



Universidade Federal do ABC



Fernanda Cristina Pena Ferreira Sales

Biocélula a Combustível de Glicose / Oxigênio Implantável

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM NANOCIÊNCIAS E
MATERIAIS AVANÇADOS.**

ORIENTADOR:

FRANK NELSON CRESPILHO

SANTO ANDRÉ

2013



Universidade Federal do ABC



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Cristina Pena Ferreira Sales

Biocélula a Combustível de Glicose / Oxigênio Implantável

***Trabalho apresentado como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Nanociências
e Materiais Avançados, sob
orientação do Professor Doutor
Frank Nelson Crespilho.***

SANTO ANDRÉ

2013



Universidade Federal do ABC

PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS AVANÇADOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a defesa da Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda Cristina Pena Ferreira Sales, realizada em 18 de fevereiro de 2013:

Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho (USP) – Orientador e Presidente

Prof. Dr. Flavio Leandro de Souza (UFABC) – Membro Titular

Prof. Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva (Embrapa) – Membro Titular

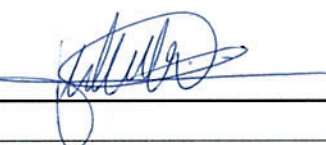
Prof. Dr. Wendel Andrade Alves (UFABC) – Membro Suplente

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCAR) – Membro Suplente

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

Santo André, 13 de maio de 2013.

Assinatura do autor: 

Assinatura do orientador: 

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo carinho e incentivo,
Ao meu marido, pelo companheirismo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Frank Nelson Crespilho, pela orientação, disposição, apoio e incentivo em iniciar uma linha de pesquisa bastante desafiadora e de extrema importância para minha formação acadêmica, intelectual e profissional;

Ao Programa de Nanociências e Materiais Avançados, da Universidade Federal do ABC, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Ao Projeto Pró-Engenharias da CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio financeiro para a realização do trabalho e participação em congressos;

À FAPESP, INEO, REDENANOBIOMED pelo apoio financeiro dos projetos do grupo de Bioeletroquímica e Interfaces. Ao IQSC pela infraestrutura para realização de parte dos experimentos deste projeto.

À Professora Dra. Maria Camila Almeida, pela colaboração e dedicação na realização dos procedimentos cirúrgicos para o implante das biocélulas a combustível em ratos.

Ao Professor Dr. Fabio H. B. de Lima, da Universidade de São Paulo, pelos experimentos de RDE. Ao Professor Dr. Edson R. Leite, da Universidade Federal de São Carlos, por ajudar nos experimentos para determinar a espessura do biofilme depositado no bioânodo pela técnica de AFM;

Ao grupo de Bioeletroquímica e Interfaces, em especial ao MSc. Marccus Martins e MSc. Rodrigo Iost pela ajuda com os experimentos eletroquímicos.

À minha família, principalmente minha mãe Célia, meus avós João e Tereza, que me auxiliaram muito, incentivando ao longo desse trabalho.

Ao meu marido Luis Henrique, por todo amor, companheirismo e pelo suporte nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, com quem compartilhei momentos de descontração e crescimento:
Carine, Sandra, Aline, Arnaldo, Dora, Max, Juliana, Marli, Freitas, Vitor, Jhoul e Paul.

A todos que participaram de forma direta e indireta para conquista desse objetivo.

Muito Obrigada!!!

“A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria.” (Will Durant)

Resumo

Biocélulas a combustíveis (BFC) são biodispositivos que convertem energia química em energia elétrica, onde biocatalisadores (enzimas ou microorganismos) são utilizados nas reações redox. Neste trabalho, apresenta-se o desenvolvimento de uma BFC enzimática de glicose/O₂ miniaturizada, com a finalidade de implantá-la em ratos e avaliar suas propriedades eletroquímicas *in vivo*. Para isso, desenvolveram-se eletrodos de fibras flexíveis de carbono (FCF) dentro de um cateter (diâmetro interno 0,5 mm) para o implante intravenoso em um rato da espécie *Rattus norvegicus*. O cátodo foi composto por FCF modificada com nanopartículas de platina estabilizadas com dendrímero poliaminoamina, enquanto que o bioânodo, consistiu-se em FCF modificada com enzima glicose oxidase (GOx) e o mediador redox vermelho neutro (NR). Realizaram-se estudos de bioeletrocatalise em meia-cela em condições fisiológicas (solução tampão de fosfato pH 7,2), onde tanto o cátodo como o bioânodo se mostraram estáveis para a redução de oxigênio molecular e oxidação de glicose, respectivamente. Verificou-se que a BFC em condições fisiológicas (*in vitro*) produziu uma potência máxima de 240 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em 250 mV, ao passo que uma vez implantada (*in vivo*), a mesma apresentou uma densidade de potência máxima de 95 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em 80 mV. As principais características positivas da BFC foram a flexibilidade dos microeletrodos de FCF e a transferência eletrônica mediada pelo NR. As razões da perda de potência máxima observada para a BFC operando *in vivo* (de 240 para 95 $\mu\text{W cm}^{-2}$) ainda vêm sendo analisadas. No entanto, esse valor de potência obtido para BFC implantada é maior do que os já reportados na literatura.

Palavras – chave: biocélula a combustível enzimática, implante intravenoso, fibras flexíveis de carbono, glicose oxidase, vermelho neutro.

Abstract

Biofuel cell (BFC) are biodevices that convert chemical energy into electric energy, where biocatalysts are used in the redox reaction. In this work we show the development of miniaturized glucose/O₂ enzymatic BFC to evaluate the electrochemical properties *in vivo*. For this purpose, flexible carbon fibers (FCF) electrodes within a catheter (internal diameter 0.5 mm) for intravenous implant in a rat (species *Rattus norvegicus*) were obtained. The cathode was based on FCF modified with platinum nanoparticles stabilized with PAMAM dendrimer; whereas bioanode consisted on FCF modified with enzyme glucose oxidase (GOx) and the redox mediator neutral red (NR). For half-cell experiments under physiological conditions (phosphate buffer solution pH 7.2), both the cathode and the bioanode showed high stability for oxygen reduction and glucose oxidation, respectively. It was verified that the BFC under physiological conditions (*in vitro*) produced a maximum power density of 240 $\mu\text{W cm}^{-2}$ at 250 mV. When implanted (*in vivo*), the BFC showed a maximum power density of 95 $\mu\text{W cm}^{-2}$ at 80 mV. The main attractive characteristics of BFC were the flexibility of microelectrodes and electronic transfer mediated by NR. Moreover, the reasons for the loss of maximum power density observed for biofuel cell operating *in vivo* (from 240 to 95 $\mu\text{W cm}^{-2}$) is under investigation. The power density of the developed BFC was found to be the highest among those reported thus far.

Keywords: enzymatic biofuel cell, intravenous implantable, flexible carbon fiber, glucose oxidase, neutral red.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Biocélulas a combustível	15
1.1.1 A glicose oxidase	16
1.1.2 Biocélulas a combustível implantáveis.....	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	22
3.1 Materiais e Reagentes.....	22
3.2 Síntese das nanopartículas de PAMAM/Pt	23
3.3 Eletrodos de FCF modificados com nanopartículas de platina.....	23
3.4 Imobilização da enzima Glicose Oxidase em FCF.....	24
3.5 Caracterização do ânodo e cátodo	25
3.5.1 Determinação da espessura do biofilme NR/GOx formado na superfície das FCF	25
3.6 Estudos <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i> do dispositivo para utilização como biocélulas a combustível glicose/O₂.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1 Estudo de redução de oxigênio para os diferentes tipos de eletrodo.....	28
4.2 Estudo de redução de oxigênio no cátodo FCF-PAMAM/PtNP.....	30
4.3 Oxidação de glicose utilizando eletrodos de FCF-NR/GOx.....	31
4.3.1 Caracterização do bioânodo	31
4.3.1.1 Mediador vermelho neutro	32
4.3.1.2 Composição da superfície: Quantificação da enzima GOx	33
4.3.1.3 Espessura do biofilme no bioânodo.....	36
4.3.2 Oxidação de glicose	38
4.4 Estudo da BFC <i>in vitro</i>	39
4.5 Estudo da BFC <i>in vivo</i>	41
5 CONCLUSÃO.....	47
7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	48
8 REFERÊNCIAS	49
9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS – 02/2011 a 01/2013.....	52

9.1 Artigo	52
9.2 Prêmios	52
9.3 Participações em Eventos e Congressos	52
9.5 Disciplinas Coursadas	54

Lista de Figuras

- Figura 1** – Esquema de uma biocélula a combustível operando na presença de sangue (Adaptado da referência 19).....15
- Figura 2** – Representação da estrutura da glicose oxidase obtida a partir de *Aspergillus Niger* (PDB código 1GPE; estrutura extraída de Hecht et. al.) mostrando a proteína em fitas e o cofator FAD em seu interior.....17
- Figura 3** – Representação esquemática da transferência de elétrons; A) transferência direta de elétrons (DET) do FAD para a superfície eletródica; B) transferência de elétrons mediada (MET) do FAD para a molécula vermelho neutro (NR) e do NR para a superfície do eletrodo.....18
- Figura 4** – Secção da cela, constituída de duas fibras de carbono de 7 μm . Imagem retirada da referência 52.....19
- Figura 5** – Implante da biocélula a combustível glicose/ O_2 no abdômen do rato vivo. A) Esquema do dispositivo na forma de pastilhas de grafite no cátodo quinona/hidroquinona e PPO e no ânodo ubiquinona/ubiquinol, glicose oxidase e catalase; B) fotografia da biocélula em uma bolsa de diálise; C) Biocélula implantada no abdômen do animal. Figura retirada da referência 49.....20
- Figura 6** – Representação esquematizada da preparação do eletrodo FCF-PAMAM/PtNP.....23
- Figura 7** – Representação esquematizada da preparação do eletrodo FCF-NR/GOx.....24
- Figura 8** – Desenvolvimento do dispositivo a partir de fibras flexíveis de carbono (FCF) para a otimização do implante intravenoso. A) Comparação entre a fibra de carbono e o cateter com uma moeda; B) geometria ideal para o implante intravenoso e reprodutibilidade dos eletrodos; C) diminuição dos eletrodos apresentados em B para inseri-lo na veia jugular; D) BFC miniaturizada ideal desenvolvida para o implante; E) Zoom do dispositivo com um aumento de 100 vezes o tamanho real, imagem obtida por

microscopia ótica.....	26
------------------------	----

Figura 9 – Etapas da cirurgia para o implante da BFC. A) Representação esquemática do animal da espécie *Rattus norvegicus*. B) Localização da veia jugular. C) Isolação da veia jugular para realizar o implante do bioeletrodo. D) Inserção da biocélula a combustível na veia jugular do rato. E) BFC implantada. F) Bioeletrodo implantado e conectado ao potenciostato Autolab PGSTAT 12 acoplado a um Módulo de Baixa-Corrente. Procedimento Cirúrgico aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal CEUA/UFABC (Protocolo 001/2010) e realizado pela Profª. Dra. Maria Camila Almeida.....

27

Figura 10 – a) Voltametria linear obtida para o micro fio de platina (cinza) e FCF modificada com PAMAM/PtNP (preta) na presença de O₂ saturado. Velocidade de varredura: 10 mV s⁻¹. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2); b) Ampliação da região para o micro fio de platina.....

28

Figura 11 – Voltametria linear obtida para os eletrodo de carbono vítreo (GC) (preto), GC-PAMAM (vermelho), GC-PAMAM/PtNP (azul) e FCF-PAMAM/ptNP (verde) na presença de O₂ saturado. Velocidade de varredura: 10 mV s⁻¹. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).....

29

Figura 12 – Ampliação da região da figura 11 para redução de O₂ para o eletrodo de carbono vítreo na presença e ausência de PAMAM e PtNP.....

30

Figura 13 – Curvas de polarização obtidas a 10 mV s⁻¹ utilizando eletrodos de FCF-PAMAM/PtNP na presença (azul) e na ausência (preta) de O₂. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).....

31

Figura 14 – Cronoamperometria do bioânodo FCF depois da adsorção do NR durante 12 horas. Sobrepotencial aplicado: 0,40 V. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹ pH = 7,2).....

32

Figura 15 – Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis do Gt (0,42%) (curva preta), BSA (0,17 mg mL⁻¹) (curva vermelho), GOx (0,5 mg mL⁻¹) (curva azul) e da mistura das soluções de (GA + GOx + BSA) (curva verde). Todas as soluções foram preparadas em PBS (50 mmol L⁻¹ pH = 7,2).....

34

- Figura 16** – Espectro de UV-Vis para diluição da solução (GOx + BSA + GA) e o espectro eletrônico da mesma solução depois da imersão dos bioânodos durante 12 horas (curva preta). Todas as soluções foram preparadas em PBS (50 mmol L⁻¹, pH=7,2).....34
- Figura 17** – Ampliação do espectro de UV-Vis da figura 16. Todas as soluções foram preparadas em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).....35
- Figura 18** – Absorbância *versus* concentração de GOx em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2). O valor da absorbância foi obtido em $\lambda = 451$ nm.....35
- Figura 19** - Imagem de AFM do microeletrodo de FCF antes e depois da modificação com o biofilme de NR/GOx.....36
- Figura 20** - Gráfico apresenta a distância da ponta de AFM vs. superfície do substrato com um aumento de 70 nm após a deposição do biofilme na superfície da FCF (curva em vermelho) em relação à FCF na ausência do biofilme (curva em preto).....37
- Figura 21** – Curva de Polarização de meia-cela para o bioânodo para oxidação de glicose. A curva preta apresenta a polarização do eletrodo modificado com enzimas GOx sem adição de glicose. A curva vermelha mostra o bioânodo com adição de glicose em concentração final de 47 mmol L⁻¹. Observa-se o processo de oxidação de glicose em -400 mV. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).....38
- Figura 22** – Diagrama eletroquímico de FCF-NR/GOx||FCF-PAMAM-PtNP para oxidação da glicose e redução O₂. Os parâmetros eletroquímicos foram obtidos a partir das Figuras 13 e 20.....40
- Figura 23** – Curva de Potência de operação da BFC com uma concentração de glicose de 47 mmol L⁻¹. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).....40
- Figura 24** – Curva de Potência de operação para BFC *in vivo*. Experimento realizado dentro da veia jugular do rato vivo da espécie *Rattus norvegicus*.....41

Figura 25 – Voltametria linear para FCF-PAMAM/PtNP na presença e ausência de 47 mmol L ⁻¹ de glicose. Velocidade de varredura: 10 mV s ⁻¹ . Eletrólito: PBS (50 mmol L ⁻¹ , pH =7,2).....	44
Figura 26 – Voltametria linear para eletrodos de diferentes configurações na presença e ausência de 47 mmol L ⁻¹ de glicose e gás oxigênio saturado. Velocidade de varredura: 10 mV s ⁻¹ . Eletrólito: PBS (50 mmol L ⁻¹ , pH = 7,2).....	45
Figura 27 – Estabilidade em longo prazo da densidade de potência do implante intravenoso da BFC durante 24 horas.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da biocélulas a combustível enzimáticas.....16

Tabela 2 – Parâmetros obtidos a partir da integração dos cronoamperogramas.....33

Tabela 3 – Parâmetros eletroquímicos de meia-cela e BFC miniaturizada.....42

Lista de Abreviações

- A – Área do eletrodo (cm^2)
- AFM – Microscopia de Força Atômica (do inglês, *Atomic Force Microscopy*)
- BFC – Biocélula a Combustível (do inglês, *Biofuel Cell*)
- BSA – Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)
- C – Concentração (mol L^{-1})
- D – Coeficiente de Difusão
- DET – Transferência Eletrônica Direta (do inglês, *Direct Electronic Transfer*)
- E_a – Potencial anódico (V)
- E_c – Potencial catódico (V)
- E_{cell} – Potencial da célula (V)
- FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo
- FC – Célula a Combustível (do inglês, *Fuel Cell*)
- FCF – Fibras Flexíveis de Carbono (do inglês, *Flexible Carbon Fiber*)
- GA – Glutaraldeído
- GOx- Glicose Oxidase
- J – Densidade de corrente (A cm^{-2})
- LB – Langmuir – Blodgett
- MET – Transferência Eletrônica Mediada (do inglês, *Mediated Electronic Transfer*)
- n – número de elétrons
- NPs – Nanopartículas
- NR – Vermelho Neutro (do inglês, *Neutral Red*)
- OCP – Potencial de Circuito Aberto (V) (do inglês, *Open Circuit Potential*)
- PAMAM – Poliaminoamina
- P – Densidade de Potência (W cm^{-2})
- PBS – Solução Tampão Fosfato (do inglês, *Phosphate Buffer Solution*)
- PtNP – Nanopartículas de Platina
- Q – Carga (C)
- t – Tempo
- UV-Vis – Ultravioleta -Visível

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocélulas a combustível

Biocélula a combustível (BFC) é um tipo de célula a combustível que converte energia química em energia elétrica e, ao invés de utilizar catalisadores inorgânicos como platina, óxidos metálicos e ligas metálicas em reações eletroquímicas, utilizam-se enzimas¹ ou microorganismos² como catalisadores³. Uma BFC possui dois eletrodos bioeletrocatalíticos, um para a oxidação dos compostos orgânicos⁴⁻⁸ e outro para redução de O_2 ⁹⁻¹⁵ ou outro oxidante, como peróxido de hidrogênio¹⁶⁻¹⁸.

No caso de BFC do tipo enzimática, as enzimas imobilizadas na superfície dos eletrodos são responsáveis por acelerar a reação eletroquímica. Enzimas são conhecidas por sua específica atividade catalítica. O interesse em desenvolver biodispositivos baseados em enzimas, como BFC e biossensores, está na aplicação em aparelhos implantáveis, principalmente para utilização na medicina¹⁹. A figura 1 mostra um esquema de uma BFC operando em vaso sanguíneo utilizando glicose como combustível e gás oxigênio dissolvido como oxidante¹⁹.

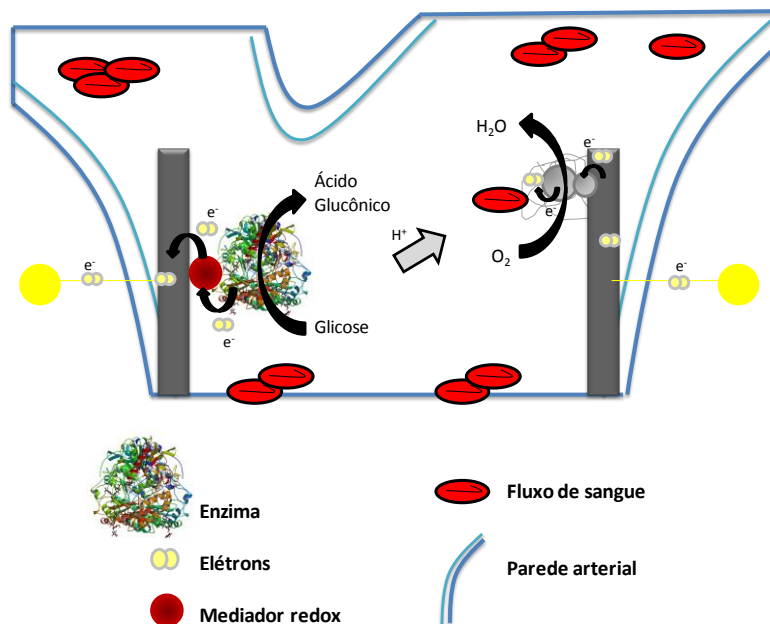


Figura 1 – Esquema de uma biocélula a combustível operando na presença de sangue (Adaptado da referência 19).

Biocélulas a combustível baseadas em enzimas vêm sendo relatadas desde 1960²⁰. Estudos para compreender os mecanismos das reações catalisadas por enzimas^{21, 22},

desenvolvimento de novos biomateriais²³⁻²⁷, modificação enzimática²⁸⁻³², métodos de imobilização³²⁻³⁹ e estrutura de eletrodos⁴⁰, são abordados na literatura com o intuito de melhorar o desempenho dos eletrodos aplicados em BFC. Também, ao longo das últimas décadas, vários trabalhos abordaram a importância da interface eletrodo condutor/biocatalisador, principalmente relacionado à transferência eletrônica entre eletrodos e enzimas, onde a transferência direta ou mediada é abordada^{1, 2, 8, 41}. No entanto, aplicações práticas ainda requerem atenção considerável em relação aos problemas das BFC, como operação em longo prazo, miniaturização e eficiência na conversão energética^{8, 39, 42}.

Dentre os combustíveis renováveis aplicáveis em BFC, a glicose vem sendo amplamente explorada⁴³. Outra grande vantagem em se utilizar a glicose como combustível é a sua presença no sangue de organismos vivos. Geralmente, a concentração de glicose no sangue está no intervalo de 3 a 5 mmol L⁻¹, enquanto que o oxigênio é de aproximadamente 45 μmol L⁻¹, possibilitando o desenvolvimento de BFC de glicose/O₂ para implantes em humanos. Segundo Armstrong e colaboradores, a utilização de enzimas para o desenvolvimento de biocélulas a combustível apresenta algumas vantagens e desvantagens, como mostra a Tabela 1¹.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da biocélulas a combustível enzimática¹

<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Sobrepotencial próximo de zero	Baixa densidade de corrente por volume de catalisador
Enzimas são infinitamente renováveis	Tempo, custo de isolamento e purificação das enzimas
Excelente especificidade	Baixa estabilidade e restrita gama de temperatura
Oxidação (biológico) de combustível	Em alguns casos, dificuldade na imobilização no eletrodo
Pode ser usado em dispositivos descartáveis e completamente biodegradável	

1.1.1 A glicose oxidase

A glicose oxidase (GOx) é uma enzima redox que catalisa a reação de oxidação de glicose, sendo uma das enzimas mais estudadas para a aplicação em bioânodos de BFC. A estrutura da GOx é apresentada na figura 2. Observa-se que o cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) fica situado no interior de uma estrutura proteica, fato esse

que tem sido relatado com uma das principais causas que limita a transferência de elétrons direta entre o mesmo e a superfície eletródica¹.

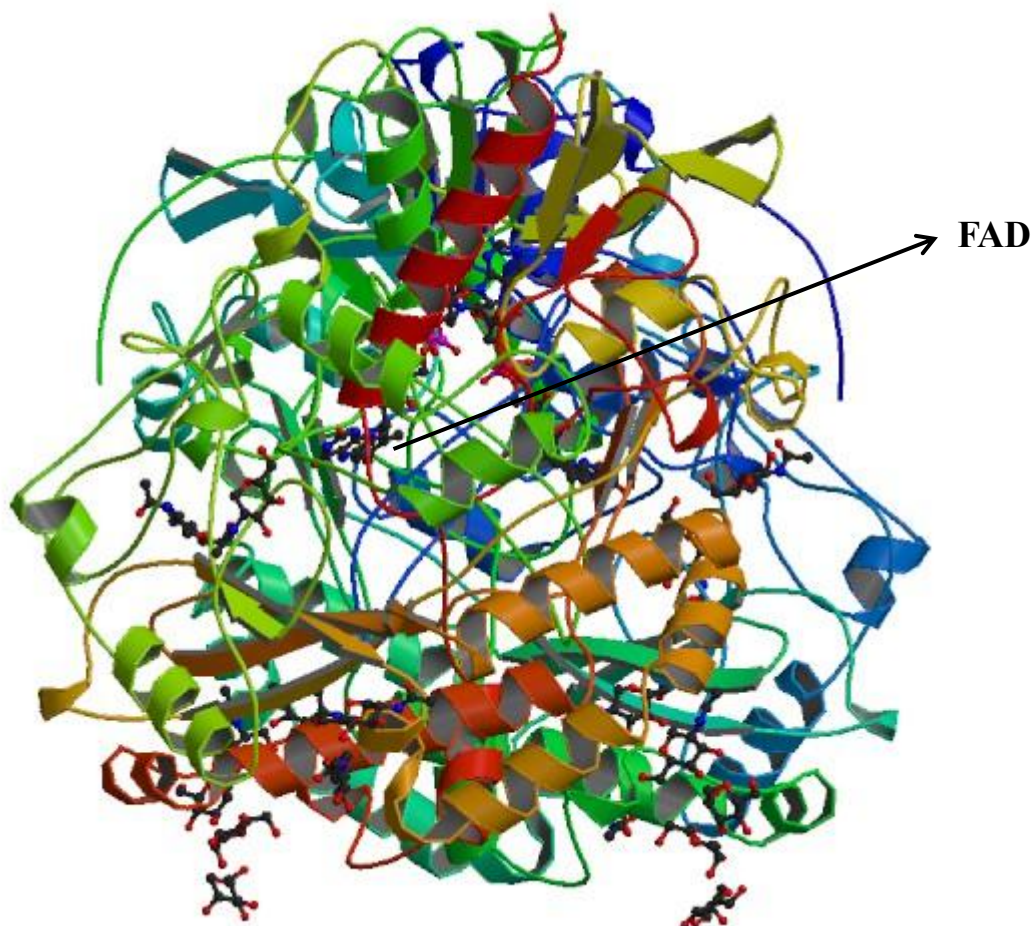


Figura 2 – Representação da estrutura da glicose oxidase obtida a partir de *Aspergillus Niger* (PDB código 1GPE; estrutura extraída de Hecht et. al.)⁴⁴ mostrando a proteína em fitas e o cofator FAD em seu interior.

Como já mencionado, pode-se generalizar que, em enzimas redox, a presença do cofator no interior de uma estrutura terciária ou quaternária distancia o centro redox enzimático da superfície do eletrodo, o que pode impossibilitar a transferência direta de elétrons. Segundo Yu e Scott¹⁹, para uma distância maior que 2,1nm, a transferência de elétrons pode ocorrer de forma muito lenta, ou até mesmo não ocorrer. Para eliminar esse problema, modificações de natureza química são realizadas na estrutura da enzima^{29, 45, 46} para facilitar a transferência de elétrons. Outra estratégia é o emprego de mediadores redox^{46, 47}, dos quais promovem uma transferência mediada de elétrons, conforme ilustrado na figura 3.

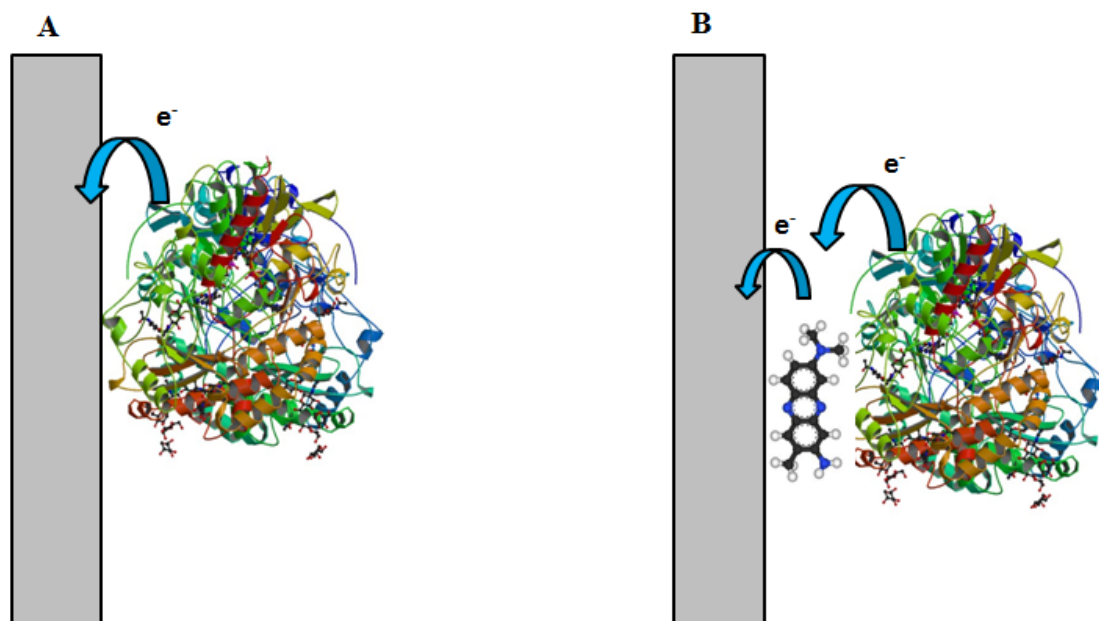


Figura 3 – Representação esquemática da transferência de elétrons; A) transferência direta de elétrons (DET) do FAD para superfície eletrodica; B) transferência de elétrons mediada (MET) do FAD para a molécula vermelho neutro (NR) e do NR para a superfície do eletrodo.

1.1.2 Biocélulas a combustível implantáveis

As principais características de BFC implantáveis, para aplicação *in vivo*, são o tamanho e a eficiência biocatalítica. Heller e coautores⁴⁸ foram os pioneiros no conceito de BFC de glicose/ O_2 miniaturizada, com densidade de potência máxima de $4,3 \mu W \text{ mm}^{-2}$ em 0,52 V. Cosnier e colaboradores⁴⁹ demonstraram pela primeira vez uma BFC implantada no abdômen de um rato vivo, com uma potência máxima de $2 \mu W$ em 0,08 V. Mais recentemente, o grupo de Rasmussen apresentou uma BFC dentro de um inseto (barata), gerando uma densidade de potência máxima de $55 \mu W \text{ cm}^{-2}$ em 0,20 V⁵⁰.

Uma questão associada à complexidade de BFC implantáveis é o próprio processo de implante em si, envolvendo procedimentos cirúrgicos com intuito de alojar o biodispositivo em determinada região do organismo. Uma BFC implantada em um vaso sanguíneo, por exemplo, não deve agir como um agente coagulante, assim como, não conduzir queda de pressão arterial. Ao mesmo tempo, a BFC precisa estar eletricamente ligada ao exterior do vaso sanguíneo, de modo que a energia produzida seja acessível. Acima de tudo, as paredes dos vasos não devem ser danificadas pela inserção ou presença contínua da BFC⁴¹.

Assim, o tamanho dos eletrodos e a geometria dos materiais são fatores cruciais para a preparação de BFC implantáveis. Com isso, a miniaturização de BFC tem sido foco de muitos pesquisadores nas últimas décadas^{1, 42, 51, 52}. Com o surgimento de novas técnicas de manipulação e fabricação de eletrodos aplicáveis em dispositivos eletroquímicos⁵³, o desenvolvimento de plataformas cada vez mais sensíveis e seletivas possibilita uma variedade de aplicações, principalmente em biochips implantáveis⁵⁴ e eletrodos aplicáveis à biocélulas a combustível⁵⁵. O grupo de Heller⁵² foi o primeiro a miniaturizar BFC contendo fibras de carbono com diâmetro de 7 μm que permite o desenvolvimento de BFC implantáveis. Duas dessas fibras foram colocadas em um suporte de policarbonato. Uma das extremidades de cada fibra foi fixada com resina epóxi e a outra extremidade foi ligada eletricamente a um fio de cobre por meio de uma tinta condutora de carbono. A figura 4 mostra as partes do ânodo e do cátodo. A área ativa de cada fibra foi de 0,44 mm^2 .

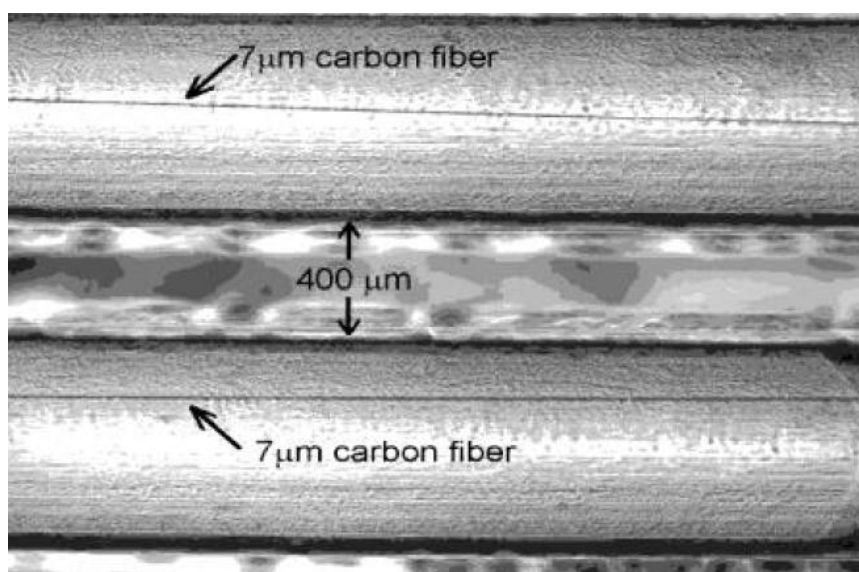


Figura 4 – Seção da cela, constituída de duas fibras de carbono de 7 μm . Imagem retirada da referência 52.

Utilizando outra estratégia, Cosnier e colaboradores⁴⁹ desenvolveram eletrodos para a fabricação de BFC que foram implantados na região do abdômen de um rato. Os eletrodos foram preparados por compressão mecânica de partículas de grafite, enzima e mediador redox, com geometria na forma de um disco. Um fio de platina foi fixado com cola condutora ao lado do disco de grafite⁴⁹, conforme mostrado na figura 5. Em outro trabalho⁴², os autores prepararam os eletrodos por compactação de nanotubos e enzimas

em uma prensa hidráulica. A dimensão dos discos resultantes foram de 3 mm de espessura e 13 mm de diâmetro, e o isolamento foi realizado apenas de um lado, deixando o outro exposto (superfície 1,3 cm²). A superfície exposta foi coberta por uma película de celulose para evitar a perda de enzima ou nanotubo para o eletrólito.

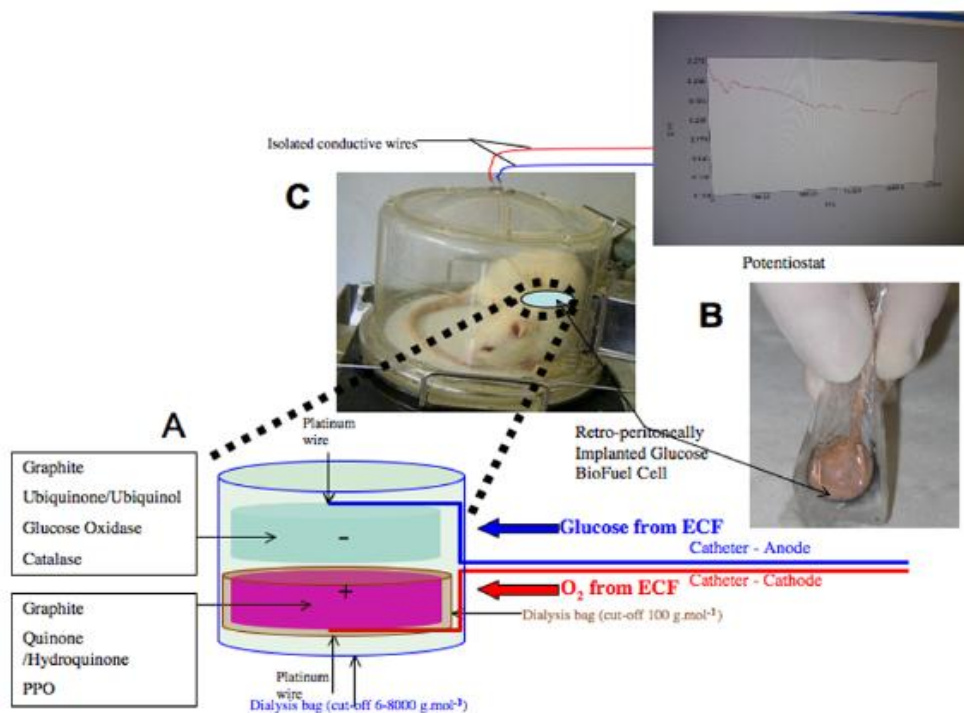


Figura 5 – Implante da biocélula a combustível glicose/O₂ no abdômen do rato vivo. A) Esquema do dispositivo na forma de pastilhas de grafite no cátodo quinona/hidroquinona e PPO e no ânodo ubiquinona/ubiquinol, glicose oxidase e catalase; B) fotografia da biocélula em uma bolsa de diálise; C) Biocélula implantada no abdômen do animal⁴⁹. Figura retirada da referência 49.

No que tange BFC implantáveis em região intravenosa, é necessário considerar o fluxo de glicose no sangue, a geometria dos eletrodos e a incorporação das BFC nas paredes dos vasos sanguíneos sem danificá-los. É esse um dos objetivos deste trabalho, onde se propõe o desenvolvimento de uma BFC miniaturizada composta por fibras flexíveis de carbono para o implante intravenoso, como veremos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O principal objetivo desse trabalho foi desenvolver uma BFC enzimática de glicose/O₂ miniaturizada. Construiu-se um bioânodo enzimático eficiente para oxidação da glicose e um cátodo com nanopartículas de platina (PtNP) estabilizadas com dendrímero poliaminoamida (PAMAM), ambos a partir de fibras flexíveis de carbono (FCF). Também, implantou-se a BFC em ratos e avaliou-se as propriedades eletroquímicas *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver uma BFC baseada em eletrodos de fibras flexíveis de carbono para o implante intravenoso.
2. Construir um bioânodo utilizando a enzima GOx e o vermelho neutro (NR). A utilização do NR visa a mediação de elétrons entre o cofator enzimático da GOx e a superfície eletródica.
3. Sintetizar nanopartículas de platina estabilizadas com dendrímero PAMAM e modificar a superfície do eletrodo com as nanopartículas, visando a redução de O₂.
4. Realizar estudos *in vitro* e *in vivo* com BFC de glicose/O₂.

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A metodologia experimental está dividida em quatro etapas. Na primeira, tem-se a preparação do dispositivo. Em seguida, descreve-se a síntese das nanopartículas de platina (PAMAM/Pt). Depois, tem-se os métodos para modificação dos eletrodos de fibras flexíveis de carbono com as nanopartículas, assim como imobilização da enzima GOx na superfície eletródica. Após a preparação da BFC e obtenção dos resultados *in vitro*, realizou-se o procedimento cirúrgico no rato da espécie *Rattus norvegicus* para inserção da BFC na veia jugular do animal. Por fim, descrevem-se as técnicas de caracterização utilizadas durante a execução de todas as etapas experimentais que foram realizadas.

3.1 Materiais e Reagentes

As vidrarias utilizadas no preparo de soluções em cada etapa experimental foram previamente limpas com solução de permanganato de potássio (KMnO_4) e, em seguida, com solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (4:1)). Após esse processo, todas as soluções foram preparadas com água deionizada, purificada com um sistema Millipore (Milli-Q com membrana porosa de 0,22 μm) com resistividade de 18 $\text{M}\Omega\text{ cm}$. As fibras flexíveis de carbono (FCF) foram obtidas de tecido flexível de carbono (PWB-3, Stackpole, USA). Utilizou-se cola prata (Silver Adhesive 503, 62%, weight solids EMS) e resina epoxi para o desenvolvimento dos microeletrodos.

As fibras foram pré-tratadas com ácido nítrico concentrado (65%), lavadas com água deionizada. Em seguida, secaram-se as fibras em temperatura ambiente. Foram utilizados enzima glicose oxidase (GOx, E. C. 1.1.3.4, *Aspergillus niger*, 24 U mg^{-1}), α -D(+)-glicose, glutaraldeído (25% v/v), albumina de soro bovino (BSA) e NR (90%) da marca Sigma Aldrich. Ácido nítrico utilizado foi da marca Vetec, Brasil. A solução de glicose (1 mol L^{-1}) foi estocada na geladeira a 7°C durante 24 horas. Todas as soluções foram preparadas usando água Millipore Milli-Q. Como eletrólito para os experimentos eletroquímicos *in vitro*, foi utilizado solução tampão NaPBS e $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PBS) (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$, $T = 25^\circ\text{C}$).

3.2 Síntese das nanopartículas de PAMAM/Pt

As nanopartículas de platina foram obtidas da seguinte maneira: utilizou-se 1 mL de solução aquosa de polieletrólito PAMAM (1 mmol L^{-1}) adicionando-se 1 mL de solução aquosa do precursor de H_2PtCl_6 (1 mmol L^{-1}). Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução do agente redutor, ácido fórmico (1 mmol L^{-1}), a fim de reduzir os íons a Pt^0 . A cor da dispersão foi alterada mediante a formação das PtNP após 4 horas. Posteriormente, manteve-se a suspensão estocada na ausência de luz. As nanopartículas formadas foram utilizadas no preparo dos eletrodos, como descrito no tópico seguinte.

3.3 Eletrodos de FCF modificados com nanopartículas de platina

O processo de adsorção foi utilizado no preparo dos eletrodos modificados com nanopartículas metálicas, onde o eletrodo FCF (área geométrica $1,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$) foi imerso em uma dispersão de PtNP (diâmetro médio de 3,0 nm, obtido por microscopia eletrônica de transmissão)⁵⁶ estabilizada com dendrímero PAMAM^{56, 57} durante 12 horas. Assim, obteve-se um eletrodo com configuração FCF-PAMAM/PtNP (Figura 6).

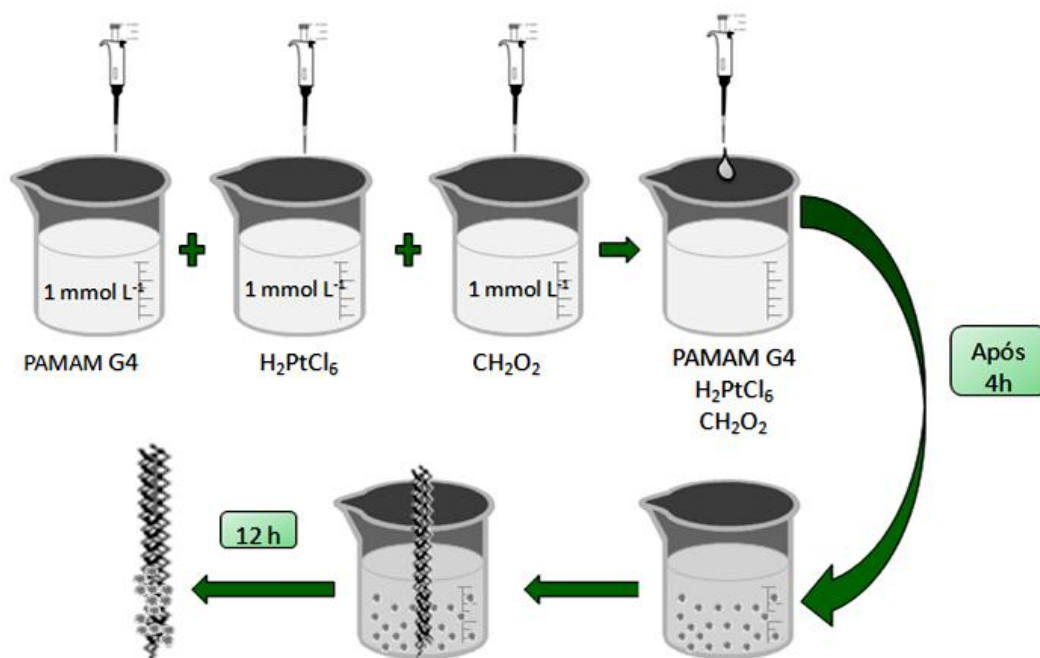


Figura 6 – Representação esquematizada da preparação do eletrodo FCF-PAMAM/PtNP.

3.4 Imobilização da enzima Glicose Oxidase em FCF

Para a imobilização enzimática na FCF, utilizou-se a metodologia de entrecruzamento (cross-linking), com a GOx na presença de albumina de soro bovino (BSA), glutaraldeído (GA) e NR^{59, 60}. Esse método foi utilizado para estabelecer uma ligação entre as aminas do BSA e GOx, a fim de fixar fortemente as enzimas no eletrodo⁶¹. Utilizou-se o BSA nessa imobilização devidos aos grupos lisina em sua estrutura, que acelera o processo de entrecruzamento⁶², além de manter a atividade catalítica da enzima comparado com o entrecruzamento direto com a GOx^{62, 63}. Além disso, foi evidenciado em um trabalho anterior que os sítios catalíticos da enzima ficam mais acessíveis a reações redox quando na presença de BSA⁶³. Com base nessas informações, utilizou-se o eletrodo FCF para desenvolver o bioânodo. Primeiramente, imergiu-se o eletrodo FCF durante 12 horas a 4°C em uma solução contendo GOx (1 mg mL⁻¹), BSA (1 mg mL⁻¹), NR (5 mM) e GA (2,5%). Esses últimos foram preparados em solução tampão fosfato de sódio (pH = 7.2), na proporção 3:1:1:1. Após a imobilização, secou-se cuidadosamente o eletrodo à temperatura ambiente (25°C) (Figura 7). A configuração final do bioânodo é representada por FCF-NR/GOx.

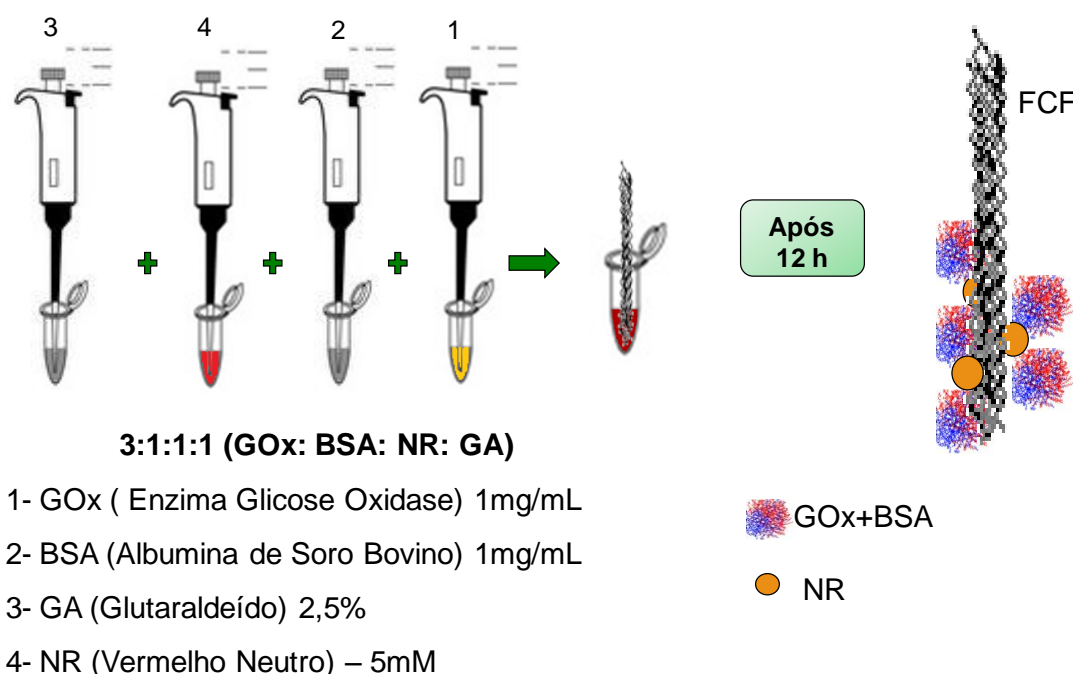


Figura 7 – Representação esquematizada da preparação do eletrodo FCF-NR/GOx.

3.5 Caracterização do ânodo e cátodo

Após o desenvolvimento do cátodo e bioânodo, realizou-se estudos em meia-cela eletroquímica (500 μL) com eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ e um fio de Pt como contra-eletrodo. O eletrólito utilizado foi PBS (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$) e os dados foram obtidos em um potenciostato/galvanostato (AUT84223, Autolab) com um módulo de baixa corrente (ECD) acoplado.

Dez eletrodos foram submetidos a um microscópio óptico para medidas da área geométrica. Os eletrodos foram divididos em várias seções cilíndricas e suas áreas geométricas foram somadas para obter a área geométrica do eletrodo inteiro. Estimou-se a densidade de corrente (J) normalizando as medidas de correntes baseadas na área geométrica (corrente/área geométrica).

3.5.1 Determinação da espessura do biofilme NR/GOx formado na superfície das FCF

A microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada com o objetivo de avaliar a espessura e morfologia do biofilme NR/GOx formado na superfície das FCF. As medidas foram feitas fixando-se as FCF sobre um substrato vítreo (50,00 mm x 24,00 mm, espessura 0,16 mm), utilizando-se resina epóxi. O procedimento de fixação das fibras no substrato vítreo foi uma etapa crucial na determinação da espessura do filme proteico de NR/GOx, que foi depositado previamente por *dropping* de 50 μL de uma solução de GOx:NR:BSA:GA em PBS (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$) na proporção 3:1:1:1. Após a deposição, secou-se o substrato a temperatura ambiente por 1 hora. Para a realização das medidas de AFM, utilizou-se o equipamento Nanosurf easyscan 2 localizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). As medidas foram realizadas no modo contato de inflexão, contraste de fase com amplitude de 0,5 V, ponto de ajuste de 50% para FCF e 80% para a FCF modificada com o biofilme de NR/GOx e passo de ponta de 2,0 linhas por segundo. Com isso, obtiveram-se informações da espessura e morfologia das FCF na presença do biofilme depositado.

3.6 Estudos *In Vitro* e *In Vivo* do dispositivo para utilização como biocélulas a combustível glicose/O₂

A figura 8 apresenta a progressão do desenvolvimento da BFC, a fim de otimizar o implante na veia jugular do animal. A geometria ideal para o implante da BFC foi desenvolvida de forma que uma das extremidades das fibras fossem colocadas em contato com um fio de cobre, fixado-os com cola prata para estabelecer contato elétrico. Depois da secagem da cola, o contato foi isolado com resina epoxi, para que não houvesse contato direto do cobre e da prata com o eletrólito. Um dos eletrodos foi inserido dentro de um cateter (diâmetro interno 0,5 mm, diâmetro externo 0,9 mm) e o outro foi enrolado e isolado com resina na parte externa do mesmo. Assim, o cátodo e o bioânodo foram colocados lado a lado de forma a impossibilitar curto circuito.

No experimento *in vitro*, as densidades de corrente e de potência são analisadas em função do sobrepotencial, em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

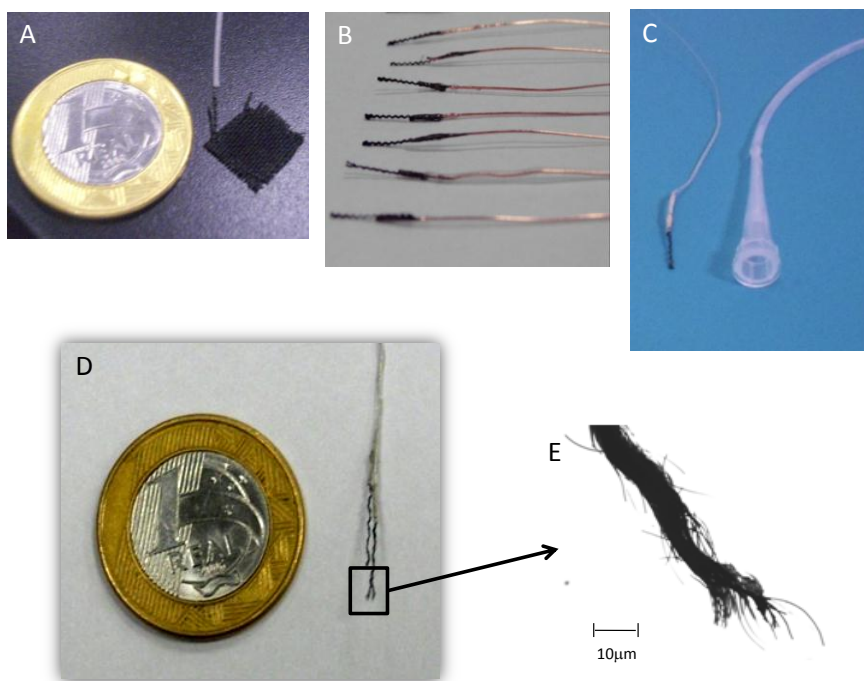


Figura 8 – Desenvolvimento do dispositivo a partir de fibras flexíveis de carbono (FCF) para a otimização do implante intravenoso. A) Comparação entre as fibras de carbono e o cateter com uma moeda; B) geometria ideal para o implante intravenoso e reprodutibilidade dos eletrodos; C) diminuição dos eletrodos apresentados em B para inseri-lo na veia jugular; D) BFC miniaturizada ideal desenvolvida para o implante; E) Zoom do dispositivo com um aumento de 100 vezes o tamanho real, imagem obtida por microscopia ótica.

Realizou-se os experimentos *in vivo* em triplicata durante um período de 24 horas. Para isso, inseriu-se a BFC dentro da veia jugular de três ratos adultos machos Wistar (CEMIB/Unicamp, Campinas), sob aprovação do protocolo do Comitê de Ética de Uso e Cuidados de Animais da UFABC (número do protocolo 2010/001). Antes da realização dos experimentos, submeteram-se os ratos a um ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas (acenderam-se as luzes às 7 horas da manhã) em temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais pesavam aproximadamente 320g. Realizou-se o procedimento cirúrgico com os ratos anestesiados com uretano ($1,2\text{g kg}^{-1}$ i.p.). Os ratos foram colocados na posição supinos em uma almofada isotérmica, mantendo-os em 37°C , para evitar hipotermia. Realizou-se uma incisão longitudinal a 1,0 cm da superfície ventral do pescoço e 1,0 cm à esquerda da traquéia. Após a retração muscular, retirou-se o tecido conjuntivo e a veia jugular foi exposta e isolada. Implantou-se a BFC na veia jugular com um cateter de polietileno (diâmetro interno 0,5 mm, diâmetro externo 0,9 mm), conforme mostrado anteriormente. A figura 9 apresenta as etapas do procedimento cirúrgico.

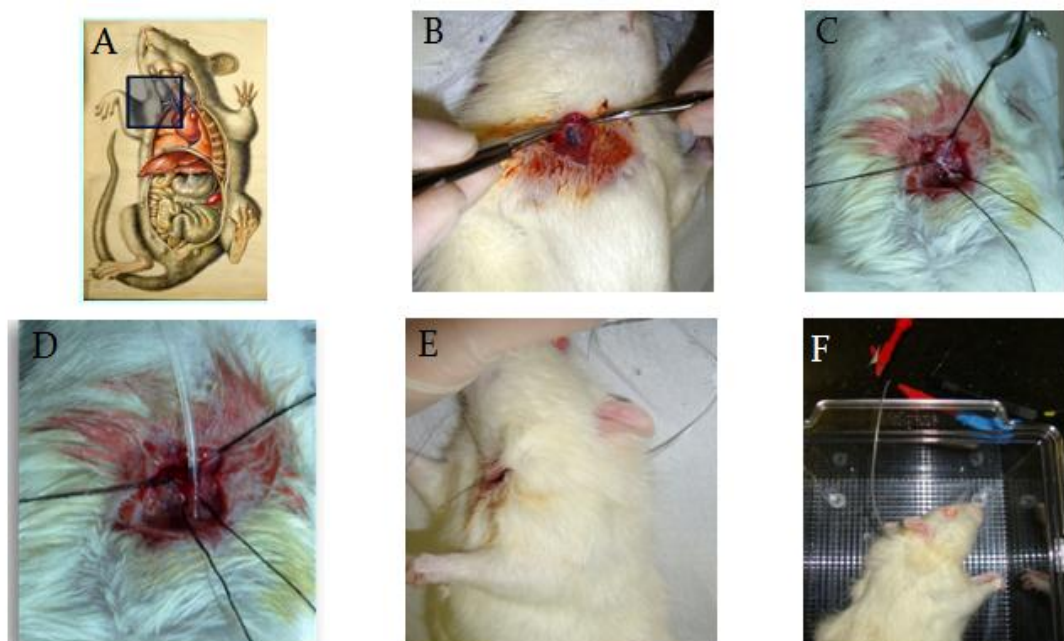


Figura 9 – Etapas da cirurgia para o implante da BFC. A) Representação esquemática do animal da espécie *Rattus norvegicus*⁶⁴. B) Localização da veia jugular. C) Isolamento da veia jugular para realizar o implante do bioeletrodo. D) Inserção da biocélula a combustível na veia jugular do rato. E) BFC implantada. F) Bioeletrodo implantado e conectado ao potenciostato Autolab PGSTAT 12 acoplado a um Módulo de Baixa-Corrente. Procedimento Cirúrgico aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal CEUA/UFABC (Protocolo 001/2010) e realizado pela Prof. Dra. Maria Camila Almeida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudo de redução de oxigênio para os diferentes tipos de eletrodo

Com o intuito de verificar a resposta catalítica mais eficiente para o desenvolvimento da biocélula a combustível implantável, primeiramente observou-se a eficiência do processo de redução de oxigênio em diferentes eletrodos com a presença e a ausência de nanopartículas PAMAM/Pt adsorvidas em sua superfície, uma vez que elas ficam acessíveis à transferência de elétrons^{58, 65, 66}. Essa característica pode ser evidenciada com o aumento da densidade de corrente de redução, para comprovar, realizou-se um estudo comparativo, nas mesmas condições experimentais, usando um micro fio de platina na mesma dimensão da FCF modificada com PAMAM/PtNP. Nos resultados apresentados nas figuras 10a e 10b, observa-se uma alta densidade de corrente de redução no eletrodo de configuração FCF-PAMAM/PtNP quando comparado com o micro fio de platina. A redução do oxigênio no eletrodo de micro fio de platina se iniciou em 0,48V, enquanto que no eletrodo de FCF-PAMAM/PtNP o início da redução foi em 0,64V. A resposta eletroquímica das fibras apresentadas na redução de oxigênio possibilita um aumento na diferença de potencial da cela, o que justifica sua utilização na preparação dos eletrodos para a biocélula a combustível implantável.

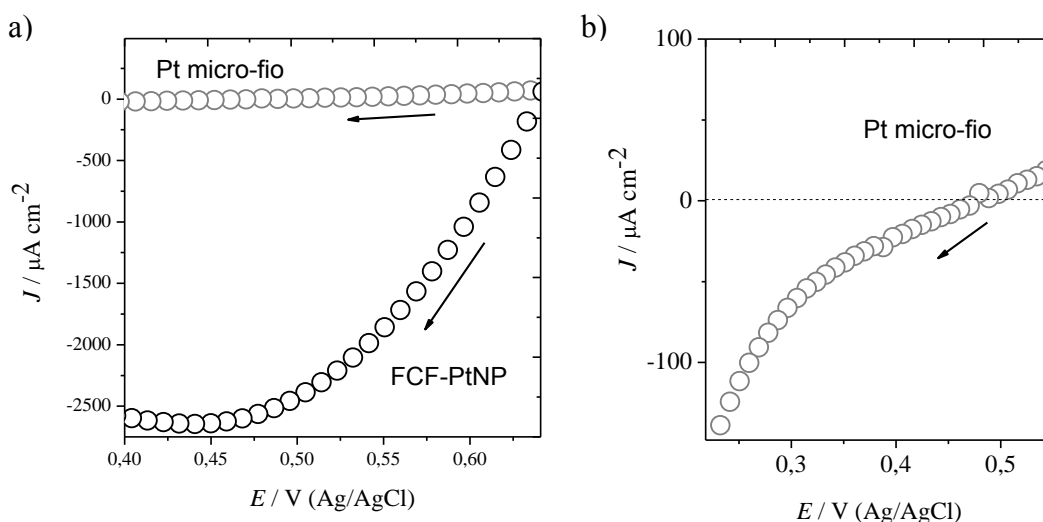


Figura 10 – a) Voltametria linear obtida para o micro fio de platina (cinza) e FCF modificada com PAMAM/PtNP (preta) na presença de O_2 saturado. Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} . Eletrólito: PBS (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$); **b)** ampliação da região para o micro fio de platina.

A figura 11 mostra uma comparação da curva de polarização de dois tipos de eletrodos utilizados para a redução de O_2 catalisada por nanopartículas de platina estabilizada com dendrímero PAMAM, medidos em tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} (pH = 7,2) saturado com O_2 . Esses resultados mostram o potencial da meia-cela no eletrodo de fibras flexíveis de carbono e no eletrodo de carbono vítreo (GC). Observou-se que o potencial de redução se inicia em 0,64 V para o eletrodo FCF-PAMAM/PtNP. Além disso, esse eletrodo apresentou um pico de redução em 0,45 V. Verificou-se que, no eletrodo GC-PAMAM/PtNP o potencial de redução se iniciou em torno de 0,45 V, como mostra em detalhe a figura 12.

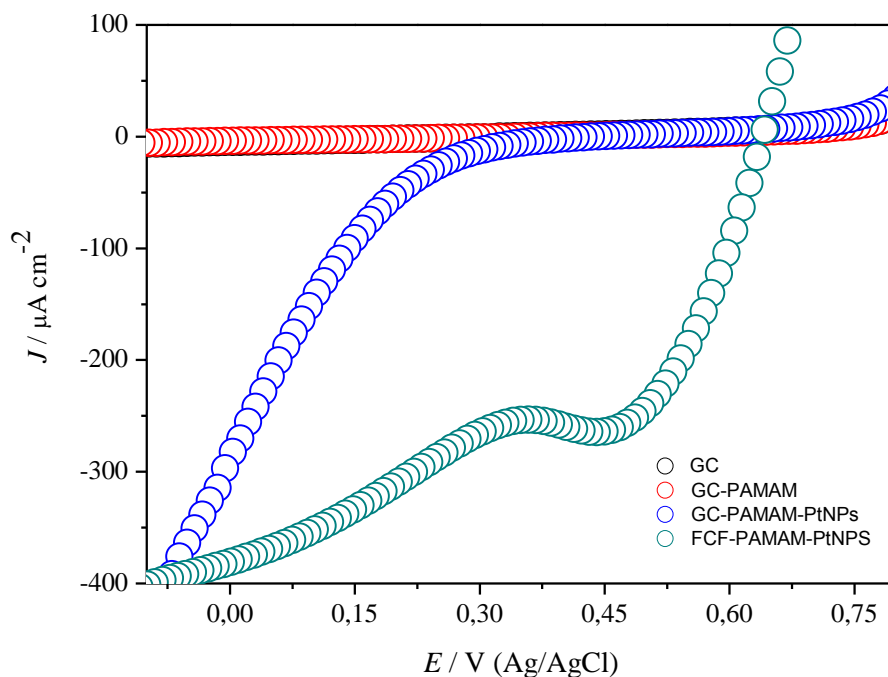


Figura 11 – Voltametria linear obtida para os eletrodo de carbono vítreo (GC) (preto), GC-PAMAM (vermelho), GC-PAMAM/PtNP (azul) e FCF-PAMAM/PtNP (verde) na presença de O_2 saturado. Velocidade de varredura: 10 $mV s^{-1}$. Eletrólito: PBS (50 mmol L^{-1} , pH = 7,2).

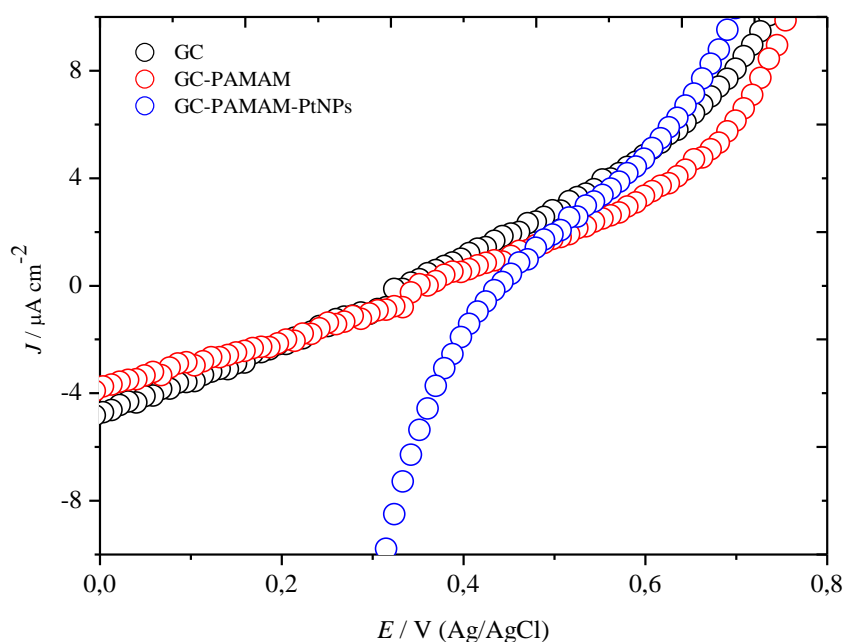


Figura 12 – Ampliação da região da figura 11 para redução de O_2 para o eletrodo de carbono vítreo na presença e ausência de PAMAM e PtNP.

4.2 Estudo de redução de oxigênio no cátodo FCF-PAMAM/PtNP

A razão de modificar a FCF com PAMAM/PtNP para o desenvolvimento do cátodo é porque a fibra apresenta uma característica hidrofóbica, onde o PAMAM aumenta a molhabilidade superficial do eletrodo de FCF, ajudando na penetração efetiva do eletrólito. O PAMAM quando depositado em um substrato sólido forma uma membrana permeável e seletiva⁶³, bloqueando a entrada de alguns componentes do sangue no eletrodo. Além disso, utilizou-se o eletrodo de FCF modificado com PAMAM/PtNP para obter altas densidades de corrente durante a redução de O_2 , pois a platina é um excelente catalisador para redução de oxigênio. A curva de polarização de estado quase estacionário para o cátodo (figura 13) apresenta um início de corrente de redução em 0,64 V e um pico bem definido em 0,45 V, onde a densidade de corrente é - 2600 $\mu A\ cm^{-2}$.

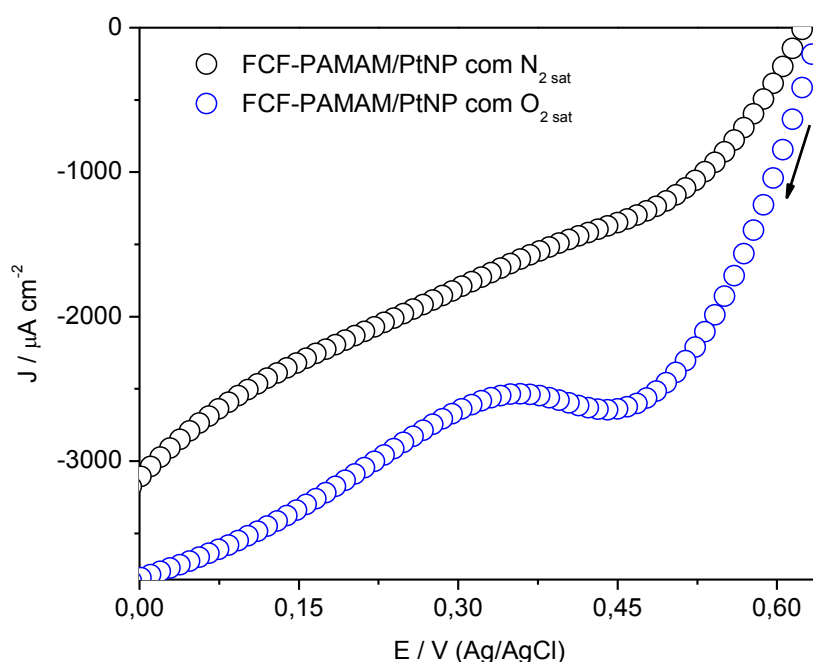


Figura 13 - Curvas de polarização obtidas a 10 mV s^{-1} utilizando o eletrodo de FCF-PAMAM/PtNP na presença (azul) e na ausência (preta) de O_2 . Eletrólito: PBS (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$).

Observa-se uma densidade de corrente de $-2600 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ em $0,45 \text{ V}$ durante a redução de O_2 , indicando uma boa resposta eletrocatalítica, como esperado para catalisadores de Pt. Isto sugere que as PtNPs estão dentro da distância de tunelamento dos elétrons na superfície da FCF e que o O_2 foi capaz de penetrar na cadeia de dendrímeros e interagir com as PtNP encapsuladas⁵⁶. Esta observação está de acordo com o que foi proposto por Ye e Crooks⁶⁷. Os autores mostraram que PtNP preparadas com dendrímeros PAMAM e imobilizadas em eletrodos de carbono são eletrocataliticamente ativas na redução de oxigênio molecular, sendo estáveis em suas propriedades mesmo depois de várias voltametrias cíclicas consecutivas na presença de O_2 .

4.3 Oxidação de glicose utilizando eletrodos de FCF-NR/GOx

4.3.1 Caracterização do bioânodo

Determinou-se a composição da superfície dos eletrodos modificados usando três métodos diferentes: por cronoamperometria, determinou-se a carga do NR, e consequentemente, a quantidade de NR por área do eletrodo. Por espectroscopia de UV-

Vis, quantificaram-se as enzimas imobilizadas. Além disso, por AFM no modo contato, mensurou-se a espessura do biofilme depositado.

4.3.1.1 Mediador vermelho neutro

Por cronoamperometria, aplicou-se 0,4 V para determinar a quantidade de NR. Com o objetivo de verificar a reprodutibilidade dos experimentos, utilizaram-se três eletrodos modificados com NR. A figura 14 mostra os cronoamperogramas obtidos. A reação eletroquímica do mediador redox NR em pH = 7,2 ocorre via dois elétrons, conforme equação 1:

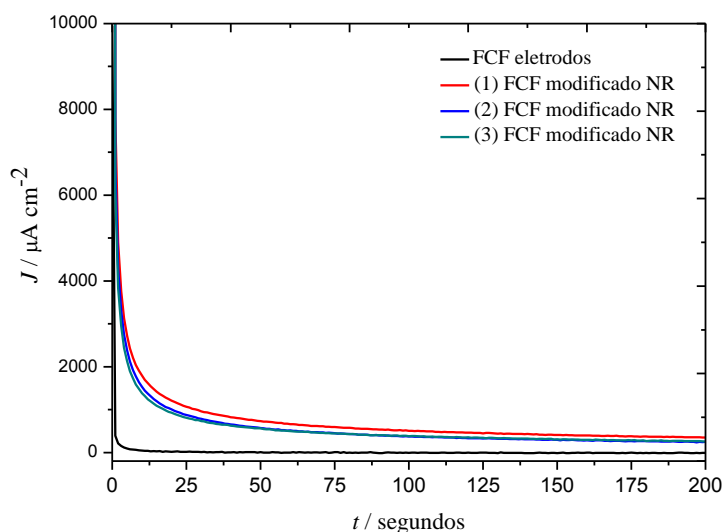
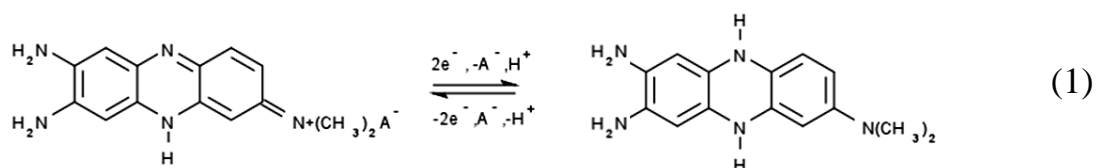


Figura 14 – Cronoamperometria do bioânodo FCF depois da adsorção do NR durante 12 horas. Sobrepotencial aplicado: 0,40 V. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

Determinou-se, por integração dos cronoamperogramas, a quantidade de NR adsorvido nos bioânodos. Assim, tem-se a correlação da dependência da densidade de carga com a raiz quadrada do tempo, de acordo com a equação 2.

$$Q = \int_{t=0}^t J(t) dt = \int_{t=0}^t \frac{nFAC_{NR}D^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} dt = kt^{1/2} \quad (2)$$

Em que, Q é a carga associada com o NR adsorvido no bioânodo, F a constante de Faraday, t o tempo (segundos), n o número de elétrons, C_{NR} a concentração do mediador redox NR, k a constante de transferência eletrônica, A é a área do eletrodo e D a constante de difusão das espécies. A tabela 2 mostra as cargas obtidas para cada bioânodo (triplicata), que corresponde a quantidade em mol de elétrons ($Q = ne$). A partir disso, determinou-se a massa de NR por área do eletrodo (ng cm^{-2}), onde a média dos resultados foi de $13,4 \pm 1,6 \text{ ng cm}^{-2}$.

Tabela 2 – Parâmetros obtidos a partir da integração dos cronoamperogramas

Eletrodos	$Q (\text{C cm}^{-2})$	Elétrons (mol)	Massa de NR _{adsorvido}
1	$2,0854 \times 10^{-5}$	$0,6516 \times 10^{14}$	$15,6 \text{ ng cm}^{-2}$
2	$1,5939 \times 10^{-5}$	$0,4981 \times 10^{14}$	$11,9 \text{ ng cm}^{-2}$
3	$1,6992 \times 10^{-5}$	$0,531 \times 10^{14}$	$12,7 \text{ ng cm}^{-2}$

4.3.1.2 Composição da superfície: Quantificação da enzima GOx

Utilizou-se a espectroscopia na região do UV-Vis para quantificar a massa de enzima na superfície do eletrodo contendo GOx, BSA e GA. A enzima GOx apresenta duas bandas bem definidas na região do visível 378 nm e 420 nm, associadas ao grupo prostético FAD. Utilizou-se a absorção das bandas da GOx, nos comprimentos citados anteriormente, para determinar a massa de GOx adsorvida no bioânodo. Com esse intuito, 70 fibras flexíveis de carbono (comprimento de $1,20 \pm 0,05 \text{ mm}$ para cada FCF) foram imersas em uma mistura de GOx (1 mg mL^{-1}), BSA (1 mg mL^{-1}) e GA (2,5%) na proporção 3:1:1 (v/v) com um volume total da mistura de 2 mL. Obtiveram-se espectros eletrônicos da solução antes e após a imersão das FCF (12 horas de imersão), para determinar a quantidade de enzima adsorvida. A figura 15 mostra os espectros de UV-Vis do GA (0,42%), BSA ($0,17 \text{ mg mL}^{-1}$), GOx ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e da mistura (GA + GOx + BSA). Na mistura (GA + GOx + BSA), as bandas de absorção da GOx ocorrem no mesmo comprimento de onda. As figuras 16 e 17 apresentam o espectro de absorção do UV-Vis da mistura GOx, GA e BSA em diferentes diluições. Baseado nesses resultados, construiu-se a curva de calibração para GOx (variação da absorbância em $\lambda=451 \text{ nm}$ *versus* concentração da enzima GOx) e calculou-se a concentração de enzima GOx adsorvida no bioânodo, segundo figuras 17 e 18.

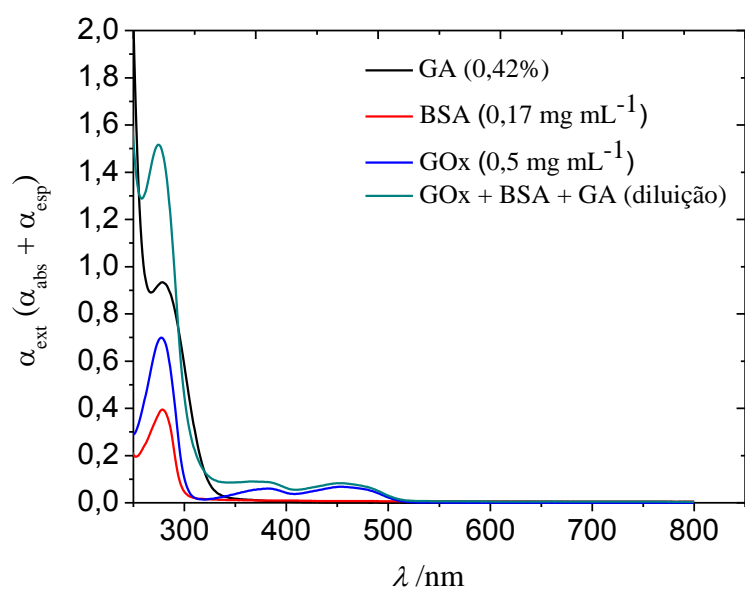


Figura 15 – Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis do GA (0,42%) (curva preta), BSA (0,17 mg mL⁻¹)(curva vermelho), GOx (0,5 mg mL⁻¹)(curva azul) e da mistura das soluções de (GA + GOx + BSA)(curva verde). Todas as soluções foram preparadas em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

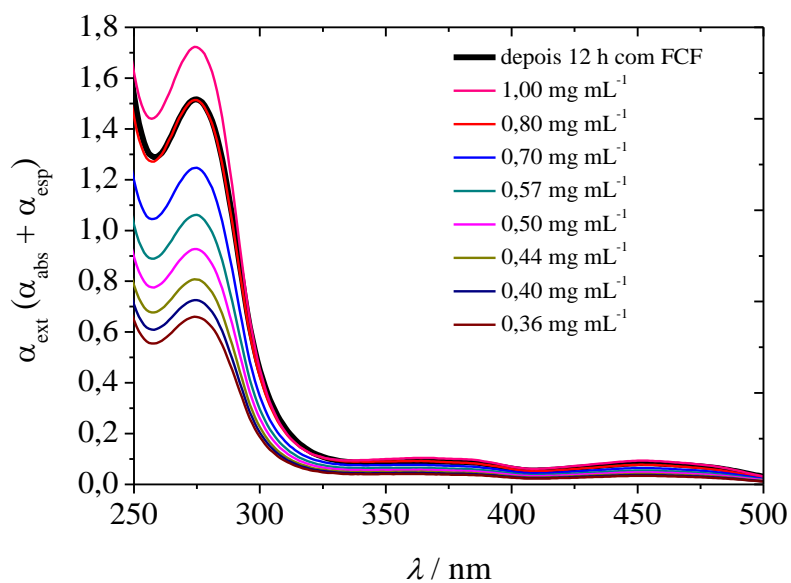


Figura 16 – Espectro de UV-Vis para diluição da solução (GOx + BSA + GA) e o espectro eletrônico da mesma solução depois da imersão dos bioânodos durante 12 horas (curva preta). Todas as soluções foram preparadas em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

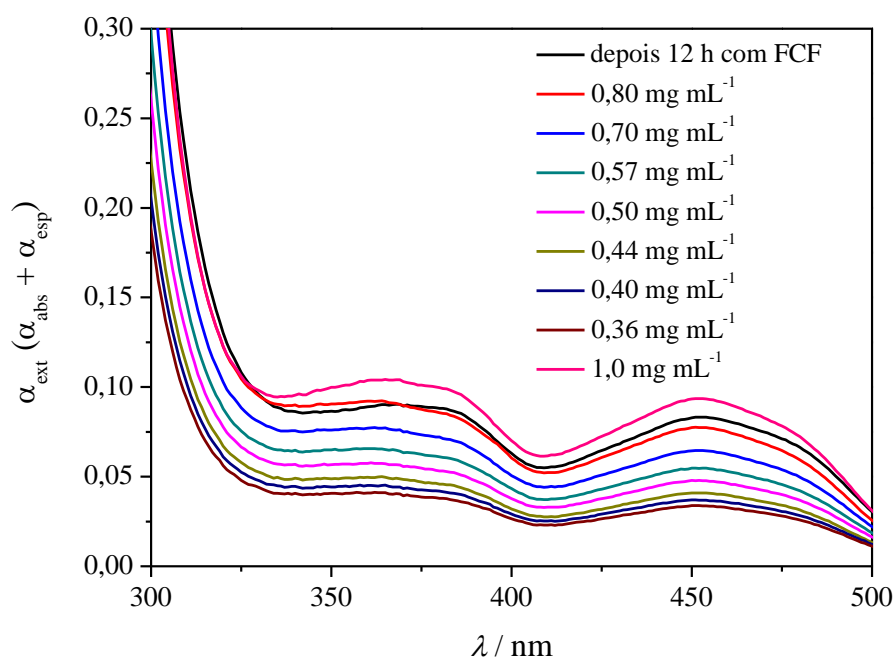


Figura 17 – Ampliação do espectro de UV-Vis da figura 16. Todas as soluções foram preparadas em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

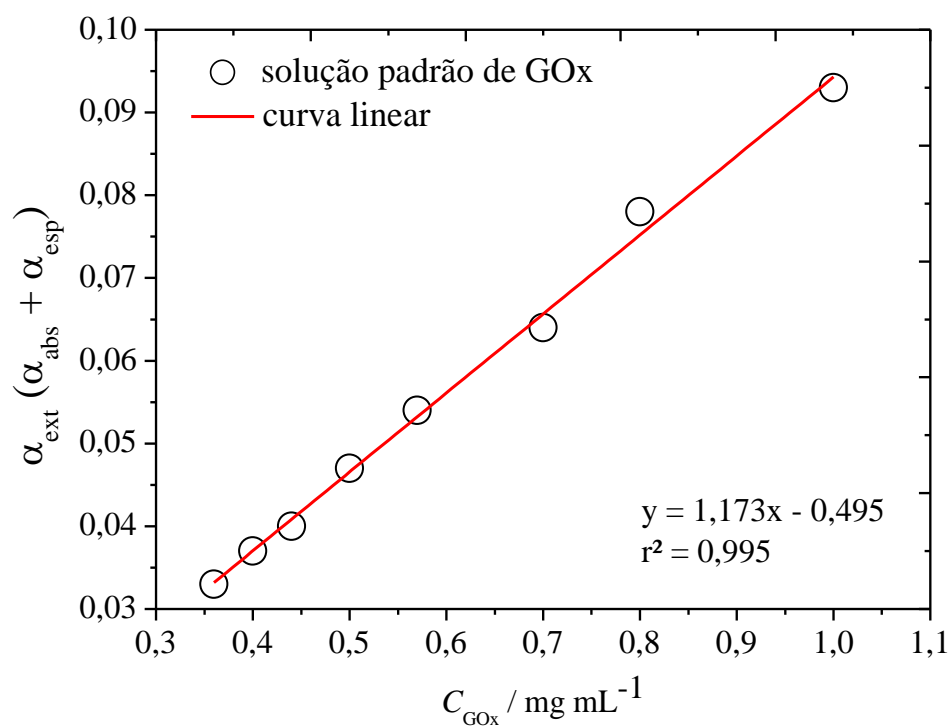


Figura 18 – Absorbância *versus* concentração de GOx em PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2). O valor da absorbância foi obtido em $\lambda = 451$ nm.

Em termos de soluções, o resultado foi $0,884 \text{ mg mL}^{-1}$ de GOx em solução resultante, resultando em $0,116 \text{ mg mL}^{-1}$ para GOx adsorvida na superfície eletródica. A partir desses resultados, quantificou-se a massa de enzima pela massa de eletrodo, obtendo-se 18,8 mg de GOx por grama de FCF. Assim, 18,8 mg de GOx corresponde a $1,1 \times 10^{19}$ Dalton, o que implica em $7,06 \times 10^{13}$ moléculas de GOx. Assim, obteve-se 0,11 nmol de GOx por grama de fibra de carbono, o que resulta em uma composição final de 38,5 fmol de GOx por eletrodo utilizado.

4.3.1.3 Espessura do biofilme no bioânodo

A espessura e morfologia do biofilme de NR/GOx depositado sobre a superfície das FCF foram avaliadas por AFM, de acordo com o procedimento descrito anteriormente na etapa experimental. A figura 19 mostra as imagens obtidas de AFM das FCF na ausência e na presença do biofilme de NR/GOx.

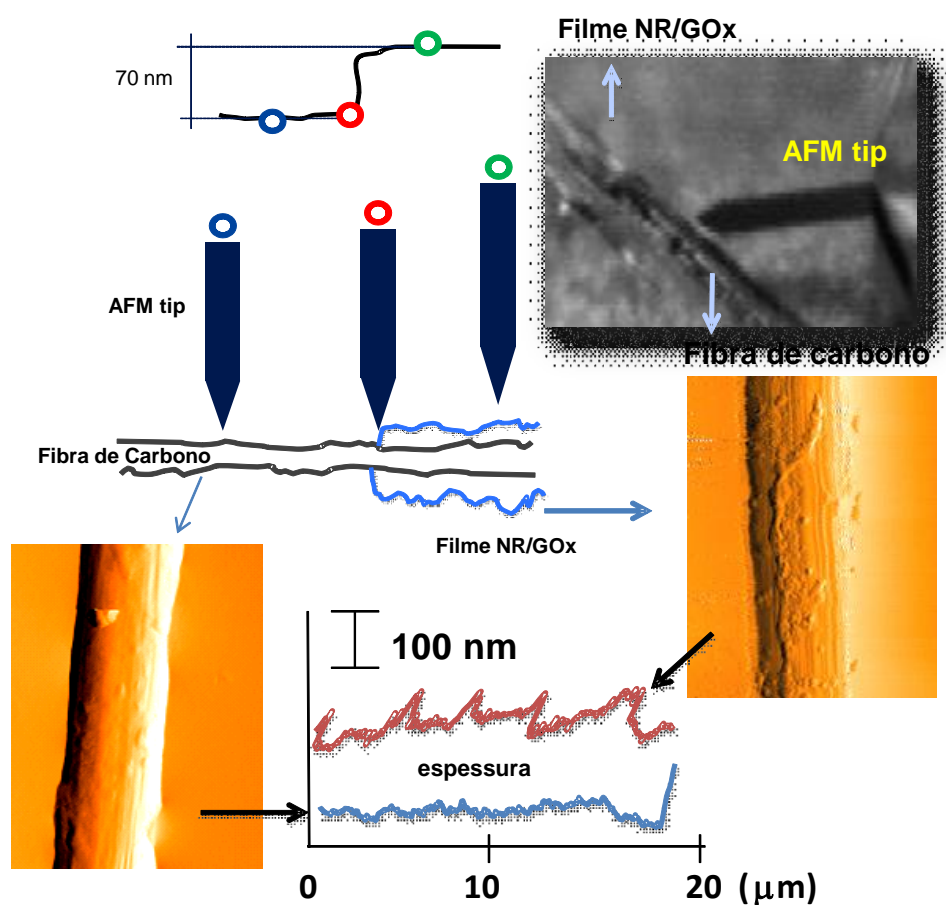


Figura 19 – Imagem de AFM do microeletrodo de FCF antes e depois da modificação com o biofilme de NR/GOx.

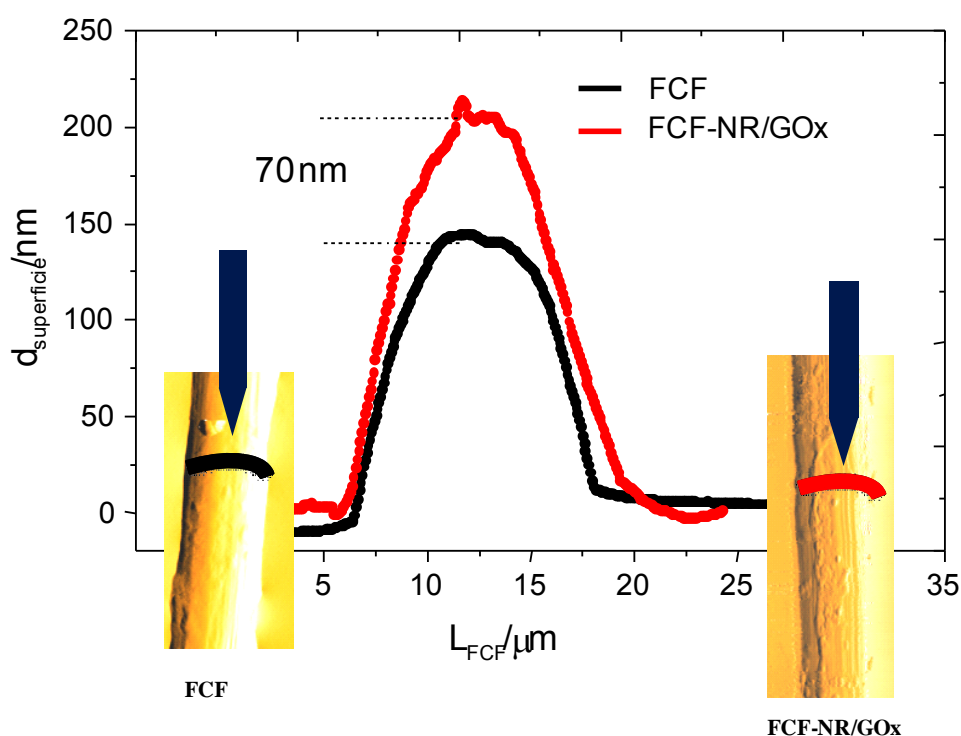


Figura 20 - Gráfico apresenta a distância da ponta de AFM vs. superfície do substrato com um aumento de 70 nm após a deposição do biofilme na superfície da FCF (curva em vermelho) em relação à FCF na ausência do biofilme (curva em preto).

A imagem da figura 20 mostra claramente a mudança de morfologia da FCF na presença do biofilme de NR/GOx (curva vermelha) quando comparado com a FCF na ausência do biofilme (curva preta). Após a modificação das FCF, obteve-se um aumento no valor da rugosidade média da FCF de 11,2 nm para 160,54 nm quando na presença do biofilme de NR/GOx (figura 19). Além disso, a espessura do biofilme adsorvido nas FCF também foi determinada pelo gráfico da distância da ponta de AFM vs. superfície do substrato. Essa determinação foi feita pela diferença de espessura da região transversal do substrato vítreo e as regiões da FCF na ausência e na presença do biofilme de NR/GOx, como mostrado no inserto da figura 20. Para esta metodologia, observou-se um aumento de espessura de aproximadamente 70 nm após a adsorção do biofilme de NR/GOx. Vale ainda ressaltar que essa mesma espessura foi obtida pela diferença de espessura no topo da FCF na ausência e na presença do biofilme.

4.3.2 Oxidação de glicose

A figura 21 mostra a curva de polarização do bioânodo, onde ocorre a resposta catalítica quando adicionado glicose no eletrólito. Observou-se um aumento da densidade de corrente em um sobrepotencial de aproximadamente -0,40 V na presença de 47 mmol L⁻¹ de glicose.

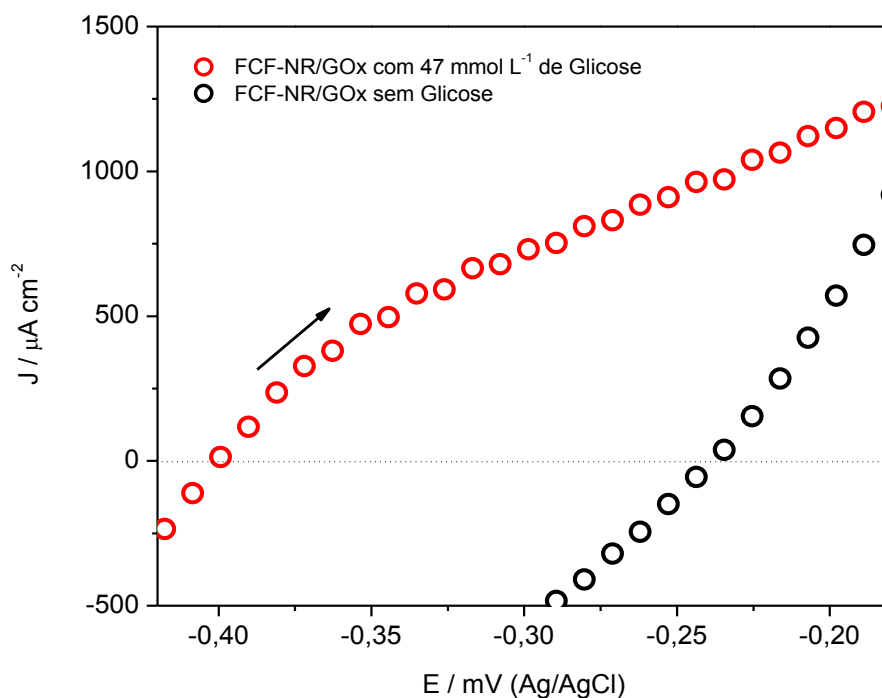


Figura 21 – Curva de Polarização de meia-cela para o bioânodo para oxidação de glicose. A curva preta apresenta a polarização do eletrodo modificado com enzimas GOx sem adição de glicose e a curva vermelha mostra o bioânodo com 47 mmol L⁻¹. Observa-se o processo de oxidação de glicose em -0,40 V. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

A elevada densidade de corrente pode ser atribuída às características intrínsecas da FCF, porque os materiais de carbono porosos ajudam na imobilização das enzimas oxidases permitindo a difusão da glicose e, conseqüentemente, aumentam a intensidade dos sinais eletroquímicos nas reações biocatalíticas⁶⁸. Portanto, o desempenho eletroquímico do ânodo é atribuído à transferência de elétrons da GOx para o NR nos processos redox associados ao grupo prostético FAD/FADH₂ da GOx, de acordo com a reação bioeletroquímica da equação 2 e 3:





Os processos de oxidação da glicose não puderam ser observados quando a enzima estava imobilizada diretamente na superfície do eletrodo sem o mediador redox. Isto indica que o NR promove a interação entre a GOx e FCF. Além disso, a superfície da FCF agiu como um excelente substrato para a imobilização da GOx. Embora o entrecruzamento entre GA, GOx e BSA tenha contribuído para a imobilização enzimática, a presença do mediador NR foi crucial para melhorar a interação entre a enzima e o eletrodo, formando uma rede em torno do eletrodo, devido ao grupamento amina presente no NR, o qual atuou como um mediador de transferência de elétrons para promover a eletro-oxidação do FADH₂ no eletrodo de FCF. Pesquisadores têm apresentado que o mediador de elétrons NR pode interagir com um eletrodo baseado em grafite via adsorção eletrostática, onde ligação π - π aumenta a interação da taxa de transferência de carga⁶⁹.

4.4 Estudo da BFC *in vitro*

No estudo de oxirredução em meia-cela, a oxidação do combustível ocorreu no eletrodo com configuração FCF-NR/GOx e a redução de O₂ ocorreu no eletrodo com a configuração FCF-PAMAM/PtNP. Assim, construiu-se um diagrama a partir de parâmetros eletroquímicos obtidos nas figuras 13 e 21, conforme mostra a figura 22. Determinou-se a diferença entre os potenciais de oxidação (glicose) e redução (O₂). Observa-se nas duas extremidades do diagrama que o fluxo de corrente e a quantidade de trabalho realizado na cela são zero⁷⁰, resultando em um potencial de circuito aberto (OCP) de 1,0 V. Nas reações anódicas e catódicas as densidades de corrente máxima foram 2700 e -3780 $\mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente, em potencial zero. A diferença de potencial para uma densidade de potência máxima foi de 0,65 V (-0,20 V para o eletrodo FCF-NR/GOx e 0,45 V para o eletrodo FCF-PAMAM/PtNP).

Após a eficiência eletrocatalítica dos experimentos em meia-cela, verificou-se o desempenho da BFC sob condições fisiológicas. A figura 23 mostra a curva de densidade de potência na presença de glicose. O OCP em 0,40 V se manteve estável na mesma concentração de glicose e a BFC apresentou uma densidade de potência máxima de 240 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em um sobrepotencial de 0,225 V.

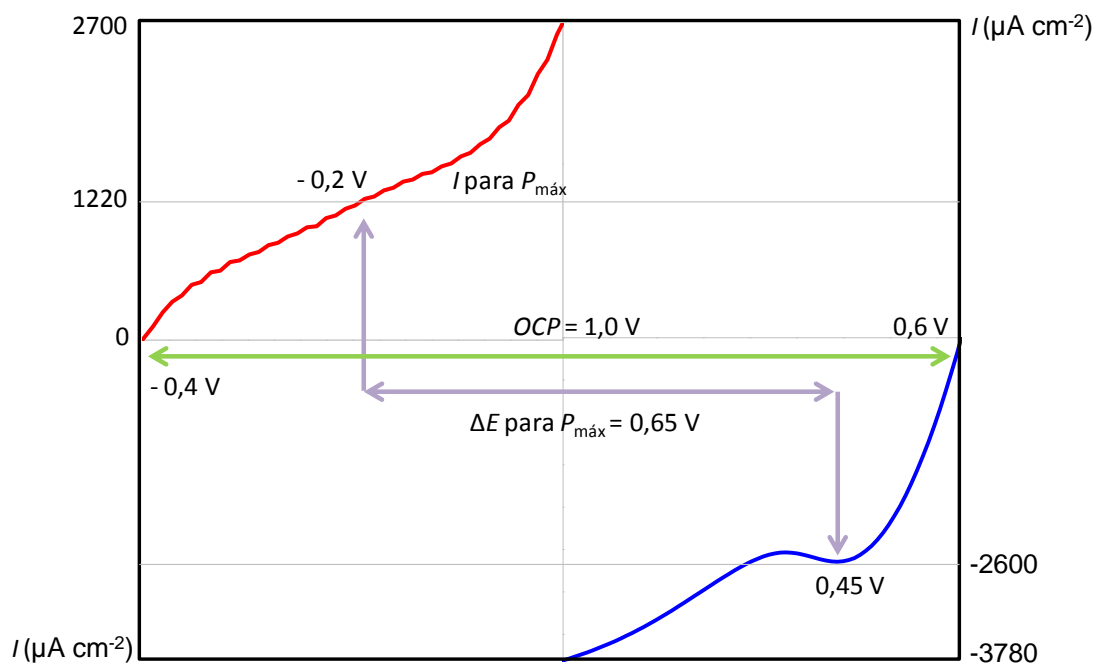


Figura 22 – Diagrama eletroquímico de FCF-NR/GOx||FCF-PAMAM-PtNP para oxidação da glicose e redução O_2 . Os parâmetros eletroquímicos foram obtidos a partir das Figuras 13 e 21.

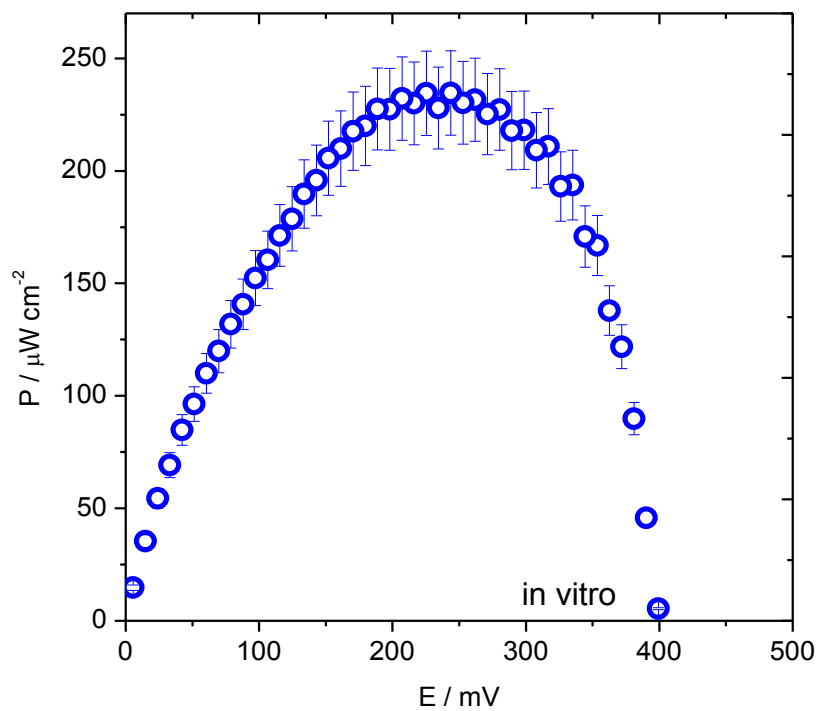


Figura 23 – Curva de Potência de operação da BFC com uma concentração de glicose de 47 mmol L^{-1} . Eletrólito: PBS (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$).

4.5 Estudo da BFC *in vivo*

A mesma BFC utilizada nos experimentos *in vitro* foi implantada em um rato, como descrito na parte experimental. A BFC implantável apresentou uma boa resposta durante os experimentos realizados no sangue do rato. O valor de OCP foi aproximadamente 0,125 V e a BFC intravenosa apresentou uma densidade de potência máxima de $95 \mu\text{W cm}^{-2}$ em um sobrepotencial de 0,08 V (figura 24). Esse valor de densidade de potência máxima é o maior valor relatado na literatura até o momento em BFC implantáveis^{49, 50, 71}.

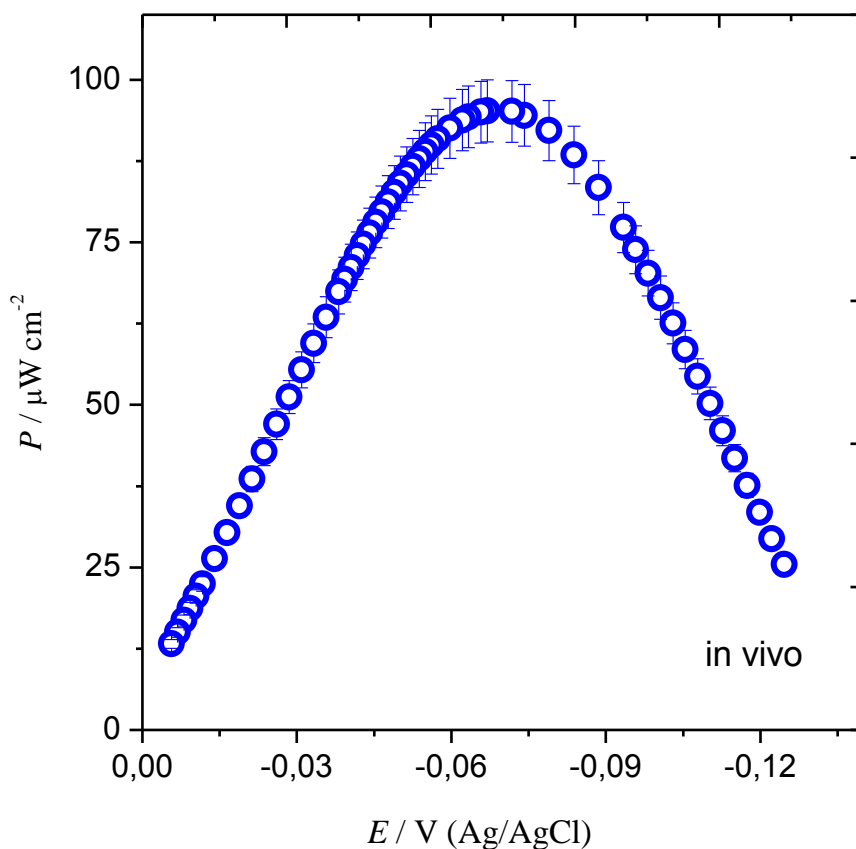


Figura 24 – Curva de Potência de operação para BFC *in vivo*. Experimento realizado dentro da veia jugular do rato vivo da espécie *Rattus novergicus*.

Os parâmetros eletroquímicos obtidos para as reações anódicas e catódicas, assim como àqueles para a BFC FCF-NR/GOx || FCF-PAMAM/PtNP *in vitro* e *in vivo*, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros eletroquímicos de meia-cela e BFC miniaturizada

Parâmetros	E_a	E_c	ΔE_s	ΔE_{OCP}	$I_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$
Meia-Cela*	-0,40	0,60	0,65	1,00	-	-
BFC <i>in vitro</i>	-	-	0,22	0,40	2700	240
BFC <i>in vivo</i>	-	-	0,08	0,13	4800	100

*Parâmetros eletroquímicos da meia-cela obtidos da Figura 21. Outros parâmetros eletroquímicos resultaram-se das Figuras 13, 21, 22, 23, 24. E_a = potencial anódico (V); E_c = potencial catódico (V); ΔE_s = potencial máximo (V); ΔE_{OCP} = potencial de circuito aberto (V); $I_{m\acute{a}x}$ = densidade de corrente máxima a sobrepotencial zero ($\mu A\ cm^{-2}$); $P_{m\acute{a}x}$ = densidade de potência máxima ($\mu W\ cm^{-2}$); eletrodo de referência (meia-cela) = Ag/AgCl.

Os valores de ΔE_s e ΔE_{OCP} podem ser calculados de acordo com a equação 5.

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

Onde E_{cell} , E_c e E_a representam o potencial de uma BFC, potencial cátodo e potencial do ânodo, respectivamente. $\sum IR_e$ é a somatória da perda interna (de origem ôhmica) da cela eletroquímica. A origem do potencial teórico para a BFC será resultado dos potenciais das semi-reações, anódicas e catódicas. Desse modo, determinam-se os parâmetros eletroquímicos das BFC, a partir da oxidação do combustível no ânodo e da redução do oxidante no cátodo. Para isso, desconsideraram-se os possíveis efeitos de queda ôhmica.⁷²

Assim, espera-se que para uma BFC sejam obtidos valores de $\Delta E_s=0,65\ V$ e $\Delta E_{OCP}=1,00\ V$. No entanto, quando se utilizaram os eletrodos na BFC *in vitro*, obtiveram-se valores de $\Delta E_s=0,22\ V$ e $\Delta E_{OCP}=0,40\ V$. Já para a BFC *in vivo*, houve uma queda ainda maior, para $\Delta E_s=0,08\ V$ e $\Delta E_{OCP}=0,13\ V$. Essas quedas nos potenciais podem ser atribuídas a vários fatores, como queda ôhmica por polarização, concentração, resistividade do meio eletrolítico, envenenamento parcial do eletrodo, entre outros. No entanto, especular sobre os motivos deste fato não é o foco desse trabalho, uma vez que estudos complementares ainda se fazem necessários para uma real compreensão.

Um fato muito interessante é que, mesmo com a queda dos potenciais supracitados, o cátodo FCF-PAMAM/PtNP apresentou uma elevada densidade de

corrente, com valor de $-2600 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 0,45V (redução O_2). Isso leva a concluirmos que o PAMAM/PtNP não impediu a difusão do gás oxigênio na superfície do eletrodo⁶³, conforme resultados relatados anteriormente. Com relação ao bioânodo, observou-se também uma alta densidade de corrente, com $1220 \mu\text{A cm}^{-2}$ em -0,20 V. Assim, embora haja uma diminuição de ΔE_s e ΔE_{OCP} , obtiveram-se densidades de correntes elevadas. Isso justifica as curvas de potência das BFC *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados experimentais da BFC *in vitro* indicaram que os eletrodos podem ser usados no desenvolvimento de BFC de glicose/ O_2 , produzindo uma densidade de potência máxima de $240 \mu\text{W cm}^{-2}$ em 0,25 V. Já nos experimentos *in vivo* com a mesma configuração, os eletrodos proporcionaram uma densidade de potência máxima de $100 \mu\text{W cm}^{-2}$ em 0,08 V. Estudos recentes realizados por Cosnier e colaboradores⁴⁹ utilizando uma BFC, produziram uma potência máxima de $2 \mu\text{W}$. Em outro estudo⁵⁰, uma BFC enzimática com um eletrodo anódico trealase/glicose oxidase/trealose e um cátodo bilirrubina oxidase/ O_2 com complexo de osmio, foi implantado no ventre de uma fêmea *Blaberus discoidalis*. A densidade de potência máxima foi de $55 \mu\text{W cm}^{-2}$ em 0,20 V, diminuindo seu rendimento em 5% após duas horas e meia de operação. Mais recentemente, o grupo de Katz⁷³ reportou um implante de BFC operando continuamente em um caracol e produziu uma densidade de potência máxima de $30 \mu\text{W cm}^{-2}$. Assim, os resultados apresentados nesse estudo sugerem que a BFC FCF-NR/GOx || FCF-PAMAM/PtNP é viável e interessante para aplicação em diversas áreas, principalmente em dispositivos implantáveis.

Também, vale a pena ressaltar que a imobilização da GOx (pelo entrecruzamento do GA e os grupos amino do BSA e da enzima) foi realizada com sucesso. Já, a função do NR como mediador, é atribuída ao grupo $\text{C}=\text{N}$ em sua estrutura⁷⁴. Seu potencial de oxidação é muito próximo ao processo redox reversível associado às espécies FAD/FADH_2 na estrutura da GOx e, conseqüentemente, o sobrepotencial de oxidação da glicose no eletrodo de FCF modificado foi de -0,40 V. Destacam-se, também, alguns fatores positivos para o implante intravenoso da BFC, que são flexibilidade mecânica da FCF, assim como suas propriedades condutoras.

4.6 Parâmetros importantes que podem ter influenciado na queda de potência da BFC

Nas curvas de potência apresentadas anteriormente verificou-se uma diminuição

da potência máxima comparado com os resultados apresentados no diagrama eletroquímico, conforme figura 22. Um dos motivos que pode ter influenciado nessa queda foi a oxidação da glicose no cátodo, conforme resultado apresentado na figura 25. A curva preta, observa-se uma diminuição da densidade de corrente de redução de O_2 no eletrodo de FCF-PAMAM/PtNP na presença de glicose no eletrólito, sendo que, em sua ausência a densidade de corrente em torno de $-4000 \mu A cm^{-2}$, enquanto que na presença de glicose a densidade de corrente foi de $-2000 \mu A cm^{-2}$.

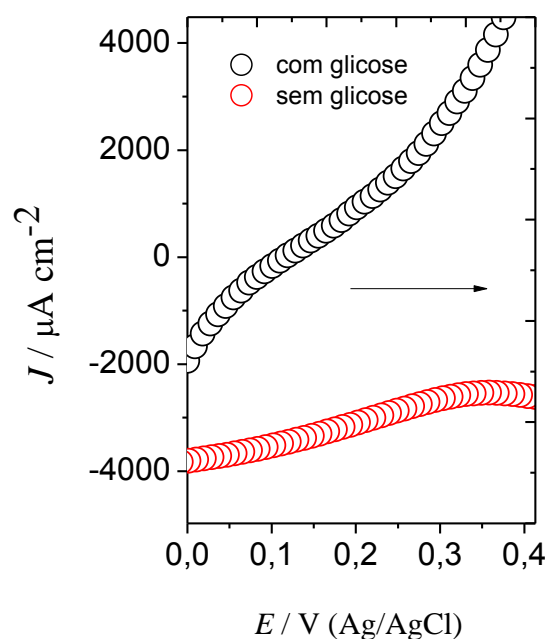


Figura 25 – Voltametria linear para FCF-PAMAM/PtNP na presença e ausência de 47 mmol L^{-1} de glicose. Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} . Eletrólito: PBS (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,2$).

O desempenho da BFC foi influenciado com a presença de O_2 no bioânodo. A figura 26 mostra a curva de oxidação glicose no eletrodo FCF-NR/GOx, observou-se que houve uma diminuição na densidade de corrente na presença de gás oxigênio. A eficiência catalítica no bioânodo com 47 mmol L^{-1} de glicose e sem O_2 no eletrólito apresentou uma densidade de corrente de $2200 \mu A cm^{-2}$, conforme mostra a curva rosa, no entanto, com O_2 saturado a densidade de corrente diminuiu para $1600 \mu A cm^{-2}$, isso resulta numa diminuição de aproximadamente 27%. Da mesma forma, verificou-se a resposta catalítica do bioânodo sem a presença de glicose, constatou-se que com e sem gás oxigênio saturado também houve uma diferença da densidade de corrente de acordo com as curvas vermelha e preta.

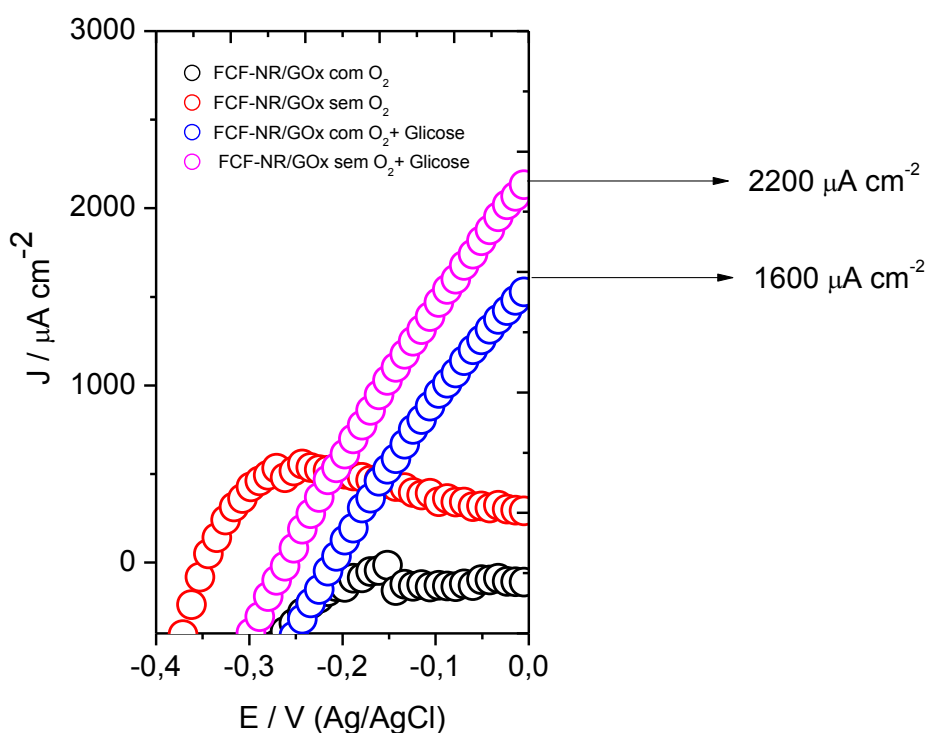


Figura 26 – Voltametria linear para eletrodos de diferentes configurações na presença e ausência de 47 mmol L⁻¹ de glicose e gás oxigênio saturado. Velocidade de varredura: 10 mV s⁻¹. Eletrólito: PBS (50 mmol L⁻¹, pH = 7,2).

4.7 Estabilidade da biocélula a combustível implantada

O maior desafio no desenvolvimento de biocélulas a combustível está relacionado à estabilidade de operação do dispositivo^{43, 75, 76}. Nesse trabalho, realizou-se um estudo de estabilidade da BFC implantada na veia jugular de um rato vivo para verificar o desempenho do dispositivo durante um período de 24 horas (tempo de efeito da anestesia do animal). A densidade de potência inicial foi 180 μW cm⁻², após 5 minutos do experimento, observou-se uma queda até 95 μW cm⁻². Depois, ocorreram algumas flutuações e a densidade de potência foi estabilizada em torno de 95 μW cm⁻² por 24 horas, de acordo com a figura 27.

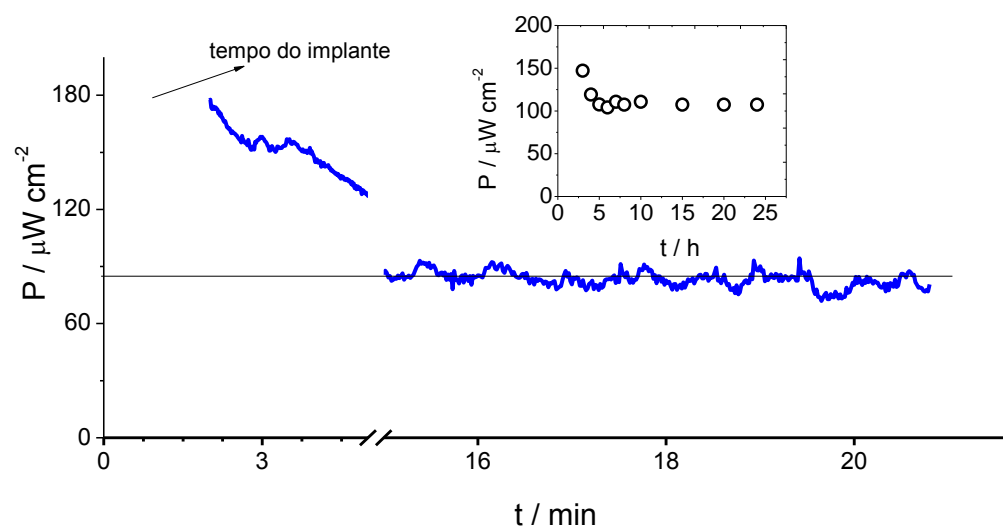


Figura 27 – Estabilidade em longo prazo da densidade de potência do implante intravenoso da BFC durante 24 horas.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentou-se um novo conceito em BFC de glicose/O₂ implantáveis, baseando-se em eletrodos de fibras flexíveis de carbono modificados. Investigou-se o desempenho eletroquímico da BFC *in vitro* e *in vivo*. Verificou-se que a BFC *in vitro* produziu uma densidade de potência máxima de 240 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em 0,225 V, enquanto que *in vivo*, obteve-se uma densidade de potência de 95 $\mu\text{W cm}^{-2}$ em 0,08 V e manteve-se estável durante 24 horas. Para este último, essa é a maior potência relatada na literatura, segundo nosso conhecimento.

As principais características positivas da BFC foram a flexibilidade dos microeletrodos de FCF e a transferência eletrônica mediada pelo NR. Além disso, a utilização do PAMAM para estabilizar as nanopartículas de platina, não impediu a difusão do gás oxigênio na superfície das fibras.

Portanto, a BFC mostrou-se promissora, abrindo novos caminhos para a melhoria de sistemas integrados em eletroquímica e possibilitando explorar novos componentes de eletrodos para maximizar a eficiência dos dispositivos implantáveis.

7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

7.1 Identificar os motivos da diminuição dos potenciais da BFC, como queda ôhmica por polarização, concentração, resistividade do meio eletrolítico, envenenamento parcial dos eletrodo.

7.2 Verificar as reações no organismo com a BFC implantada, como desenvolvimento de anticorpos, obstrução dos vasos sanguíneos e reações imunológicas.

7.3 Explorar novos componentes para maximizar a eficiência dos dispositivos implantáveis e até mesmo comunicar a BFC e o equipamento de medida utilizando-se comunicação wireless.

8 REFERÊNCIAS

1. J. A. Cracknell, K. A. Vincent and F. A. Armstrong, *Chemical Reviews*, 2008, **108**, 2439-2461.
2. B. E. Logan, B. Hamelers, R. A. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete and K. Rabaey, *Environmental Science & Technology*, 2006, **40**, 5181-5192.
3. M. Zhou and J. Wang, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 197-209.
4. F. Tasca, L. Gorton, W. Harreither, D. Haltrich, R. Ludwig and G. Noll, *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, **112**, 9956-9961.
5. F. Tasca, L. Gorton, W. Harreither, D. Haltrich, R. Ludwig and G. Noll, *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, **112**, 13668-13673.
6. T. Kuwahara, K. Oshima, M. Shimomura and S. Miyauchi, *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, **104**, 2947-2953.
7. F. Sato, M. Togo, M. K. Islam, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku, S. Kurosawa and M. Nishizawa, *Electrochemistry Communications*, 2005, **7**, 643-647.
8. L. Amir, T. K. Tam, M. Pita, M. M. Meijler, L. Alfonsa and E. Katz, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 826-832.
9. P. Kavanagh, P. Jenkins and D. Leech, *Electrochemistry Communications*, 2008, **10**, 970-972.
10. J. Gallaway, I. Wheeldon, R. Rincon, P. Atanasov, S. Banta and S. C. Barton, *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, **23**, 1229-1235.
11. W. Nogala, E. Rozniecka, I. Zawisza, J. Rogalski and M. Opallo, *Electrochemistry Communications*, 2006, **8**, 1850-1854.
12. N. Mano, V. Soukharev and A. Heller, *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**, 11180-11187.
13. W. E. Farneth, B. A. Diner, T. D. Gierke and M. B. D'Amore, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005, **581**, 190-196.
14. S. Tsujimura, K. Kano and T. Ikeda, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005, **576**, 113-120.
15. G. T. R. Palmore and H. H. Kim, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1999, **464**, 110-117.
16. I. Willner, G. Arad and E. Katz, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, **44**, 209-214.
17. I. Willner, E. Katz, F. Patolsky and A. F. Buckmann, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1998, 1817-1822.
18. E. Katz, B. Filanovsky and I. Willner, *New Journal of Chemistry*, 1999, **23**, 481-487.
19. E. H. Yu and K. Scott, *Energies*, 2010, **3**, 23-42.
20. A. T. Yahiro, S. M. Lee and D. O. Kimble, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1964, **88**, 375-&.
21. J. F. Rusling and K. Ito, *Analytica Chimica Acta*, 1991, **252**, 23-27.
22. J. W. Gallaway and S. A. C. Barton, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 8527-8536.
23. E. Katz, O. Lioubashevsky and I. Willner, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 15520-15532.
24. K. Ishihara, H. Oshida, Y. Endo, T. Ueda, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1992, **26**, 1543-1552.
25. K. Ishihara, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi, *Materials Science & Engineering*

- C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 1998, **6**, 253-259.
26. T. Konno, J. Watanabe and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 342-347.
27. K. Nishizawa, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 403-407.
28. E. H. Yu and K. Sundmacher, *Process Safety and Environmental Protection*, 2007, **85**, 489-493.
29. I. Willner, R. Blonder, E. Katz, A. Stocker and A. F. Buckmann, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**, 5310-5311.
30. Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld and I. Willner, *Science*, 2003, **299**, 1877-1881.
31. Y. Degani and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society*, 1988, **110**, 2615-2620.
32. Q. Chen, T. deLumleyWoodyear, G. Kenausis, D. Schmidtke and A. Heller, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1997, **213**, 183-ANYL.
33. Z. W. Zhu, C. Momeu, M. Zakhartsev and U. Schwaneberg, *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, **21**, 2046-2051.
34. J. J. Gooding, F. Mearns, W. R. Yang and J. Q. Liu, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 81-96.
35. H. Kudo, T. Yagi, M. X. Chu, H. Saito, N. Morimoto, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi and K. Mitsubayashi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **391**, 1269-1274.
36. O. A. Raitman, E. Katz, A. F. Buckmann and I. Willner, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 6487-6496.
37. S. X. Zhang, W. W. Yang, Y. M. Niu and C. Q. Sun, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **523**, 209-217.
38. J. J. Gooding, P. Erokhin, D. Losic, W. R. Yang, V. Policarpio, J. Q. Liu, F. M. Ho, M. Situmorang, D. B. Hibbert and J. G. Shapter, *Analytical Sciences*, 2001, **17**, 3-9.
39. M. J. Moehlenbrock and S. D. Minter, *Chemical Society Reviews*, 2008, **37**, 1188-1196.
40. M. J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martin and S. D. Minter, *Energy & Environmental Science*, 2008, **1**, 320-337.
41. S. C. Barton, J. Gallaway and P. Atanassov, *Chemical Reviews*, 2004, **104**, 4867-4886.
42. A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin and S. Cosnier, *Nature Communications*, 2011, **2**.
43. S. K. Chaudhuri and D. R. Lovley, *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 1229-1232.
44. G. Wohlfahrt, S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz and H. J. Hecht, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1999, **55**.
45. A. Guiseppi-Elie, C. H. Lei and R. H. Baughman, *Nanotechnology*, 2002, **13**.
46. Y. D. Zhao, W. D. Zhang, H. Chen and Q. M. Luo, *Analytical Sciences*, 2002, **18**.
47. D. Wen, L. Deng, M. Zhou, S. Guo, L. Shang, G. Xu and S. Dong, *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, **25**.
48. A. Heller, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2004, **6**, 209-216.
49. P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathe, P. Porcu and S. Cosnier, *Plos One*, 2010, **5**.
50. M. Rasmussen, R. E. Ritzmann, I. Lee, A. J. Pollack and D. Scherson, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 1458-1460.

51. J. R. Siqueira, Jr., L. H. S. Gasparotto, O. N. Oliveira, Jr. and V. Zucolotto, *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, **112**, 9050-9055.
52. T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Q. Gao, Y. C. Zhang, H. H. Kim and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**, 8630-8631.
53. H. Yu, T. Cao, L. Zhou, E. Gu, D. Yu and D. Jiang, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2006, **119**, 512-515.
54. J. Li, Q. Liu, Y. J. Liu, S. C. Liu and S. Z. Yao, *Analytical Biochemistry*, 2005, **346**, 107-114.
55. J. L. Lutkenhaus and P. T. Hammond, *Soft Matter*, 2007, **3**, 804-816.
56. F. N. Crespilho, F. Huguenin, V. Zucolotto, P. Olivi, F. C. Nart and O. N. Oliveira, *Electrochemistry Communications*, 2006, **8**, 348-352.
57. M. Q. Zhao and R. M. Crooks, *Advanced Materials*, 1999, **11**, 217-220.
59. C. Silva, F. Sousa, G. G. Bitz and A. Cavaco-Paulo, *Food Technology and Biotechnology*, 2004, **42**, 51-56.
60. F. N. Crespilho, in *Departamento de Físico-Química*, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007, p. 110.
61. R. Pauliukaite and C. M. A. Brett, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 1275-1285.
62. W. S. Alencar, F. N. Crespilho, M. V. A. Martins, V. Zucolotto, O. N. Oliveira, Jr. and W. C. Silva, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, **11**, 5086-5091.
63. F. N. Crespilho, M. E. Ghica, M. Florescu, F. C. Nart, O. N. Oliveira, Jr. and C. M. A. Brett, *Electrochemistry Communications*, 2006, **8**, 1665-1670.
64. [http://www2.hu-berlin.de/biologie/zoologie/sammlung/XIII%20Vertebrata/Ma%2001%20Rattus%20norvegicus%20\(Anatomie\).jpg](http://www2.hu-berlin.de/biologie/zoologie/sammlung/XIII%20Vertebrata/Ma%2001%20Rattus%20norvegicus%20(Anatomie).jpg).
65. R. M. Crooks, M. Q. Zhao, L. Sun, V. Chechik and L. K. Yeung, *Accounts of Chemical Research*, 2001, **34**.
66. M. Q. Zhao and R. M. Crooks, *Angewandte Chemie-International Edition*, 1999, **38**.
67. H. C. Ye and R. M. Crooks, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 4930-4934.
68. J. Njagi, M. M. Chernov, J. C. Leiter and S. Andreescu, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 989-996.
69. X. Zhong, J. Chen, B. Liu, Y. Xu and Y. Kuang, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2007, **11**, 463-468.
70. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley, New Jersey, 2000.
71. N. Mano, F. Mao and A. Heller, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 6588-6594.
72. C. M. A. Brett and A. M. O. Brett, *Electrochemistry principles, methods, and applications*, Oxford New York Oxford University Press, New York, 1993.
73. L. Halámková, J. Halánek, V. Bocharova, A. Szczupak and L. a. K. Alfonta, Evgeny, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 5040-5043.
74. G. Inzelt and E. Csahok, *Electroanalysis*, 1999, **11**.
75. S. D. Minter, B. Y. Liaw and M. J. Cooney, *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, **18**, 228-234.
76. D. R. Lovley, *Nature Reviews Microbiology*, 2006, **4**.

9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS – 02/2011 a 01/2013

9.1 Artigo

1. Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Glucose/Dioxygen BioFuel Cell with Modified Flexible Carbon Fiber Electrodes*. Lab on a Chip, 2013, **13**, 468 – 474.

9.2 Prêmios

1. Ferreira, F. C. P.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Biossensor de Glicose e Biocélula a Combustível de Glicose/O₂ Implantáveis* (melhor Pôster apresentado por Fernanda C. P. F. Sales). III Workshop NanoBioMed / I Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste. Luís Correia – PI. 2012.

2. Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Glucose/Dioxygen BioFuel Cell based on Modified Flexible Carbon Fiber Electrodes for Intravenous Implantable* (Prêmio Bernhard Gross de melhor Pôster experimental apresentado por Fernanda C. P. F. Sales no Simpósio M – Recent advances on Nanostructured Materials for alternative energy: Production and storage - II). SBPMat - XI Brazilian MRS Meeting. Florianópolis – SC. 2012.

3. Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Glucose/Dioxygen BioFuel Cell* (Prêmio ACS Presentation Winner por Fernanda C. P. F. Sales). II Conferência USP em Nanotecnologia. Itirapina – SP. 2012.

9.3 Participações em Eventos e Congressos

1. NanoBioMed, participante do programa NANOBIOTEC-Brasil/CAPES - II Workshop da Rede “Avanços, Benefícios e Riscos da Nanobiotecnologia Aplicada à Saúde”. *Eletrodos de Fibras de Tecido Flexível de Carbono (FCF) Modificados com Enzimas Glicose Oxidase: Preparação de Novos Cateteres Implantáveis para Diagnose in vitro e in vivo*. Março, 2011. (Workshop / Águas de São Pedro – SP).

2. SIBEE – XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. *Catéteres Implantáveis contendo Eletrodos de Fibras de Tecido de Carbono para Aplicação em Diagnose in vivo*. setembro, 2011. (Congresso / Bento Gonçalves – RS).
3. Encontro do Projeto Pró – Engenharias: Rumos da Área de Materiais na UFABC. *Glucose/O₂ Biofuel Cell applied in vivo*. Abril, 2012. (Encontro / Nazaré Paulista – SP).
4. NanoBioMed, participante do programa NANOBIOTEC-Brasil/CAPES – III Workshop da Rede “Avanços, Benefícios e Riscos da Nanobiotecnologia Aplicada a Saúde”. *Biossensor de Glicose e Biocélula a Combustível de Glicose/O₂ Implantáveis*. junho, 2012. (Workshop / Parnaíba – PI).
5. Minicurso: *Teoria e Aplicações de Microscopia Fluorescente*. Duração: 4h. III Workshop da Rede NanoBioMed. Junho, 2012. (Simpósio / Luís Correia – PI).
6. I Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste. *Biossensor de Glicose e Biocélula a Combustível de Glicose/O₂ Implantáveis*. Junho, 2012. (Simpósio / Luís Correia – PI).
7. Minicurso: *Simulações Computacionais Utilizando Métodos Quânticos em Sistemas Biológicos*. Duração: 4h. I Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste. Junho, 2012. (Minicurso / Luís Correia – PI).
8. SBPMat – XI Brazilian MRS Meeting. *Glucose/Dioxygen BioFuel Cell based on Modified Flexible Carbon Fiber Electrodes for Intravenous Implantable*. setembro, 2012. (Congresso / Florianópolis – SC).
9. II Conferência USP em Nanotecnologia. *Intravenous Implantable Glucose/Dioxygen BioFuel Cell*. dezembro, 2012. (Conferência / Itirapina – SP).

9.4 Resumos Publicados em Anais de Congresso

1. Ferreira, F. C. P.; Martins, M. V. A.; Iost, R. M.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N.

Cateteres Implantáveis Contendo Eletrodos de Fibras de Tecido de Carbono para Aplicação em Diagnóstico in vivo (Apresentação Oral); XVIII SIBEE; Bento Gonçalves – RS. 2011.

2. Ferreira, F. C. P.; Martins, M. V. A.; Iost, R. M.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Glucose/O₂ Biofuel Cell applied in vivo* (Apresentação Oral); Pró – Engenharia; Nazaré Paulista – SP. 2012.

3. Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Glucose/Dioxygen BioFuel Cell based on Modified Flexible Carbon Fiber Electrodes for Intravenous Implantable* (Apresentação Pôster); SBPMat - XI Brazilian MRS Meeting. Florianópolis – SC. 2012.

4. Sales, F. C. P. F.; Iost, R. M.; Martins, M. V. A.; Almeida, M. C.; Crespilho, F. N. *Intravenous Implantable Glucose/Dioxygen Biofuel Cell* (Apresentação Pôster); II Conferência USP em Nanotecnologia; Itirapina – SP. 2012.

9.5 Disciplinas Cursadas

1. NMA – 101 Ciência dos Materiais
2. NMA – 102 Nanociência e Nanotecnologia
3. NMA – 501 Estágio Docência
4. NMA – 103 Seminários em Nanociências e Materiais Avançados
5. CT – 3010 Eletroquímica e Eletroanalítica
6. BIS – 104 Tópicos Avançados em Bioquímica Metabólica