzimas ADH + AldDH

Com a finalidade de aumentar a quantidade de elétrons gerados, e, consequentemente, aumentar a densidade de potência, realizou-se testes com adição de uma segunda enzima, AldDH no bioânodo. Estes testes foram realizados na ausência de MWCNT. Os resultados estão apresentados na figura 45. Os valores obtidos para o sistema monoenzimático (poli-VM-poli-PYR-ADH/NAD^+ | $Pt_{E\text{-}TEK}$) foi de 139 $\pm$ 10 µW cm^{-2} e 0,453 ± 0,040 V respectivamente para densidade de potencia máxima e potencial de circuito aberto. Quando se acrescenta a segunda enzima neste sistema não se observa um aumento significativo na densidade de potência como seria o esperado (oxidação do acetaldeído para acetato fornecendo 4 elétrons). De fato os valores obtidos foram 161 $\pm$ 13 µW cm^{-2} e 0,415 ± 0,130 V respectivamente para a densidade de potência máxima e PCA. Esses valores são bem menores que os apresentados na literatura onde se obtém, geralmente, quase o dobro (ou até mais) da corrente e potência na presença da segunda enzima [44, 48, 154]

Figura 45. Gráfico comparativo entre os sistemas mono e bienzimático, na presença de tampão fosfato (pH 7,4), NAD^+ 1,9 mmol L^{-1} e EtOH 100 mmol L^{-1} como meio reacional (Cátodo de platina E-TEK; Suporte eletródico: papel de carbono (área = 1cm^2).



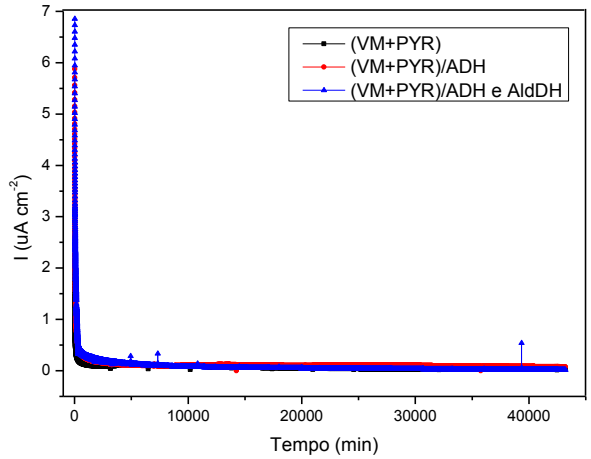
Fonte: Autoria Própria

Este trabalho mostrou claramente que os MWCNT favorecem a transferência eletrônica e aumento a densidade de potência, desta forma, realizou-se testes de densidade de potência, sempre em triplicata, em meio de etanol 100 mmol; com presença e ausência de MWCNTs na presença de uma e duas enzimas. Porém, neste caso não se observou uma melhora significativa de densidade de potência com a adição da segunda enzima, AldDH mesmo para a melhor arquitetura de filme obtida (MWCNT antes da eletropolimerização do filme).

Foram feitos experimentos de eletrólise (12 horas), assim como o mostrado no item 4.8 para esse eletrodo bienzimático. Sabe-se que a ADH converte etanol em acetaldeído e a AldDH converte acetaldeído em ácido acético. Apesar de ter sido obtida uma maior quantidade de acetaldeído, 5,01 mmol, (comparado ao sistema com

apenas a ADH), não houve formação de ácido acético como seria o esperado [154]; o que explica a melhora na densidade de potência e corrente, porém não de maneira significativa. A figura 46 mostra a eletrólise feita e a tabela 9 apresenta os resultados obtidos do presente trabalho e um exemplo da literatura para o sistema com duas enzimas. Nota-se que apesar da ausência do ácido acético, houve um maior consumo de etanol e uma melhor eficiência faradaica.

Figura 46. Curva de corrente versus tempo medida durante a eletrólise (12h) de etanol (50 mmol) para os bioânodos mono e bienzimático. Potencial aplicado: 0,6 V. Eletrólito utilizado: tampão fosfato, pH = 8,9, Temperatura = 19º C.



Fonte: Autoria Própria

Tabela 9. Resultados obtidos das eletrólises (12h) de etanol (50 mmol/L) empregando bioânodos na presença e ausência de MWCNT em pH 8,9 a 0,6V vs Ag/AgCl

Eletrodo	**Consumo de etanol (%)**	**Formação de acetaldeído (%)**	**Formação de ácido acético (%)**	**Balanço de massa (%)**	**Eficiência Faradaica (%)**
(VM-PYR)/ADH-AldDH	23,9	10,02	-	42	31
VM/ADH-AldDH [154]	23,3	13,2	1,44	63	36

Assim como para o sistema mono-enzimático, foram feitos testes de densidade de potência antes q depois da eletrólise, mas os resultados não foram apresentados aqui, pois não foi significativamente maior do que para o sistema com apenas a ADH.

Como conclusão, observa-se que os testes com cascata enzimática, ou seja, com a adição da segunda enzima, AldDH, não mostraram resultados esperados (aumentar significativamente a densidade de potência e obter mais produtos durante a eletrólise em função do dobro de elétrons gerados na reação), devido, possivelmente, à baixa atividade dessa enzima AldDH quando imobilizada.