



Universidade Federal do ABC



Bioânodo Constituído pela Enzima Glicose Oxidase e Óxido de Grafeno

Marccus Victor Almeida Martins

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

Orientador:

Frank Nelson Crespilho

Santo André

2015



Universidade Federal do ABC



Bioânodo Constituído pela Enzima Glicose Oxidase e Óxido de Grafeno

Marccus Victor Almeida Martins

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

Orientador:

Frank Nelson Crespilho

Santo André

2015



Fundação Universidade Federal do ABC
Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados
Rua Abolição, s/nº – Vila São Pedro – Santo André – SP
CEP 09210-180 · Fone: (11) 4996-0017
ppg.nanomat@ufabc.edu.br

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Marccus Victor Almeida Martins, realizada em 3 de março de 2015:

Prof.(a) Dr.(a) **Frank Nelson Crespilho** (USP) – Presidente

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

Prof.(a) Dr.(a) **Hugo Barbosa Suffredini** (UFABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Pedro Henrique Cury Camargo** (USP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Fabio Henrique Barros de Lima** (USP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Iseli Lourenço Nantes** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Alexandre José de Castro Lanfredi** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Susana Ines Cordoba de Torresi** (USP) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Luciano Caseli** (UNIFESP) – Membro Suplente



Universidade Federal do ABC

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, 28 de agosto de 2015.

Assinatura do autor: _____



Assinatura do orientador: _____



Dedicatória

Ao meu pai, Carlos da Paz Martins. (in memoriam)

À minha mãe, Ana Cleide Almeida Martins.

Aos meus irmãos, Flávio Henrique, Iara Fernanda e Leonardo Bruno.

À minha esposa, Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira.

Dedico esta tese de doutorado.

Agradecimentos

“A Deus, ser supremo”.

“À FAPESP, processo nº 2011/1761-0, pela bolsa de doutorado concedida”

“A minha Tia Socorro e minha prima Luana”.

“Ao meu avô Zeca e minha avó Dona Olinda”.

“Ao meu avô Raimundo e à minha avó Ozima”. (in memoriam)

“Aos Tios Robert, Beto, Carlinhos, Júnior, João, Ribamar, Betão, Roberto e Tias, Célia, Sônia, Rosi e Vera”.

“A todos os meus primos, pois são muitos e não caberiam”.

“Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Frank N. Crespilho, pela excelente orientação e pelos aprendizados, os quais levarei comigo”.

“Ao Grupo de Pesquisa: Bioeletroquímica e Interfaces - USP - São Carlos”.

“Ao professor Welter C. da Silva, que como um olheiro me apresentou a pesquisa científica”.

“À UFPI, pela minha formação em química”.

“À UFABC-Santo André-SP e ao Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados pela oportunidade concedida”.

“A todos os professores do departamento de química-UFPI”.

“Aos meus amigos de infância, com quem tanto joguei futebol”.

“Ao Ultra-Man, por ter matado aquele monstro horrível”.

“A todos que participaram de forma direta e indireta para a conquista dessa minha etapa”.

SUMÁRIO

<i>Resumo.....</i>	<i>6</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>7</i>
<i>Lista de Figuras.....</i>	<i>8</i>
<i>Lista de Tabelas.....</i>	<i>11</i>
<i>Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas.....</i>	<i>12</i>
<i>1. Introdução.....</i>	<i>14</i>
<i>1.1 Bioeletroquímica e Biocélulas a Combustível.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2 Glicose Oxidase.....</i>	<i>17</i>
<i>1.3 Imobilização Enzimática.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4 Transferência de Elétrons na Interface Eletrodo/Enzima.....</i>	<i>22</i>
<i>1.5 Grafeno na Interface de Bioeletrodos.....</i>	<i>23</i>
<i>1.6 Eletrodos à base de Fibras de Carbono.....</i>	<i>26</i>
<i>2.0 Objetivos.....</i>	<i>27</i>
<i>3.0 Materiais e Procedimento Experimental.....</i>	<i>28</i>
<i>3.1 Materiais Utilizados.....</i>	<i>28</i>
<i>3.2 Procedimento Experimental.....</i>	<i>29</i>
<i>3.3 Técnicas de Caracterização.....</i>	<i>32</i>
<i>4.0 Resultados e Discussão.....</i>	<i>34</i>
<i>4.1 Esfoliação Química das Fibras Flexíveis de Carbono.....</i>	<i>34</i>
<i>4.2 Formação de Grafeno in situ na Fibra Flexíveis de Carbono.....</i>	<i>38</i>
<i>4.3 Espectroscopia Raman das Fibras Flexíveis de Carbono.....</i>	<i>39</i>
<i>4.4 Voltametria Cíclica dos Bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx.....</i>	<i>45</i>
<i>4.5 Estudo Cinético dos Bioeletrodos.....</i>	<i>50</i>
<i>4.6 Cinética de Transferência de Elétrons.....</i>	<i>51</i>
<i>4.7 Estabilidade do Bioeletrodo FFC-OG-GOx.....</i>	<i>62</i>
<i>4.8 Bioeletrocatalise para Oxidação da Glicose.....</i>	<i>66</i>
<i>5.0 Conclusão.....</i>	<i>71</i>
<i>6.0 Referências.....</i>	<i>72</i>
<i>7.0 Atividades Desenvolvidas no Período.....</i>	<i>81</i>

Resumo

A glicose oxidase (GOx) é a enzima redox mais estudada como biocatalizador anódico em biocélulas a combustível (BCs) de glicose, principalmente pelo alto número de *turnover* para oxidação de glicose. No entanto, seu sítio redox é composto pelo cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que fica localizado no interior da enzima e coberto por uma espessa camada proteica, o que limita a transferência direta de elétrons (TDE). Assim, nesta tese de doutorado propõe-se a utilização de fibras flexíveis de carbono (FFC) esfoliadas e modificadas com GOx para uso em bioânodos. Propõe-se a esfoliação química das FFC como um método para a formação carbono-*edge* e folhas de óxido de grafeno (OG) ancoradas na superfície das fibras (FFC-OG). Por adsorção, a GOx foi imobilizada nos eletrodos de FFC e FFC-OG, onde observou-se a TDE para ambos. No entanto, determinou-se por meio da Teoria de Marcus que a constante heterogênea de transferência de elétrons (k_{TE}) foi duas vezes maior para o bioeletrodo contendo OG, em que a GOx apresentou um valor da energia de reorganização de 0,38 eV. Além disso, o bioeletrodo contendo OG e GOx apresentou uma resposta bioeletrocatalítica para oxidação da glicose em -0,54 V. Esses resultados comprovam que o método de esfoliação química é uma etapa importante para o desenvolvimento de bioeletrodos flexíveis de carbono aplicados em biocélulas a combustível.

Abstract

Glucose oxidase (GOx) is the most studied redox enzyme as anode biocatalyst in glucose biofuel cells (BFCs), mainly by its high turnover number for glucose oxidation. However, GOx redox site consists in the cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD), which it is located deeply buried in the enzyme and covered by a thick protein layer, which limits the direct electron transfer (DET). Thus, in this doctoral thesis we propose the use of flexible carbon fibers (FCF) exfoliated and modified with GOx for application in bioanode in BFCs. FCF chemical exfoliation is proposed as a method for obtain carbon-edge and sheets of graphene oxide (GO) anchored on the surface of the fibers (FCF-GO). By adsorption, GOx was immobilized on FCF electrodes and FCF-GO, where the TDE was observed for both. However, it was determined by Marcus theory that the heterogeneous electron transfer constant (k_{HET}) was two times higher for bioelectrodes containing GO, wherein the GOx had a reorganization energy value of 0.38 eV. In addition, the bioelectrode containing GO and GOx presented a bioelectrocatalytic response for glucose oxidation at -0.54 V. These results show that the chemical exfoliation method play an important role in the development of flexible carbon bioeletrodos applied in biofuel cells.

Lista de Figuras

Figura 1 – Experimentos de Luigi Galvani mostrando a contração muscular da perna de uma rã devido à passagem de corrente elétrica.....	14
Figura 2 – Representação esquemática do princípio de funcionamento de uma BC enzimática com membrana (a) e sem membrana (b).....	15
Figura 3 – Reação de oxidação da β -D-Glicose catalisada pela GOx. Quando o FADH_2 reage com oxigênio ocorre a reoxidação.....	18
Figura 4 – (a) Representação da estrutura dimérica da GOx (RCSB Protein Data Bank, código 1GPE) e (b) reação eletroquímica de redução do FAD a FADH_2 . O grupamento R representa a cadeia lateral.....	19
Figura 5 – Estrutura química do monômero do Náfon.....	20
Figura 6 – Representação esquemática de alguns processos de imobilização enzimática na superfície eletródica. “E” representa a enzima.....	21
Figura 7 – Representação esquemática do processo eletroquímico da (a) TDE entre a enzima e a superfície eletródica, (b) transferência mediada de elétrons e (c) transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo por meio de nanopartículas estabilizadas em polímeros.....	22
Figura 8 – Representação esquemática da estrutura química do carbono grafite (a) e folhas de grafeno isoladas (b e c).....	24
Figura 9 – Comunicação da enzima com um eletrodo de carbono vítreo através de folhas de grafeno.....	26
Figura 10 – Representação esquemática da estrutura química do óxido de grafeno obtido por esfoliação química.....	27
Figura 11 – (a) Fotografia do local do implante no rato, (b) biocélula constituída de eletrodos flexíveis de carbono e (c) biocélula implantada.....	28
Figura 12 – Tecido de carbono utilizado no procedimento de esfoliação química e preparo dos bioeletrodos.....	31
Figura 13 – Representação esquemática do processo de esfoliação química do tecido de carbono utilizando a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$	32
Figura 14 – Representação esquemática do processo de esfoliação química do tecido de carbono utilizando a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$	32
Figura 15 – (a) Fotografia destacando o diâmetro da fibra (0,2 cm) antes do processo de imobilização e (b) representação esquemática para o processo de adsorção física da GOx na superfície da fibra tratada quimicamente resultando no bioeletrodo FFC-OG-GOx.....	33
Figura 16 – Espectroscopia FTIR no modo ATR para a FFC sem tratamento (linha preta), FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (linha vermelha) e FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (linha azul).....	35

Figura 17 – Representação esquemática de funcionalização química das FFC por meio da esfoliação com (a) solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ e (b) solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$	40
Figura 18 – Imagens de MEV-FEG em diferentes magnificações das FFC sem tratamento (a e b) e FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (c e d).....	41
Figura 19 – (a) Fotografia mostrando a focalização do laser em cima da FFC com lente objetiva de 100 vezes de aumento e (b) espectro Raman da FFC (linha vermelha) e da FFC-OG (linha preta). O laser foi alinhado em 532,14 nm utilizado um microespectrômetro.....	43
Figura 20 – Difrátogramas de raios-X para FFC (linha preta) e FFC-OG (linha vermelha). Detalhe mostra o aumento do pico (001) e o deslocamento do pico (002) após a formação do óxido de grafeno na superfície das fibras.....	46
Figura 21 – (a) Espectro de EDX para a FFC-OG e mapeamento químico do carbono (b) e do oxigênio (c).....	47
Figura 22 – Estrutura química proposta do óxido de grafeno esfoliado na superfície da FFC.....	48
Figura 23 – Voltamogramas cíclicos para FFC sem tratamento (linha preta) e FFC-OG (linha verde). Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02. Velocidade de varredura: 30 mV s^{-1}	49
Figura 24 – Voltamogramas cíclicos para os bioeletrodos FFC-GOx (linha vermelha) e FFC-OG-GOx (linha preta). Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02. Velocidade de varredura: 30 mV s^{-1}	50
Figura 25 – Representação das estruturas químicas do FAD e FDH_2 . O grupamento R representa a cadeia lateral.....	51
Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os bioeletrodos (a) FFC-GOx e (b) FFC-OG-GOx em diferentes velocidades de varredura: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02.....	52
Figura 27 – Gráficos mostrando a dependência das densidades máximas de corrente de pico anódico (J_{pa}) e catódico (J_{pc}) em função da velocidade de varredura. (a) FFC-GOx e (b) FFC-OG-GOx. Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02.....	53
Figura 28 – (a) Teste de estabilidade eletroquímica do bioeletrodo FFC-OG-GOx com 20 ciclos registrados a cada 30 minutos. Velocidade de varredura: 50 mVs^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato de sódio pH 7,02. (b) Gráfico mostrando a dependência das densidades de corrente de pico máximo em função do tempo.....	54
Figura 29 – Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 mVs^{-1} para (a) FFC-GOx e FFC-OG-GOx (b). Dependência dos potenciais de pico anódico e catódico em função do log da velocidade de varredura para os bioeletrodos FFC-GOx (c) e FFC-OG-GOx (d).....	55

- Figura 30** – Gráfico de Laviron mostrando a dependência dos potenciais de pico anódico e catódico em função do logaritmo da velocidade de varredura (v) para FFC-GOx (a) e FFC-OG-GOx (b).....57
- Figura 31** – Gráfico da medida do decaimento das constantes em função dos sobrepotenciais ($t = 25^\circ\text{C}$). Curvas foram calculadas segundo a equação 10 com: $\lambda = 0,2$ eV (azul), $\lambda = 0,38$ eV (vermelho) e $\lambda = 0,5$ eV (verde) com $k^0 = 9,08 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,56$ para FFC-GOx (a) e $k^0 = 15,04 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,57$ para FFC-OG-GOx (b).....61
- Figura 32** – Gráficos da constante de velocidade de TE de oxidação (k_{oxi}) em função do sobrepotencial para FFC-GOx ($k^0 = 9,08 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,56$) (linha preta) e FFC-OG-GOx ($k^0 = 15,04 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,57$) segundo a teoria interfacial de Marcus (equação 11 com $\lambda = 0,38$ eV).....63
- Figura 33** – Gráfico dos sobrepotenciais ($E-E^\circ$) em função do logaritmo das constantes de velocidade de transferência de elétrons de redução e oxidação ($k_{\text{red}} + k_{\text{oxi}}$). As curvas pretas calculadas segundo a equação de Marcus com diferentes valores de λ . As linhas retas vermelhas foram calculadas segundo as equações 8 e 9, como previstas pelo comportamento de Butler-Volmer.....64
- Figura 34** – Posição do FAD (bolas coloridas) dentro da enzima GOx. Estrutura e distâncias obtidas por meio de simulação realizada no software Jmol Versão 12.2.15..65
- Figura 35** – Esquema representativo das possíveis orientações de adsorção da enzima (a) na superfície da FFC e (b) FFC-OG. As bolas coloridas representam o FAD. Distâncias calculadas utilizando o software Jmol Versão 12.2.15.....66
- Figura 36** – Curvas de polarização para o bioânodo FFC-OG-GOx na ausência de glicose (■) e na presença de diferentes concentrações de glicose: 1 (●), 2 (▲), 3 (◆), 4 (▼) mmol L⁻¹. Eletrólito: tampão fosfato de sódio pH 7,2. Velocidade de 10 mV s⁻¹...67
- Figura 37** – Resposta cronoamperométrica do bioânodo FFC-OG-GOx na presença de sucessivas adições de 100 µL de glicose a 0,5 mol L⁻¹. Eletrólito: tampão fosfato de sódio pH 7,2, desoxigenado. Potencial aplicado de -0,3 V vs Ag/AgCl_{sat}.....65
- Figura 38** – (a) Gráfico de Michaelis-Menten que correlaciona às densidades de correntes de estado estacionário em função da concentração de glicose e (b) gráfico dos duplos Recíprocos (Lineweaver–Burk).....68

Lista de tabelas

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização enzimática.....	19
Tabela 2 – Materiais e reagentes utilizados.....	30
Tabela 3 – Principais modos vibracionais para as três amostras de fibra de carbono....	39
Tabela 4 – Posições, intensidades e relação dos picos Raman para a FFC e FFC-OG..	45
Tabela 5 – Potenciais E_{pa} , E_{pc} e E^0	50
Tabela 6 – Valores de k e de a para os bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx.....	58
Tabela 7 – Valores reportados de K_M^{app} para diferentes bioeletrodos.....	86

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

A – Área
Å – Ângstron
Ag/AgCl_{Sat} – Prata/ cloreto de prata saturado
BC – Biocélula a Combustível
BCs – Biocélulas a Combustível
BV – Butler-Volmer
Cm – centímetros
CG – Carbono Grafite
NPCdTe – Nanopartícula de Cádmio e Telúrio
DRX – Espectroscopia de Difração de raios-X
e⁻ – elétron
E_a – Potencial anódico
E_c – Potencial catódico
E⁰ – Potencial formal
E^{0'} – Potencial formal teórico
E_{cel} – Potencial total da célula
EDX – Espectroscopia de Dispersiva de raios-X
E_{pa} – Potencial de pico anódico
E_{pc} – Potencial de pico catódico
eV – elétrons-Volts
F – Constante de Faraday
FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo
FADH₂ – Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzida
FC – Fibra de carbono
FFC – Fibra Flexível de Carbono
FFCs – Fibras Flexíveis de Carbono
FFC-GOx – Fibra Flexível de Carbono e Glicose Oxidase
FFC-OG – Fibra Flexível de Carbono e Óxido de Grafeno
FFC-OG-GOx – Fibra Flexível de Carbono e Óxido de Grafeno e Glicose Oxidase
FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho
GOx – Glicose Oxidase
h – Constante de Planck
i – Corrente elétrica
i_{es} – Corrente elétrica em estado quase-estacionário
I_D – Intensidade da banda D
I_G – Intensidade da banda G
J – Densidade de corrente
J_{pa} – Densidade de corrente de pico anódico
J_{pc} – Densidade de corrente de pico catódico
J⁰ – Densidade de corrente zero
KCl – Cloreto de potássio
KeV – Quilo elétrons-Volts
k_{TE} – Constante de Transferência de Elétrons
k_{red} – Constante de redução
k_{oxi} – Constante de oxidação

$K_{\text{red}}^{\text{BV}}$ – Constante de Butler-Volmer de redução
 $K_{\text{oxi}}^{\text{BV}}$ – Constante de Butler-Volmer de oxidação
 $K_{\text{máx}}$ – Constante máxima
 K_{M} – Constante de Michaelis-Menten
 $K_{\text{M}}^{\text{App}}$ – Constante de Michaelis-Menten Aparente
 KMnO_4 – Permanganato de potássio
 Log – Logaritmo
 MR – Mediador Redox
 MEV-FEG – Microscopia Eletrônica de Varredura com Canhão de Feixe
 mV – mili Volts
 mV s^{-1} – mili Volts por segundo
 n – número de elétrons
 NaH_2PO_4 – Monocarbonato de sódio
 Na_2HPO_4 – Bicarbonato de sódio
 nm – nanômetros
 NTC – Nanotubos de Carbono
 OG – Óxido de Grafeno
 P_{cel} – Potência gerada da célula
 pH – potencial Hidrogeniônico
 Q – Quantidade de cargas
 Qui – Quitosana
 R – Constante dos Gases
 R_e – Resistência da célula
 RAMAN – Espectroscopia RAMAN
 $[\text{S}]_0$ – Concentração de substrato inicial
 T – Temperatura
 TDE – Transferência Direta de Elétrons
 TME – Transferência Mediada de Elétrons
 V – Volts
 v – velocidade de varredura
 v_s – estiramento simétrico
 vs – *versus*
 v_{as} – estiramento assimétrico
 V_0 – grau de acoplamento eletrônico
 α – coeficiente de transferência
 β – coeficiente de decaimento
 ΔE_p – separação de pico
 Γ – superfície eletroativa recoberta
 λ – Energia de reorganização
 π – pi
 θ – *Teta*
 A – Amper
 δ – deformação angular

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Bioeletroquímica e Biocélulas a Combustível

A bioeletroquímica é a área da ciência que investiga processos de transferência e transporte de cargas em sistemas biológicos. Estudos realizados, no final do século XVIII, por Galvani [1] já mostravam os princípios da bioeletroquímica antes da eletroquímica propriamente dita. Como exemplo têm-se os experimentos de Galvani, os quais mostram a contração muscular da perna de uma rã em função da passagem de corrente elétrica através de um arco metálico colocado na musculatura da perna da rã, conforme figura 1.

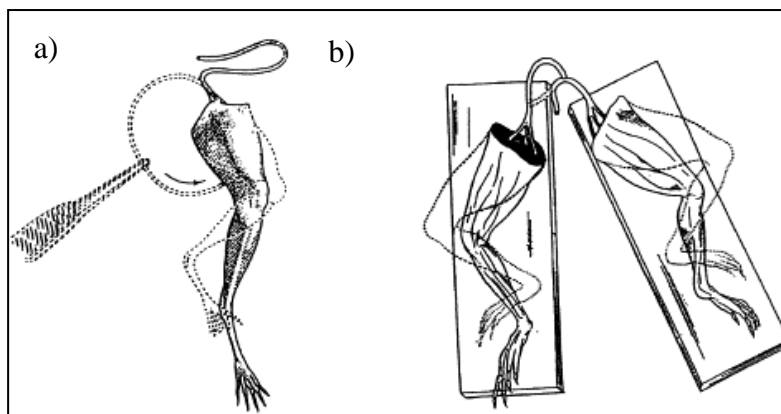


Figura 1– Experimentos de Luigi Galvani mostrando a contração muscular da perna de uma rã em razão da passagem de corrente elétrica. [1]

Atualmente o estudo das biocélulas a combustível (BCs) [2, 3] representa um dos tópicos mais avançados envolvendo a bioeletroquímica. As BCs, também chamadas, por alguns autores, de células a combustível biológicas, são dispositivos eletroquímicos capazes de converter energia química em energia elétrica a partir da decomposição biocatalítica de moléculas orgânicas, como açúcares, álcoois, lipídeos, entre outras. Diferentemente das convencionais células a combustível [4], que utilizam catalisadores inorgânicos, as biocélulas utilizam biomoléculas para fazer a conversão de energia química em energia elétrica. O conceito de biocélulas a combustível é conhecido por quase um século, desde que a primeira célula microbiana foi demonstrada em 1912 por

Potter [5]. Esses biodispositivos classificam-se em microbiológicas e enzimáticas. A biocélula microbiológica se utiliza de microorganismos, tais como bactérias, para oxidar materiais orgânicos. Por outro lado, a biocélula do tipo enzimática utiliza enzimas na superfície anódica e/ou catódica e são elas as responsáveis por acelerar a conversão de combustíveis e agentes oxidantes em produtos. Esses biodispositivos são constituídos por dois eletrodos, um bioânodo e um biocatódico, que podem ser separados por uma membrana trocadora de íons (figura 2a) ou sem membrana (figura 2b).

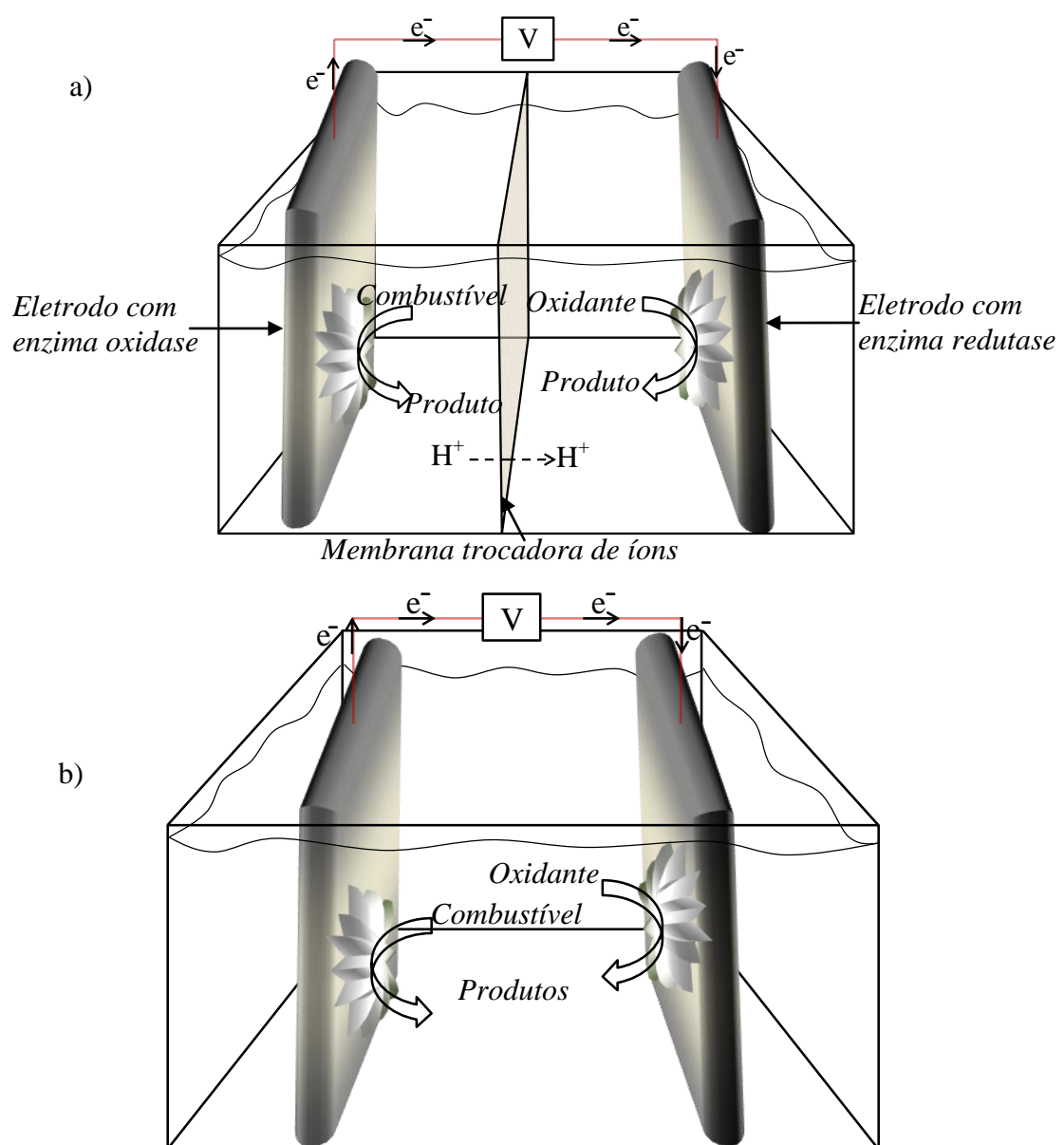


Figura 2 – Representação esquemática do princípio de funcionamento de uma BC enzimática com membrana (a) e sem membrana (b).

A presença da membrana trocadora de íons dá-se em função dos produtos reacionais de um compartimento interferir na reação do outro, o que diminui a atividade catalítica. No compartimento anódico são utilizadas enzimas com a função de promover a oxidação de um determinado combustível. Por outro lado, no compartimento catódico é utilizado uma enzima que apresentem a capacidade de promover a redução de um determinado oxidante. A partir da oxidação e da redução que ocorrem no ânodo e cátodo, respectivamente, há a produção de um fluxo de corrente elétrica do ânodo para o cátodo, conforme ilustrado na figura 2.

Como exemplo de enzimas que são utilizadas em bioeletrodos, tem-se a lacase, citocromo *c* e bilirrubina oxidase como catalisadores das reações catódicas, enquanto que a glicose oxidase, álcool desidrogenase e frutose desidrogenase são utilizadas como catalisadores das reações anódicas. Essas enzimas devem sua atividade catalítica à presença de centros redox, que geralmente estão presente no sítio catalítico da biomolécula. Algumas enzimas possuem metais de transição no centro redox, como é o caso da lacase, citocromo *c* e as peroxidases. Porém, outras enzimas apresentam regiões específicas, nas quais se encontram o sítio catalítico, como é o caso da glicose oxidase (GOx) que contém a Flavina Adenina Dinucleotideo (FAD). O tópico a seguir apresenta detalhadamente o funcionamento da GOx na presença do seu respectivo substrato.

1.2 Glicose Oxidase (GOx)

A enzima glicose oxidase foi descoberta por Muller em 1928 [6]. Durante décadas muitos pesquisadores reportaram o isolamento dessa enzima a partir de vários organismos como algas vermelhas [7], frutas cítricas [8], insetos [9], bactérias [10] e fungos. A GOx obtida de fungos *A. Niger* possui uma elevada estabilidade química em solução e especificidade com a glicose, o que desperta o interesse em pesquisas voltadas

para o desenvolvimento de biodispositivos [11]. No entanto, a atividade catalítica da GOx possui uma elevada dependência do pH do meio em que se encontra [12]. Geralmente, essa classe de biomoléculas precisa estar em meio tamponado (geralmente um tampão fisiológico) para que não haja perda dessa atividade catalítica. Trabalhos reportados na literatura [13,14] mostraram que a atividade catalítica da GOx é rapidamente perdida em soluções com pH abaixo de 2 e acima de 8. Isso ocorre porque o meio ácido ou básico promove a quebra das ligações na estrutura proteica, desestabilizando a enzima. A GOx catalisa a β -D-glicose em glicono- δ -lactona que, posteriormente, sofre hidrólise naturalmente a ácido glicônico. Na presença de oxigênio molecular, a forma reduzida da enzima (FADH_2) sofre re-oxidação, produzindo peróxido de hidrogênio, segundo a equação 1 representada na figura 3. [15]

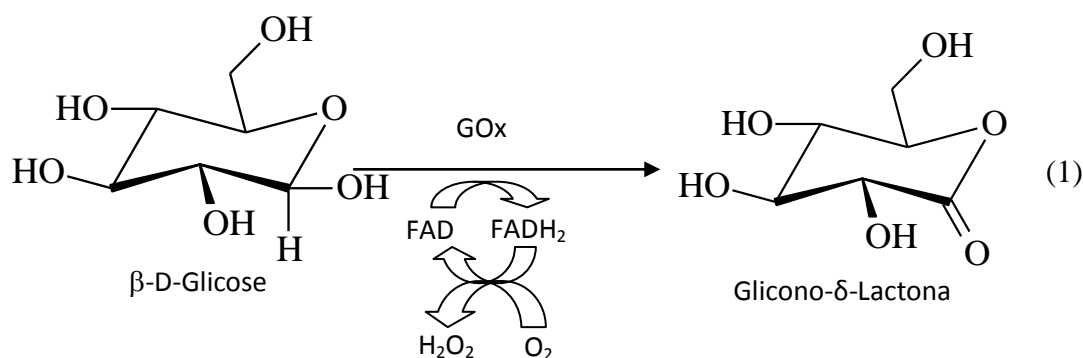


Figura 3 – Reação de oxidação da β -D-Glicose catalisada pela GOx. Quando o FADH_2 reage com oxigênio, ocorre a reoxidação. [16]

A GOx de *A. Niger* é composta de duas subunidades onde cada uma detém um FAD no centro, como representada na figura 4 (a). A natureza da força que mantém o FAD ligado internamente na estrutura proteica da GOx é de caráter eletrostático. Essa região da enzima é a responsável pelo reconhecimento, de forma específica, de moléculas de glicose. Nessa figura, observam-se regiões com cores diferenciadas, as quais simbolizam os aminoácidos ligados uns aos outros através de ligações peptídicas em uma sequência determinada geneticamente. A equação 2 (figura 4 b) mostra a

estrutura química do FAD que está presente na GOx. O FAD é capaz de se reduzir a FADH_2 quando ele recebe dois prótons e dois elétrons, como mostrado na equação 6 da figura 4.

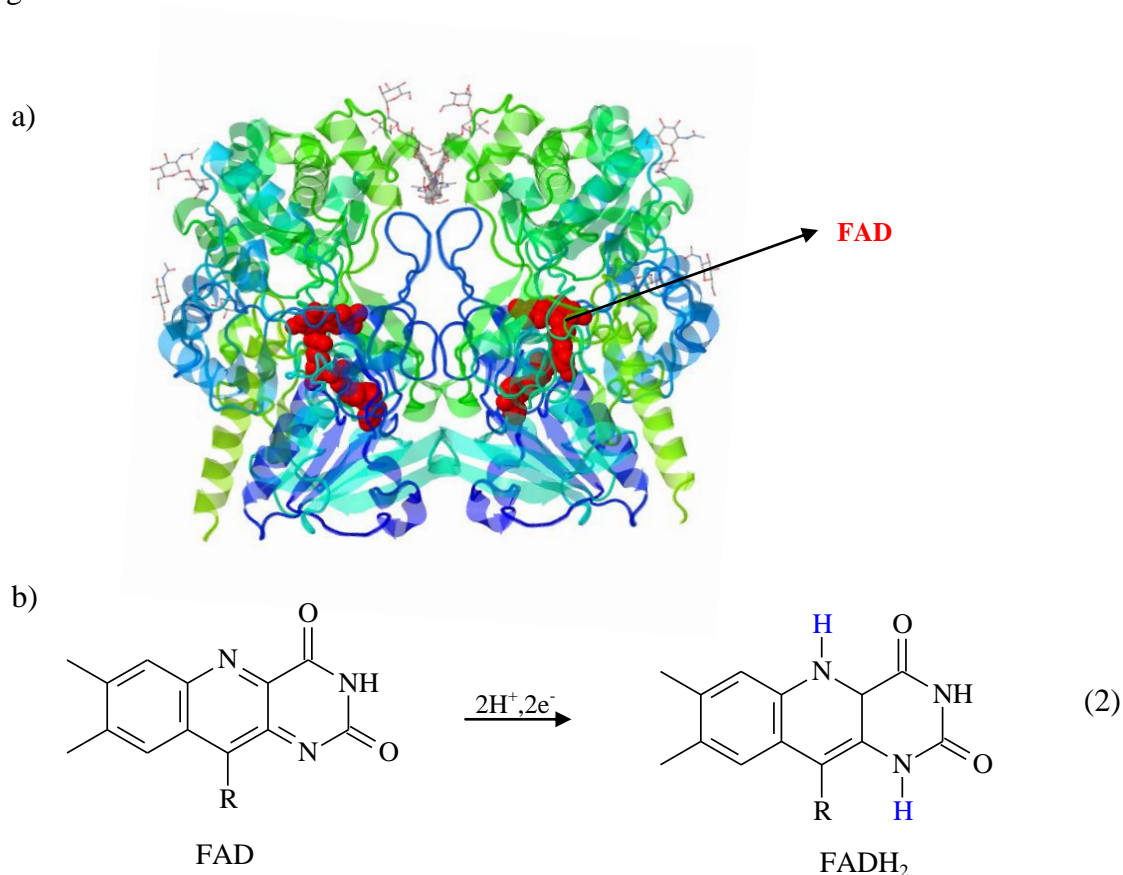


Figura 4 – (a) Representação da estrutura dimérica da GOx (*RCSB Protein Data Bank*, código 1GPE) e (b) reação eletroquímica de redução do FAD a FADH_2 . O grupamento R representa a cadeia lateral.

Um ponto importante a ser levado em consideração da GOx é a escolha do melhor valor de pH. A atividade catalítica da GOx, para acelerar a degradação de glicose, é altamente dependente da faixa de pH dentro do qual ela está inserida. Dependendo da faixa de pH, os aminoácidos que constituem a estrutura química do FAD da GOx podem apresentar-se protonados ou desprotonados. Para a GOx é reportado que a melhor faixa de pH para a sua atividade catalítica é de 5,0 a 7,0. [17,18]. Essa faixa de pH desperta o interesse de muitos pesquisadores para o desenvolvimento de biodispositivos implantáveis, haja vista as condições catalíticas serem próximas às fisiológicas. No

entanto, outro fator extremamente crucial para um bom desempenho das biocélulas é a imobilização dessas biomoléculas em superfícies sólidas, que será abordada a seguir.

1.3 Imobilização Enzimática

Desde a primeira vez que Clark e Lyons [19] demonstraram a possibilidade de uma enzima ser integrada a um eletrodo, o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos tem proporcionado uma grande evolução na confecção de bioeletrodos enzimáticos. Diante disso, a maneira com a qual uma enzima é imobilizada em uma superfície influencia sua interação com o seu respectivo substrato e sua comunicação com a superfície eletródica. A imobilização estável da enzima na superfície eletródica garante um bom funcionamento redox, o que repercute em um rápido mecanismo de trocas de elétrons na interface eletrodo/enzima. Alguns processos de imobilização são reportados na literatura [20], tais como aprisionamento (*entrapment*), ligação covalente, ligações cruzadas (*cross-linking*), bioafinidade, adsorção física entre outros. Cada método de imobilização apresenta suas vantagens e desvantagens, conforme sumarizado na tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização enzimática.

Método	Natureza da ligação	Vantagens	Desvantagens
<i>Entrapment</i>	Incorporação da enzima dentro de um gel ou um polímero.	Sem reação química entre o monômero e a enzima que afetam a atividade.	Barreira de difusão, necessidade de eletropolimerização e perda da enzima.
Ligação covalente	Ligação química entre os grupos funcionais da enzima e o suporte.	Sem barreira de difusão estável, curto tempo de resposta e elevada atividade enzimática.	Matriz não regenerável e ligação com produtos tóxicos.
Ligações cruzadas	Retenção da enzima no eletrodo a partir de ligações cruzadas.	Simples.	Elevada perda da atividade enzimática.
Afinidade	Afinidade das ligações entre um grupo funcional em um suporte e na sequência da proteína.	Imobilização controlada e orientada.	Necessidade de grupos específicos na enzima.
Adsorção	Ligações fracas.	Simples e fácil.	Dessorção da enzima.

Dentre os métodos citados, a adsorção física da enzima é o modo mais simples e rápido de imobilização. Esse método baseia-se em interações físicas entre a enzima e a superfície eletródica. As principais vantagens da adsorção são o baixo custo e a facilidade de imobilização. Devido às forças de ligação envolvidas resultantes da variação de temperatura, pH e força iônica, o baixo controle desses parâmetros é o principal problema, visto que as interações entre enzima/eletrodo podem ser facilmente desfeitas. [21-23] Nesse sentido, uma alternativa muito empregada para inibir a dessorção da enzima é a utilização de filmes finos poliméricos sobre a enzima. Um dos filmes poliméricos mais utilizados é o Náfion[®], produzido exclusivamente pela Dupont. O Náfion consiste de um polímero perfluorado sulfonado, cuja estrutura da unidade monomérica é mostrada na figura 5.

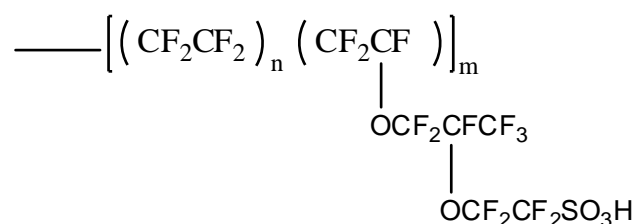


Figura 5 – Estrutura química do monômero do Náfion.

O Náfion apresenta uma elevada condução protônica à temperatura ambiente e excelente estabilidade química, térmica e mecânica. Essa combinação de propriedades do Náfion se deve principalmente à boa separação entre os domínios hidrofílicos (constituído pelos grupos sulfônicos e pelas moléculas de água absorvidas) e hidrofóbicos (constituído pela cadeia principal do polímero) [24].

A escolha do método apropriado depende de diversos fatores, tais como: a carga superficial da enzima, hidrofobicidade dos eletrodos, pH do meio, etc. Um dos maiores problemas geralmente encontrado na imobilização da enzima é a sua desnaturação e

mudanças conformacionais. [25] Esses problemas dificultam ou até inibem o processo redox e acarretam na desestabilização do bioeletrodo e na diminuição da sensibilidade de detecção de um substrato. A figura 6 mostra várias representações esquemáticas de imobilização enzimática na superfície eletródica.

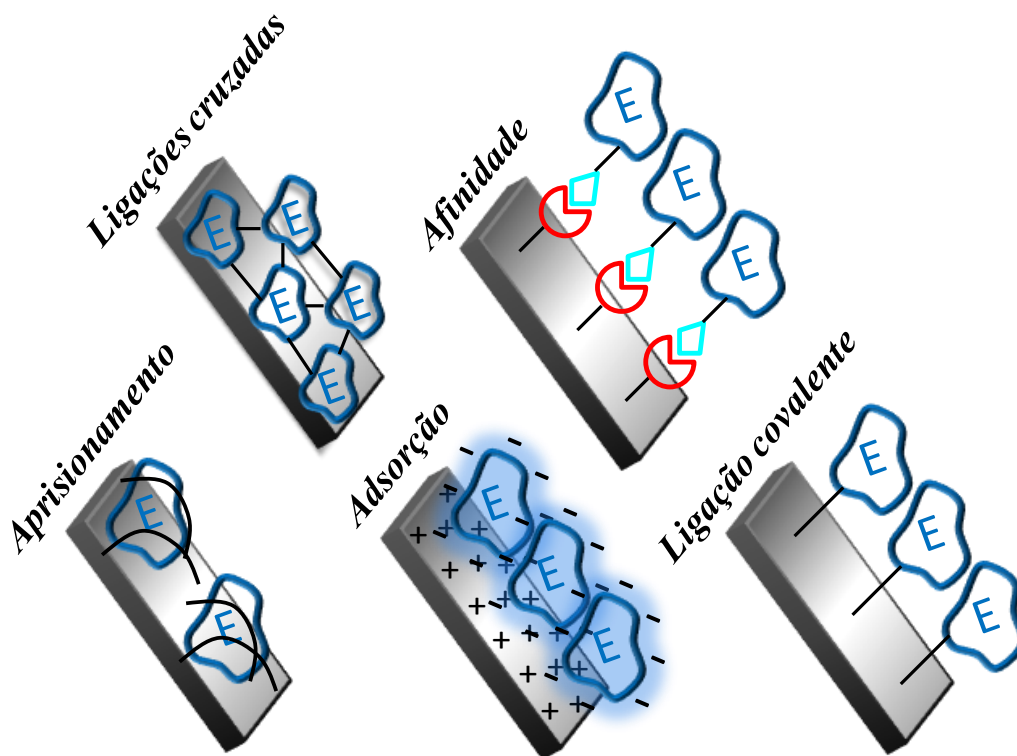


Figura 6 – Representação esquemática de alguns processos de imobilização enzimática na superfície eletródica. “E” representa a enzima.

Como suporte de imobilização enzimática, vários eletrodos são utilizados, por exemplo, ouro [26], vidro recoberto com óxido de estanho e índio (ITO) [27], carbono vítreo [28] e fibras de carbono [29]. Em geral, a maior dificuldade para a transferência de elétrons entre a enzima e a superfície eletródica está voltada para a distância entre o sítio ativo enzimático e a superfície do eletrodo. Para contornar esse problema, vários métodos são reportados na literatura [30] como artifício de melhorar a imobilização de enzimas e consequentemente viabilizar as trocas de cargas. O tópico, a seguir, apresenta mais detalhado como ocorre a transferência de elétrons na interface eletrodo/enzima.

1.4 Transferência de Elétrons na Interface Eletrodo/Enzima

A transferência direta de elétrons (TDE) caracteriza-se como a comunicação elétrica direta entre o sítio catalítico da enzima e a superfície eletródica a partir de reações eletroquímicas (figura 7 a). Para que ocorra a TDE na interface eletrodo/enzima, uma distância mínima deve ser levada em consideração. Estudos reportados na literatura mostraram que, para as enzimas horseradish peroxidase e lacase, os seus sítios ativos devem estar com uma distância da superfície eletródica de aproximadamente 18 a 20Å. [31,32] Em algumas enzimas, a volumosa estrutura terciária ou quaternária distancia o centro redox enzimático da superfície do eletrodo e impossibilita a TDE. Para contornar esse efeito, modificações de natureza química são realizadas na estrutura da enzima. [33-35] Outra estratégia é o emprego de mediadores redox [36,37], os quais promovem uma transferência mediada de elétrons (figura 7 b). Também, a presença de nanoestruturas metálicas [38] tem sido muito utilizada para facilitar a comunicação entre o cofator redox e a superfície do eletrodo como apresentado na figura 7 (c).

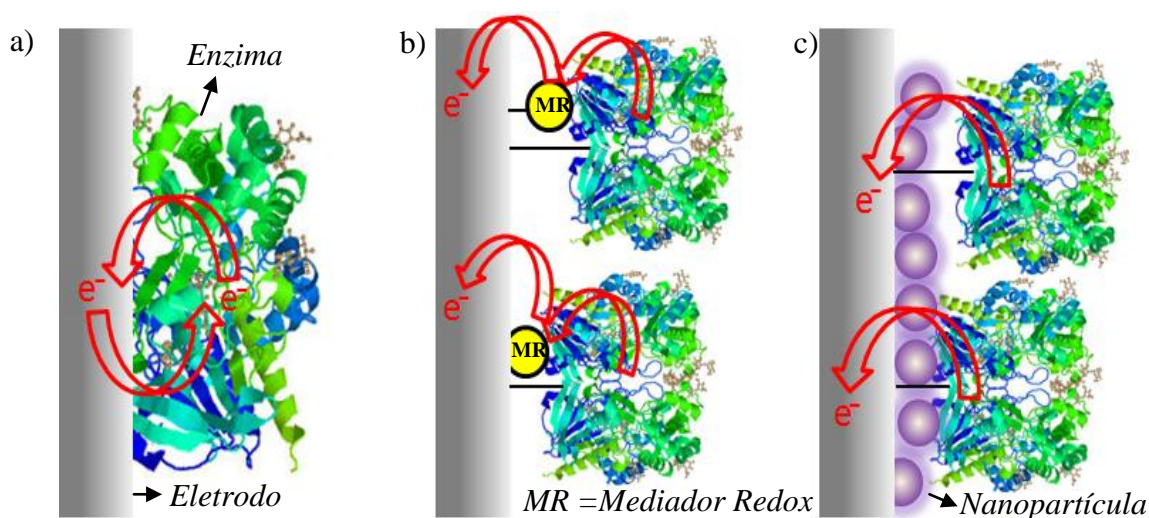


Figura 7 – Representação esquemática do processo eletroquímico da (a) TDE entre a enzima e a superfície eletródica, (b) transferência mediada de elétrons e (c) transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo por meio de nanopartículas estabilizadas em polímeros.

De uma forma mais específica, a reação redox na interface eletrodo/enzima pode ser acompanhada por vários outros processos, tais como transporte de prótons, transições conformacionais e troca de ligante do cofator redox. Assim, quando a TDE é a etapa limitante, as velocidades de oxidação e redução apresentam uma constante de velocidade de transferência de elétrons real (k_{TE}) [39]. Em 1979, baseado na teoria de Butler-Volmer, Laviron publicou um tratamento matemático para determinar as constantes de velocidades de espécies redox adsorvidas em eletrodos sólidos [40]. Este método é o mais amplamente utilizado na determinação do parâmetro k_{TE} , principalmente devido a sua simplicidade, onde os únicos dados experimentais necessários são os sobrepotenciais [41]. Entretanto, estudos recentes [41, 42] têm demonstrado que a teoria de Butler-Volmer possui algumas restrições e condições de contorno que podem comprometer sua aplicação no estudo cinético de proteínas imobilizadas. Neste sentido a teoria de Marcus [41, 43, 44] é mais completa para o estudo de reações de transferência de elétrons. Para a maioria dos casos de proteínas imobilizadas em eletrodos modificados, a distância entre a superfície do eletrodo e o sítio ativo da proteína redox é suficientemente grande, e assim a TE normalmente ocorre em um regime não adiabático. Sob estas condições, a teoria de Marcus [41, 43, 44] prediz que a k_{TE} é controlada pela energia livre de Gibbs (ΔG^0), pela energia de reorganização (λ) e pelo acoplamento eletrônico (H_{DA}) entre o doador (D) e o receptor (A), que, por sua vez, apresenta um decaimento exponencial com a distância [39,45].

Em seu trabalho original, publicado em 1956 [46] para reação de troca $Fe^{2+} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{3+} + Fe^{2+}$ em solução aquosa, Rudolph A. Marcus (Premio Nobel de química de 1992) descreveu as superfícies de reação dos estados do doador (reagente) e receptor (produto) como duas parábolas idênticas, compensadas verticalmente pela diferença de energia livre de transferência de elétrons no equilíbrio, ΔG^0 (figura 8).

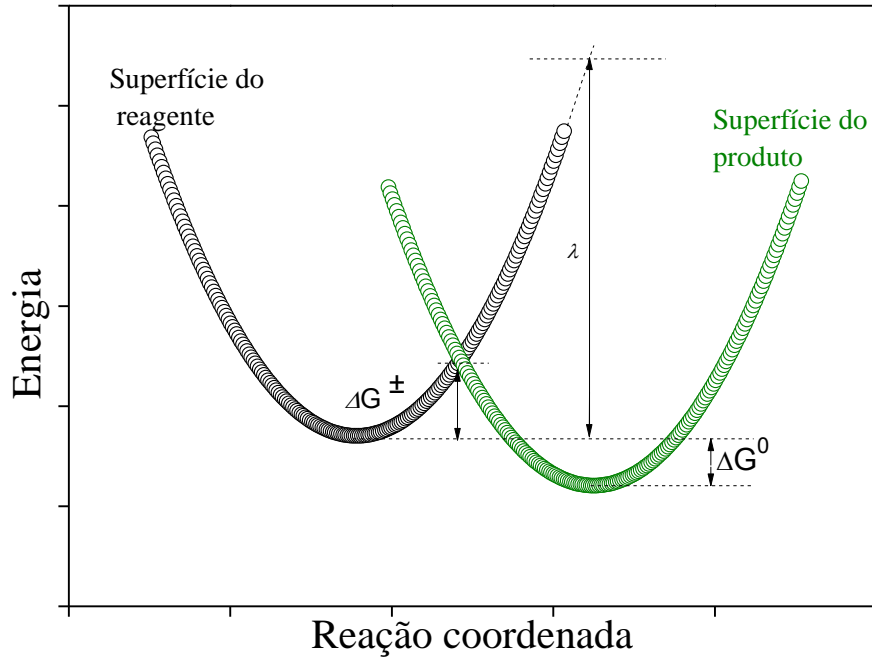


Figura 8 – Diagrama de Marcus para transferência de elétrons.

Quando as curvaturas das energias de superfície são as mesmas (onde as curvas se cruzam), a energia do estado ativado, ΔG^\pm , é dada por:

$$\Delta G^\pm = \frac{\Delta G^0 + \lambda}{4\lambda} \quad (3)$$

A constante de velocidade, k_{TE} , está relacionada à energia de ativação por meio da equação de Eyring [47,48].

$$k_{TE} = v_n \exp - \left(\frac{\Delta G^\pm}{k_B T} \right) \quad (4)$$

Onde v_n é a frequência de reorganização nuclear do complexo precursor e k_B é a constante de Boltzmann. Substituindo a energia de ativação (equação 3) na equação 4, obtém-se então, a equação de Marcus.

$$k_{TE} = C \exp - \frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \quad (5)$$

A expressão do fator pré-exponencial C depende da força do acoplamento eletrônico entre D e A . Se o acoplamento é forte o suficiente (transferência adiabática), C equivale a $k_B T/h$ (h é a constante de Plank), como dado pela teoria clássica do estado de transição. Quando o acoplamento eletrônico é fraco (transferência não adiabática), C é

proporcional ao quadrado de um elemento matriz da interação entre os estados inicial e final, que depende da sobreposição das funções de onda D e A , e, portanto, da natureza dos centros redox, das suas distâncias e da intervenção do meio [49].

O parâmetro λ , dentre as várias definições, expressa a energia necessária para, partindo do estado de equilíbrio dos produtos, trazê-los de volta ao estado de equilíbrio dos reagentes, sendo composta por duas partes: $\lambda = \lambda_i + \lambda_o$. A contribuição interna λ_i , relacionada à energia requerida para se modificar as distâncias de ligações e, em alguns casos, os estados de spin eletrônico, e a contribuição externa λ_o , relativa à energia necessária para se reorganizar o solvente [41, 50].

1.5 Grafeno e Óxido de Grafeno

A estrutura do carbono grafite é formada de planos constituídos de átomos de carbonos sp^2 , conforme mostrado na figura 9 (a). Esses planos interligam-se a partir de interações fracas, como van der Waals, de tal maneira a obter uma estrutura amorfa. Esses materiais à base de carbono têm sido muito utilizados como eletrodos, devido à baixa corrente residual, excelente condutividade elétrica, uma ampla janela de potencial e uma elevada atividade eletrocatalítica para reações redox. [51] No entanto, uma nova forma do carbono, o grafeno, despertou a atenção dos pesquisadores, em virtude das propriedades supracitadas serem mais intensas quando comparadas aos materiais convencionais. O grafeno consiste em uma monocamada de átomos de carbonos sp^2 ligados de tal maneira a formar uma fina grade, conforme apresentado nas figuras 9 (b) e (c). Cada átomo de carbono na monocamada tem um orbital π que contribui para rede delocalizada de elétrons.

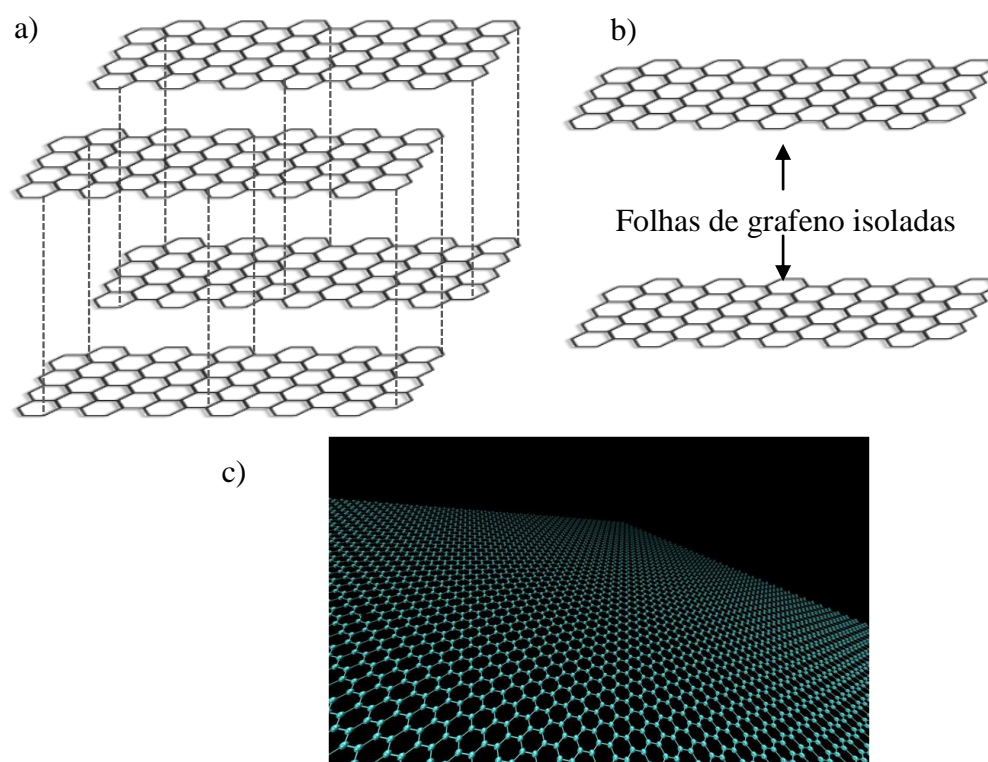


Figura 9 – Representação esquemática da estrutura química do carbono grafite (a) e folhas de grafeno isoladas (b e c).

As propriedades da estrutura química do grafeno permite que ele seja um dos candidatos mais promissores para aplicação em diversos campos, tais como transistores [52], supercapacitores [53] e biodispositivos [54]. No campo da eletroquímica, vários trabalhos [55] têm demonstrado que o grafeno possui excelentes propriedades como a elevada velocidade de transferência de elétrons de sistemas redox e as eletrocatalíticas, quando comparadas ao grafite. Sua elevada área de superfície, baixo *band gap* e excelente condutividade [56], facilitam as trocas de cargas com biomoléculas previamente adsorvidas, como citocromo C, mioglobina, horsheradish peroxidase e glicose oxidase, possibilitando a transferência direta de elétrons. [57-60]

Desde a descoberta do grafeno, em 2004, por Novoselov e co-autores [61], várias rotas de síntese de estruturas de grafeno têm sido estabelecidas na literatura [62-70]. Porém, dentre essas rotas, as por via úmida geralmente produzem folhas de grafeno contendo grupamentos hidrofílicos, por exemplo, grupos carboxílicos, epóxidos,

cetonas e álcoois. [62-70] Nesse sentido, as folhas de grafeno funcionalizadas com esses grupamentos são chamadas de óxidos de grafeno (OG). A presença desses grupos ocorre em função da oxidação das insaturações (duplas ligações) entre átomos de carbono por ação do meio ácido contendo um forte agente oxidante. A figura 10 mostra a estrutura química do óxido de grafeno baseado em modelos propostos na literatura [62-70].

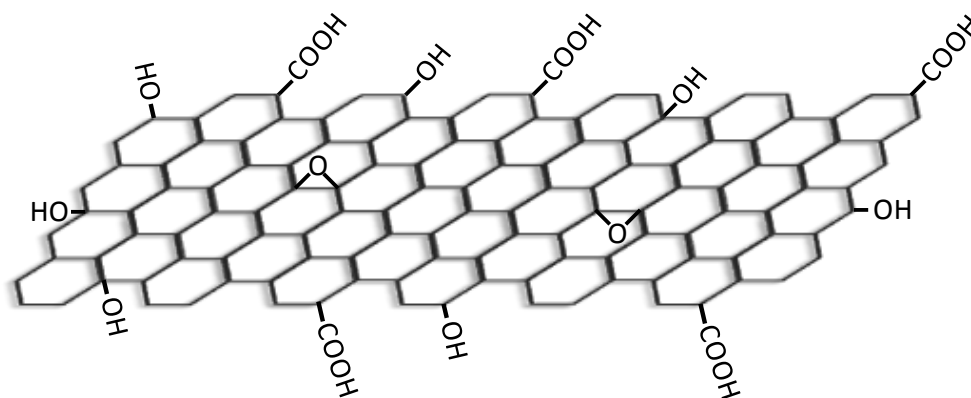


Figura 10 – Representação esquemática da estrutura química do óxido de grafeno obtido por esfoliação química contendo grupamentos oxigenados.

1.6 Eletrodos à Base de Fibra de Carbono

A utilização de eletrodos constituídos à base de carbono grafite (por exemplo, carbono grafite e carbono vítreo) [71-74] sempre despertou muito o interesse dos pesquisadores, desde a aplicação histórica por Sir Humphrey Davy, para produção eletroquímica de metais alcalinos. Diante dos eletrodos convencionais à base de ouro e platina, o interesse na utilização do carbono grafite é atribuído às suas vantagens que incluem baixo custo, ampla janela de potencial, eletroquimicamente inerte e atividade eletrocatalítica para várias reações redox. [75] Estruturalmente, a utilização do carbono como eletrodo, deriva em grande parte do polimorfismo estrutural, da boa estabilidade química, da rica química de superfície e das fortes ligações entre carbono-carbono

presentes na estrutura interna. [75] Todas essas características são estrategicamente atraentes para a utilização de eletrodos aplicáveis em biodispositivos. Aliada a essas características, a utilização de fibras de carbono que apresentam uma certa flexibilidade tem atraído muito o interesse de pesquisa para o implante de biodispositivos *in vivo*. [76]. Por exemplo, Sales e co-autores [77] desenvolveram uma biocélula implantável cujo ânodo era constituído pela enzima GOx e pelas fibras flexíveis de carbono e o mediador vermelho neutro. Nesse trabalho, a flexibilidade da fibra de carbono facilitou a introdução *in vivo* do biodispositivo dentro da veia do rato, conforme mostrado na figura 11.

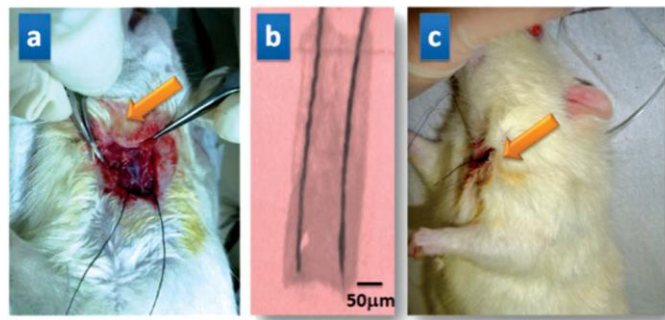


Figura 11 – (a) Fotografia do local do implante no rato, (b) biocélula constituída de eletrodos flexíveis de carbono e (c) biocélula implantada. [77]

Nesse sentido, as fibras flexíveis de carbono contendo óxido de grafeno mostram-se como potentes materiais para serem utilizados na interface de eletrodos aplicáveis em biodispositivos.

2.0 OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- (a) Ativar quimicamente a superfície das FFC, bem como caracterizar a formação de grupamentos hidrofílicos.
- (b) Analisar as propriedades estruturais e morfológicas das FFC tratadas por meio das técnicas de FTIR, MEV-FEG, RAMAN e DRX.
- (c) Imobilizar a enzima GOx na superfície das FFC e FFC-OG.
- (d) Analisar as propriedades eletroquímicas de transferência de elétrons dos bioeletrodos por meio da voltametria cíclica.
- (e) Analisar o comportamento das constantes de transferência de elétrons pelo formalismo de Butler-Volmer e pela teoria de Marcus.
- (f) Estudar o desempenho bieletrocatalítico do bioânodo FFC-OG-GOx na presença de glicose.

3.0 MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais Utilizados

A tabela 2 mostra os materiais e reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Todas as soluções foram preparadas com água destilada, obtida a partir de um sistema de purificação Millipore-Q.

Tabela 2 – Materiais e reagentes utilizados.

Fórmula	Nome	Procedência
NaH_2PO_4	Fosfato de sódio dibásico	Sigma-Aldrich [®]
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio monobásico	Sigma-Aldrich [®]
KCl	Cloreto de Potássio	Sigma-Aldrich [®]
HCl	Ácido Clorídrico	Sigma-Aldrich [®]
KMnO_4	Permanganato de Potássio	Sigma-Aldrich [®]
CCS 200	Tecido de Carbono	Texiglass
GOx	EC 1.1.3.4, de <i>Aspergillus Níger</i> , 200 U/mg,	Sigma-Aldrich [®]

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Formação de Óxido de Grafeno *in-situ* nas FFC

Para os dois métodos de esfoliação química, que serão reportados nos tópicos 3.2.1.1 e 3.2.1.2, utilizou-se o tecido de carbono CCS 200 conforme mostrado na figura 12. O tecido de carbono apresenta, como características de fábrica, as unidades das fibras entrelaçadas.

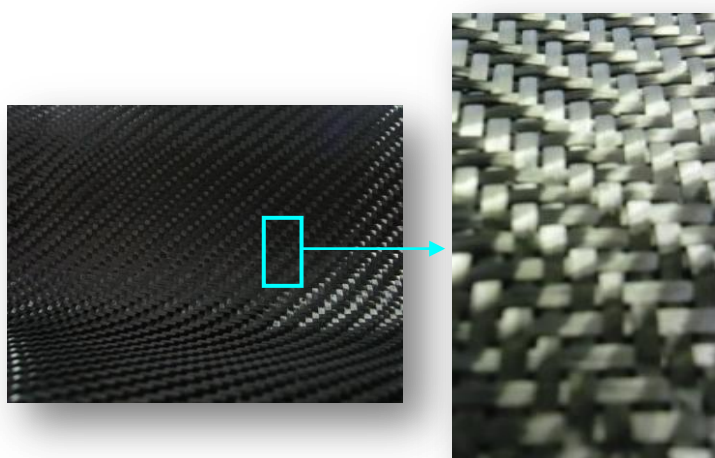


Figura 12 – Tecido de carbono utilizado no procedimento de esfoliação química e preparo dos bioeletrodos.

3.2.1.1 Tratamento com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$

A oxidação química das FFC foi baseada no método desenvolvido por Niyogi e coautores [78]. Nesse tratamento, adicionou-se 0,5 g das FC em 120 mL de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ concentrados na proporção de 3:1. Em seguida, manteve-se o sistema durante 3 horas em banho de ultrassom. Finalmente, lavaram-se as fibras com água destilada até que a água de lavagem apresentasse pH próximo ao da água destilada. A figura 13 mostra um esquema do processo realizado para esfoliação química.

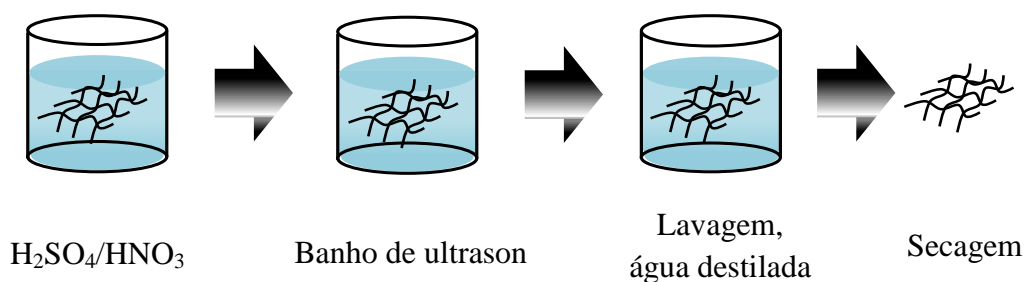


Figura 13 – Representação esquemática do processo de esfoliação química do tecido de carbono utilizando a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$.

3.2.1.2 Tratamento com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$

O tratamento com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ foi baseado no trabalho reportado por Kovtyukhova e coautores [79] com algumas modificações e adaptações. Dissolveram-se 464 mg de KMnO_4 em uma solução de H_2SO_4 na concentração de 1 mol L^{-1} . Em seguida, 0,5 g das FC foram colocadas em 120 mL da solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$. Manteve-se o sistema em banho de ultrason durante 3 horas. Finalmente, lavaram-se as fibras com HCl concentrado para remover o MnO_2 e, em seguida, com água destilada até que o pH da solução final ficasse próximo ao da água destilada. Esse tratamento está representado no esquema da figura 14.

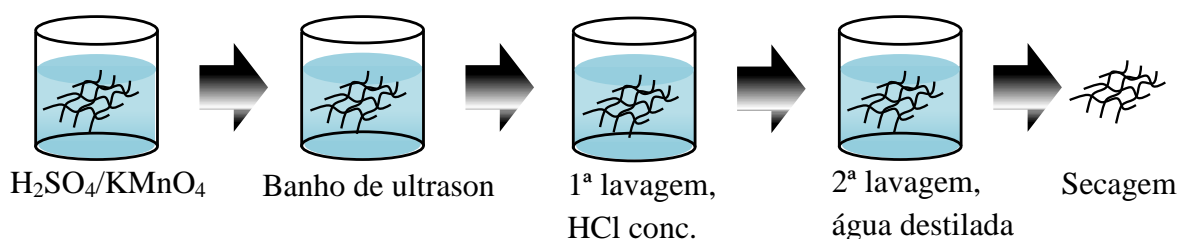


Figura 14 – Representação esquemática do processo de esfoliação química do tecido de carbono utilizando a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$.

3.2.2 Preparo dos Bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx

Os bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx foram preparados pelo método de adsorção física da enzima com a utilização do náfon, o qual forma uma membrana polimérica sob a enzima. [20] Delimitou-se uma área da fibra de $0,2 \text{ cm}^2$ com resina

epóxi. Após a secagem da resina, colocou-se a fibra de carbono dentro da solução de GOx (10 mg em tampão fosfato de sódio pH 7,02) durante 24 hs a 4 °C. O tempo de 24 horas foi empregado para garantir que toda área da fibra de carbono fosse recoberta pela enzima. Em seguida, a fibra foi lavada com solução tampão para remover as enzimas que não adsorveram na fibra e seca a vácuo. Finalmente, gotejou-se 20 µL da solução de náfion (5%) na fibra contendo a GOx adsorvida, construindo, assim, o bioeletrodo FFC-OG-GOx. O mesmo procedimento foi realizado para a fibra sem tratamento, formando o bioeletrodo FFC-GOx. A figura 15 (a) mostra uma fotografia da fibra de carbono antes do tratamento químico. O esquema da figura 15 (b) mostra resumidamente o processo de imobilização enzimática realizado na FFC após o tratamento químico.

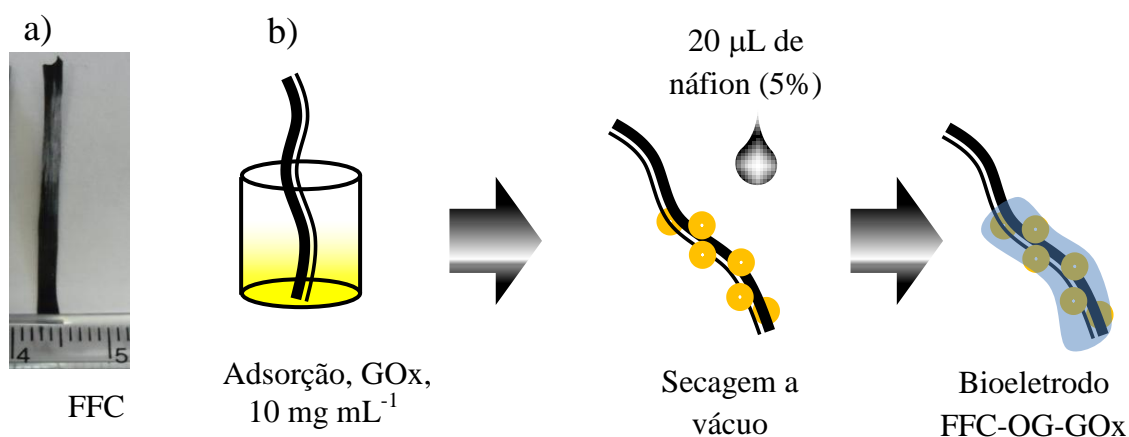


Figura 15 – (a) Fotografia destacando o diâmetro da fibra (0,2 cm) antes do processo de imobilização e (b) representação esquemática para o processo de adsorção física da GOx na superfície da fibra tratada quimicamente resultando no bioeletrodo FFC-OG-GOx.

3.3 Técnicas de Caracterização

3.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

As análises estruturais das fibras de carbono foram realizadas por meio da espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As fibras de carbono foram secas e colocadas diretamente sobre o diamante de selereto de

zinco (ZnSe) para a aquisição dos espectros. O modo utilizado foi o ATR/absorção com aquisição de 60 espectros compreendidos na janela de 450 a 4000 cm^{-1} . Dessa forma, utilizou-se um espectrofotômetro 640-IR FT-IR Varian, pertencente à Central Experimental Multiusuários (CEM) da UFABC.

3.3.2 Espectroscopia Raman

As análises de Raman foram realizadas em um equipamento Jobin Yvon T-64000 pertencente à central multiusuários da UFABC. Para a aquisição dos espectros, utilizou-se um microespectrômetro com região de alinhamento do laser em 532,14 nm. Para a aquisição dos espectros, as fibras de carbono foram colocadas sob um substrato de vidro e fixadas com uma fita dupla face para a focalização do feixe.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

As análises de MEV-FEG foram empregadas para verificar as características morfológicas das fibras durante o processo de esfoliação, bem como o mapeamento químico pela técnica da Energia Dispersiva de raios-X (EDX). O mapeamento químico foi realizado com aceleração de voltagem de 10 kV e 1400 de magnificação. As amostras das fibras foram colocadas sobre uma fita dupla face de carbono e posteriormente colocadas no porta-amostra para a aquisição das imagens e espectros. As imagens de MEV-FEG foram obtidas com o ajuste de diferentes magnificações para aumentar a resolução dos detalhes. Para isso, utilizou-se um equipamento JEOL JSM-6360LV pertencente à central multiusuários-UFABC.

3.3.4 Eletroquímica e Estudo de Meia-Cela

Para investigar o comportamento redox e as propriedades cinéticas dos bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx, empregou-se a voltametria cíclica. Os estudos

de meia-cela foram analisados por meio de medidas de curvas de polarização e de cronoamperometria. Para isso, o sistema empregado foi o convencional de três eletrodos: Ag/AgCl_{sat} como referência, platina como contra-eletródo e os bioeletrodos como eletrodos de trabalho. Todas as análises foram realizadas em um equipamento *μAutolab Type III*, pertencente ao nosso Grupo.

3.3.5 Difração de raios-X

A análise da estrutura cristalográfica das fibras antes e após a esfoliação química foi realizada por meio da técnica de difração de raios-X. As fibras foram colocadas sob o porta-amostra do equipamento com o auxílio de uma resina epóxi. Para isso, empregou-se um Difrátômetro de raios-X Focus, Bruker AXS, pertencente à central multiusuários da UFABC.

3.4 Cinética Não-Catalítica

Para interpretar o comportamento da transferência de elétrons na interface GOx/Fibra de carbono com e sem óxido de grafeno, aplicou-se a teoria de Marcus [80-82]. As constantes de velocidade eletroquímica foram calculadas numericamente em função do sobrepotencial com base na relação de Chidsey [42] (equação 6), obtida a partir da equação padrão de Marcus [82] em combinação com a distribuição de Fermi-Dirac.

$$k_{red/oxi} = \frac{k_{max}}{\sqrt{4\pi\lambda/RT}} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\exp[-[(\lambda \pm F(E-E^0)/RT - x)^2]/4\lambda]}{\exp(x)+1} dx \quad (6)$$

Em simulações voltamétricas, a função integral da equação 6 pode ser numericamente aproximada pelo somatório sobre uma faixa suficientemente ampla de x .

$$\frac{k_{red/oxi}(\Psi, \Lambda)}{k_{max}} \approx \frac{a}{s\sqrt{\pi}} \sum_{i=0}^s \frac{\exp[-(\Lambda + \Psi - x_i)^2]/4\Lambda}{1 + \exp(x_i)} \quad (7)$$

Onde $\Lambda = \lambda F/RT$, $\Psi = (E - E^{0'})F/RT$ e x_i é igual a:

$$x_i = x_p + a \left(\frac{2i}{s} - 1 \right) \sqrt{\Lambda} \quad (8)$$

x_p é dado por:

$$x_p \approx \begin{cases} \Psi + \Lambda & \text{para } \Psi \leq -\Lambda - 5 \\ \Psi - \Lambda & \text{para } \Psi \geq \Lambda + 5 \\ \frac{5\Psi}{\Lambda + 5} & \text{para } -\Lambda - 5 < \Psi < \Lambda + 5 \end{cases} \quad (9)$$

O parâmetro a determina o intervalo, s é o número de passos, e x_p é o “centro de gravidade” da forma dos picos. Com $a = 7$, $s = 100$ e $\Lambda < 100$, são obtidos erros 10^{-7} para todos os valores de Ψ . As constantes de velocidade de redução (k_{red}) e oxidação (k_{oxi}) são obtidas com $\Psi = + (E - E^{0'}) F/RT$ e $\Psi = - (E - E^{0'}) F/RT$, respectivamente [83]. A constante de velocidade calculada a $\Psi = 0$ (constante de velocidade padrão, k^0) é proporcional a k_{max} (a um dado λ), e decresce com o aumento de λ (a um dado k_{max}).

O modelo de Butler-Volmer, que descreve uma dependência exponencial semiempírica das constantes de velocidade com o sobrepotencial ($E - E^{0'}$), de acordo com as equações 10 e 11.

$$k_{red}^{BV} = k^0 \exp(-\alpha F(E - E^0)/RT) \quad (10)$$

$$k_{oxi}^{BV} = k^0 \exp((1 - \alpha)F(E - E^0)/RT) \quad (11)$$

Todas as simulações referentes às curvas de Marcus e ao modelo de Butler-Volmer foram baseadas conforme proposto por Luz [84, 85].

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Esfoliação Química das Fibras Flexíveis de Carbono

As FFC foram tratadas quimicamente com as soluções de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ e $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ para a obtenção de óxidos de grafeno. Assim, empregou-se a espectroscopia na região do infravermelho para analisar as modificações estruturais ocorridas nas FFC após os tratamentos químicos. A figura 16 apresenta os espectros da FFC original sem tratamento (linha preta), FFC tratada com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (linha vermelha) e FFC tratada com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (linha azul). No espectro da FFC original, observam-se duas pequenas bandas em 2849 e 2919 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, aos modos de vibração de estiramento simétrico das ligações C-H e C-C [79, 86]. Ainda nesse espectro, observam-se várias pequenas bandas compreendidas entre 1700 e 1500 cm^{-1} , que podem ser atribuídas aos modos de deformação angular dos grupamentos CH_3 , CH_2 . [86] No entanto, diferenças significativas no espectro podem ser visualizadas quando a FFC é tratada pelos dois métodos supramencionados. O espectro da FFC tratada com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (linha vermelha) apresenta uma banda em 3479 cm^{-1} , atribuída ao modo de vibração de estiramento da ligação O-H de ácido carboxílico [86]. As bandas em 2849 e 2919 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos modos de vibração de estiramento simétrico das ligações C-H e C-C. As bandas em 1723 , 1386 e 1025 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, ao estiramento da ligação C=O, deformação O-H e estiramento da ligação C-O, respectivamente.

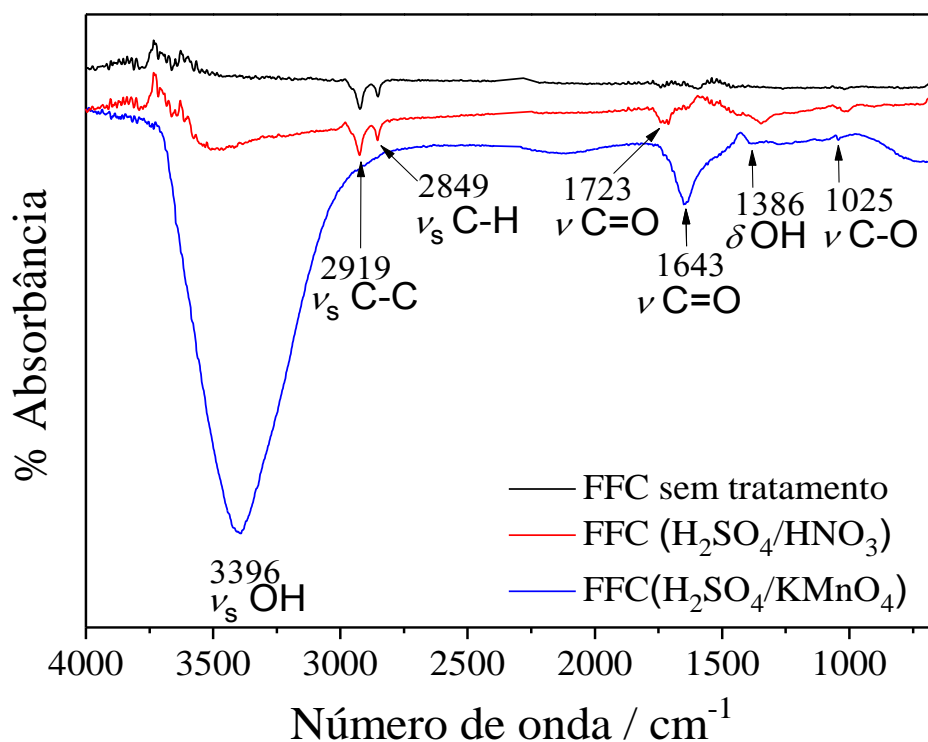


Figura 16 – Espectroscopia FTIR no modo ATR para a FFC sem tratamento (linha preta), FFC tratada com H₂SO₄/HNO₃ (linha vermelha) e FFC tratada com H₂SO₄/KMnO₄ (linha azul).

Segundo a literatura [87, 88], o tratamento de superfícies de carbono em soluções extremamente ácidas pode levar à formação de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. No entanto, a formação de carbonilas de ácidos carboxílicos pode ser confirmada devido ao aparecimento dos estiramentos C-O e da deformação angular da ligação O-H. Por meio desses dois modos vibracionais é possível, portanto, atribuir que as bandas de estiramento C=O e O-H (em 1723 e 3479 cm⁻¹, respectivamente) são oriundas de ácido carboxílico. Comparado ao método de ativação com a solução H₂SO₄/HNO₃, o espectro da FFC tratada com a solução de H₂SO₄/KMnO₄ apresenta algumas diferenças. Observa-se uma intensa banda de estiramento da ligação O-H na região em 3396 cm⁻¹. As bandas de C-C e C-H desaparecem, provavelmente, devido à sobreposição da banda de estiramento da ligação O-H. Por outro lado, a banda de estiramento C=O aparece

mais intensa e deslocada em 1643 cm^{-1} . As bandas de deformação O-H e estiramento C-O não sofrem deslocamentos comparadas com as regiões dos mesmos grupamentos na FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. A tabela 3 mostra todos os valores dos modos vibracionais atribuídos às amostras FFC original, FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ e FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$.

Tabela 3 – Principais modos vibracionais para as três amostras de fibra de carbono.

Amostra/ tratamento	Modos Vibracionais/ cm^{-1}							
	$\nu_{\text{as}}\text{ C-H}$	$\nu_{\text{as}}\text{ C-C}$	δCH_3	δCH_2	$\nu_{\text{s}}\text{ OH}$	$\nu_{\text{s}}\text{ C=O}$	δOH	$\nu_{\text{s}}\text{ C-O}$
FFC original	2849	2919	1700	1500	---	---	---	---
FFC/ $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$	2840	2919	---	---	3479	1723	1386	1025
FFC/ $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-KMnO}_4$	---	---	---	---	3396	1643	1386	1025

O comportamento espectroscópico da fibra tratada com a solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ sugere uma maior quantidade de grupamentos carboxílicos quando comparado com o tratamento com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. Isso pode ser explicado devido à reação do ácido sulfúrico com o permanganato de potássio formar espécies de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) [89, 90], como mostrado na equação 12.



O oxigênio molecular (O_2), no seu estado fundamental, apresenta dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia. Por outro lado, o oxigênio *singlete* ($^1\text{O}_2$), no seu estado excitado, apresenta dois elétrons desemparelhados e opostos. Essa espécie é extremamente reativa e reage com as insaturações. Dessa forma, a presença do oxigênio singlete produzirá a oxidação

eficiente da superfície das FFC, gerando uma maior quantidade de grupos carboxílicos. Os esquemas (a) e (b) da figura 17 mostram o mecanismo proposto de oxidação das duplas ligações existentes na estrutura da FFC para os dois métodos utilizados.

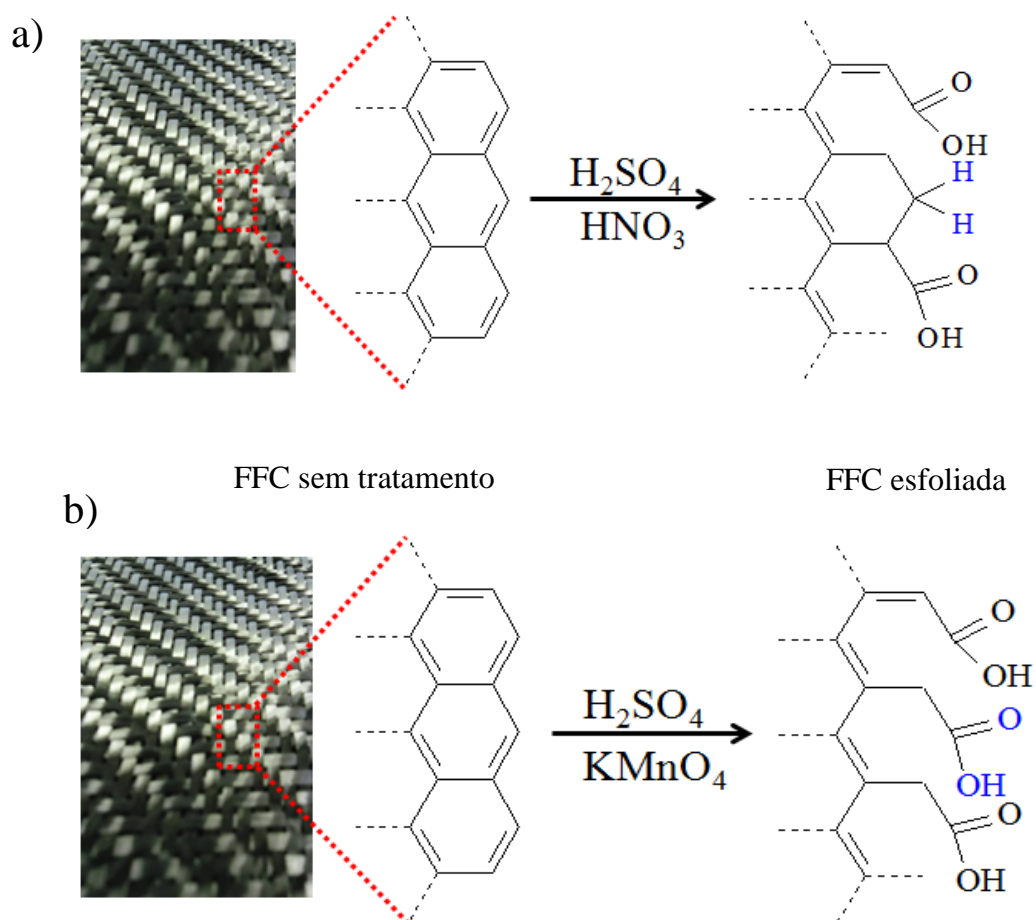


Figura 17 – Representação esquemática de funcionalização química das FFC por meio da esfoliação com (a) solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ e (b) solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$.

4.2 Formação de Grafeno *in situ* nas Fibras Flexíveis de Carbono

A morfologia das FFC original e tratada na solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ foi analisada com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura equipado com um Canhão de Emissão de Campo (MEV-FEG). A figura 18 mostra as imagens das FFC sem tratamento (**a** e **b**) e fibra de carbono tratada com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (**c** e **d**) em diferentes magnificações.

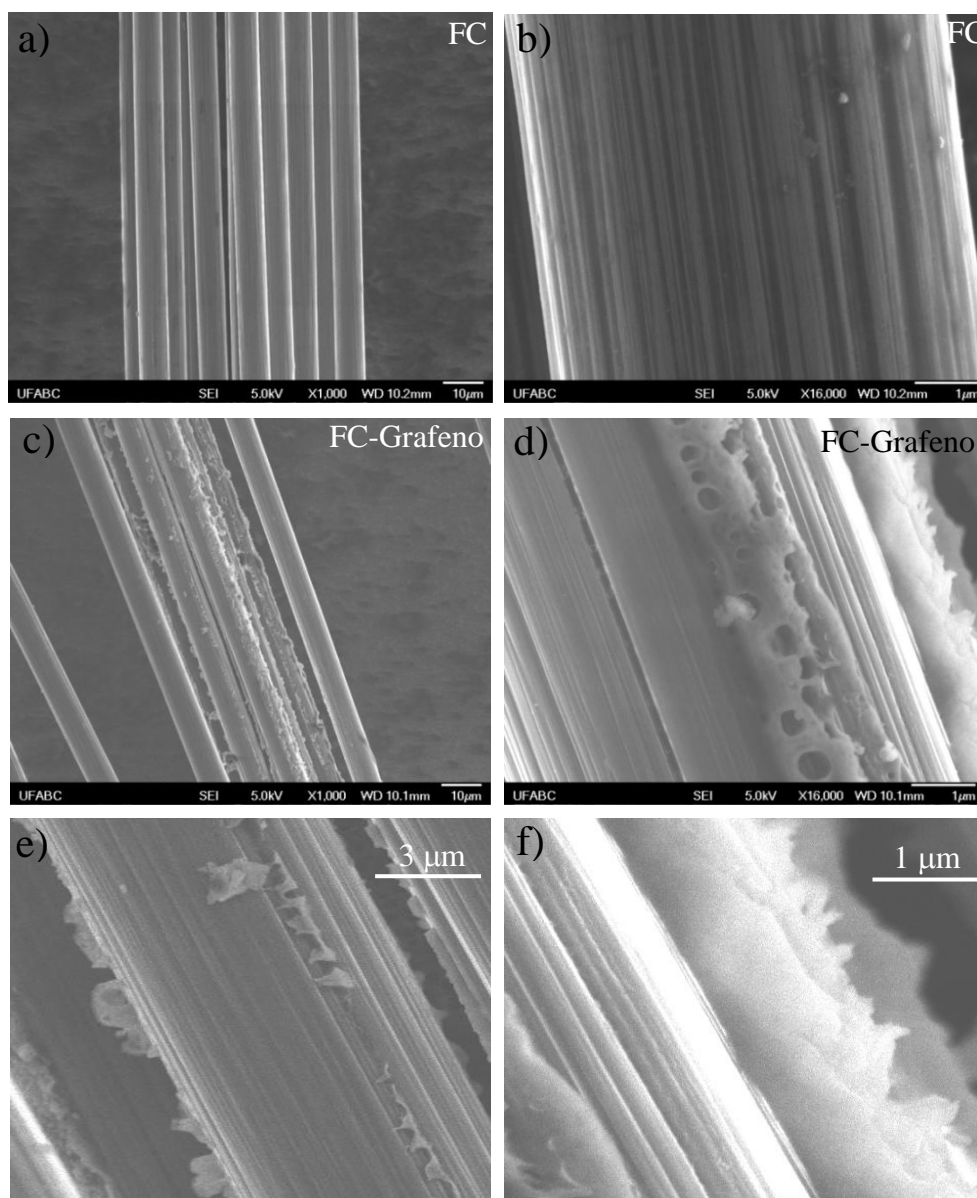


Figura 18 – Imagens de MEV-FEG em diferentes magnificações das FFC sem tratamento (**a** e **b**) e FFC tratada com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ (**c** e **d**).

Observa-se que as FFC sem tratamento possuem um diâmetro de 6,5 μm , estruturas homogêneas e uma morfologia cilíndrica (figuras **a** e **b**). No entanto, após o tratamento químico com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$, observa-se claramente que a superfície muda consideravelmente (figuras **c** e **d**). Nessas imagens, há a predominância de estruturas rugosas adsorvidos de forma aleatória na superfície da FFC.

Segundo a literatura [30, 91], o método de esfoliação de fibras de carbono com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ é muito utilizado na produção de folhas de grafeno. Dessa forma, através da análise dessas imagens, nota-se evidentemente a presença de estruturas características de óxidos de grafeno, como pode ser visto nas imagens da figura 18 (**e**) e (**f**). A utilização de estruturas de grafeno em eletrodos geralmente é feita em duas etapas: primeiro, produz-se o grafeno; em seguida, o grafeno é colocado na interface eletrodo/enzima. Por exemplo, Zhou e co-autores [92] sintetizaram óxido de grafeno por esfoliação química do grafite e, posteriormente, modificaram a superfície do eletrodo de carbono grafite para aplicação como sensor. Pumera [55] publicou um trabalho de revisão mostrando a utilização de estruturas de grafeno em interfaces de eletrodos. Diferentemente desses trabalhos, o procedimento adotado aqui apresenta uma forma de produção *in situ* de óxido de grafeno funcionalizado com grupamentos carboxílicos, os quais foram confirmados por meio de espectros de FTIR e serão discutidos, a seguir, através da espectroscopia Raman.

4.3 Espectroscopia Raman das Fibras Flexíveis de Carbono

Uma forma de analisar a formação de estruturas de grafeno é por meio da espectroscopia Raman. Com essa técnica é possível observar mudanças nas propriedades eletrônicas dos carbonos existentes na fibra após a esfoliação química em função do grau de desordem provocado após modificações. Além disso, historicamente ela é fortemente empregada para obter informações de tamanho de cristalito,

hibridização de carbono sp^2 e sp^3 , presença de defeitos e impurezas, etc. [93] Para isso, a região de excitação do laser deve ser na região onde as duplas ligações entre carbonos são ativas espectroscopicamente. Dessa forma, alinhou-se o laser em 532,14 nm (região do verde) utilizando-se um microespectrômetro. A figura 19 (a) apresenta uma fotografia mostrando a focalização do laser sobre a fibra de carbono usando uma lente objetiva de 100 vezes de aumento.

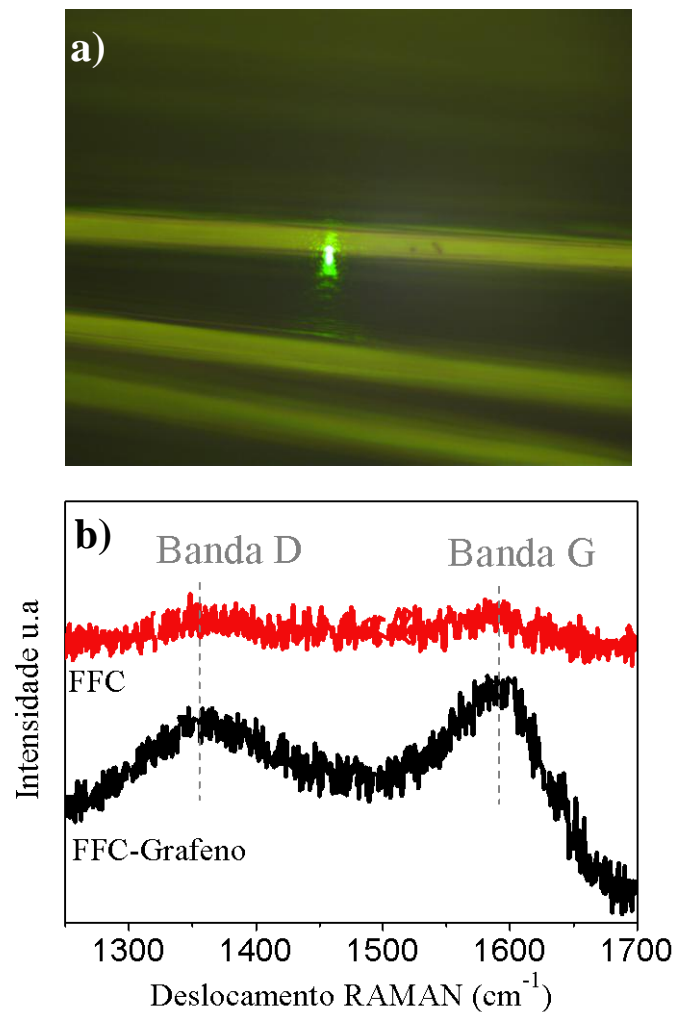


Figura 19 – (a) Fotografia mostrando a focalização do laser em cima da FFC com lente objetiva de 100 vezes de aumento e (b) espectro Raman da FFC (linha vermelha) e da FFC-OG (linha preta). O laser foi alinhado em 532,14 nm utilizando-se um microespectrômetro.

As principais bandas que caracterizam a estrutura do grafite são as bandas D e G, que aparecem aproximadamente em 1355 e 1582 cm^{-1} , [94] respectivamente. Conforme são realizadas modificações (esfoliação química) em estruturas de carbono (por exemplo, fibras), as regiões de aparecimento dessas bandas geralmente sofrem deslocamentos, podendo ou não ser acompanhadas de aumento nas intensidades dos picos. No entanto, o ponto chave na distinção entre grafeno esfoliado e grafite, em se tratando de espectroscopia Raman, é a relação I_D/I_G , onde I_D e I_G correspondem à intensidade de pico máximo da banda D e intensidade de pico máximo da banda G, respectivamente. [95] Quanto menor for essa razão, ou seja, quanto maior for a intensidade da banda G em relação à banda D, sugere-se que haja uma maior quantidade de defeitos na estrutura do grafeno devido à presença de duplas ligações isoladas em função da existência de grupos funcionais [96, 97]. A banda G é proporcionada devido às vibrações nos planos dos átomos de carbono sp^2 , também conhecida como espalhamento de primeira ordem dos modos E_{2g} . [98] Na figura 19 (b), observa-se, claramente, que os espectros para a FFC sem tratamento (linha vermelha) e FC-OG (linha preta) apresentam as bandas D e G em 1361 e 1587 cm^{-1} , respectivamente. A intensidade das duas bandas D e G do espectro da FC é praticamente a mesma. Por outro lado, ao realizar a espectroscopia para a FFC-OG, observa-se que a intensidade da banda G é maior em relação à banda D. Esse aumento de intensidade pode ser explicado devido à presença dos grupamentos carboxílicos presentes na estrutura, conforme visualizado nos espectros de FTIR. Esse comportamento sugere que a esfoliação diminuiu a média nos domínios dos carbonos sp^2 . [98] Outro ponto importante a ser destacado é o alargamento da banda D. Esse alargamento é ocasionado em função das vibrações ao longo das bordas [73] do grafite após a esfoliação. A tabela 4 mostra os parâmetros I_D , I_G e os valores das razões.

Tabela 4 – Posições, intensidades e relação dos picos para a FFC e FFC-OG.

	FFC	FFC-OG
Banda D	1361 cm ⁻¹	1363 cm ⁻¹
Banda G	1587 cm ⁻¹	1589 cm ⁻¹
I _D	2,01	1,60
I _G	2,01	1,80
I _D /I _G	1,00	0,88

Com o intuito de comprovar as modificações observadas por FTIR e Raman, empregou-se a técnica de difração de raios-X. A presença de grupos oxigenados na estrutura do grafeno provoca mudanças nos padrões de difração de raios-X, por exemplo, na intensidade e no deslocamento dos picos característico do grafite. Nesse aspecto, a figura 20 mostra os espectros de difração de raios-X para a FFC (linha preta) e para FFC-OG (linha vermelha). Ambos espectros mostram dois picos bem definidos, um em $2\theta = 11.7^\circ$, correspondente à reflexão (001), e outro em torno de $2\theta = 25.0^\circ$, correspondente à reflexão (002). [30] O pico 001 é correspondente à distância interplanar entre as folhas de grafeno. Segundo o espectro da figura 20, a intensidade do pico (001) para FFC-OG é maior quando comparada com a intensidade do pico para FFC. De acordo com a literatura, o aumento na intensidade do pico (001) provavelmente pode ser explicado em função da presença de grupos hidrofílicos [99] entre as folhas do óxido de grafeno [100] que constituem os aglomerados observados nas imagens de MEV-FEG. Outro fato observado é o deslocamento do pico (002) de $25,1^\circ$ para $24,1^\circ$ após a formação do óxido de grafeno, como pode ser visto no detalhe da figura 20. Esse deslocamento para baixos valores sugere um maior espaçamento da distância interplanar desse pico. Esses comportamentos para os dois picos também foi

observado por Park e co-autores [101] após a obtenção de óxido de grafeno partindo de grafite.

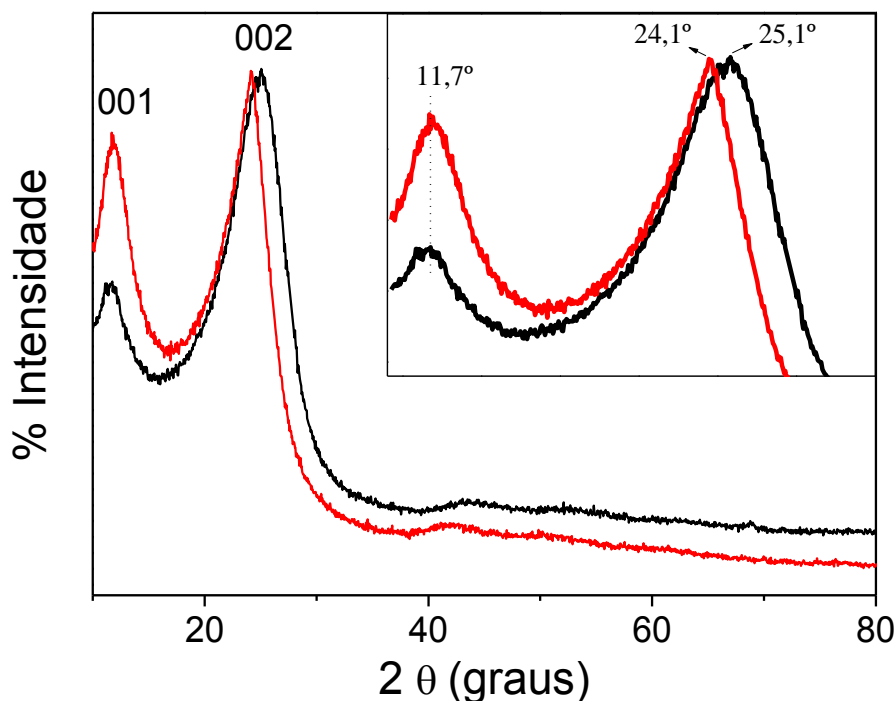


Figura 20 – Difractogramas de raios-X para FFC (linha preta) e FFC-OG (linha vermelha). Detalhe mostramos aumento do pico (001) e o deslocamento do pico (002), após a formação do óxido de grafeno na superfície das fibras.

O espectro de difração de raios-X da FFC-OG apresenta as características relacionadas ao comportamento cristalográfico da estrutura do óxido que está presente na superfície da fibra de carbono sem a evidência de picos correlacionados a possíveis impurezas provenientes da síntese. Nesse sentido, a fim de comprovar que a reação entre o H_2SO_4 e o $KMnO_4$, utilizada na esfoliação da fibra, não gera impurezas na estrutura da FFC-OG, realizou-se análises de Energia Dispersiva de raios-X (EDX). Essa técnica faz um mapeamento químico de todos os componentes que estão presentes na estrutura do material analisado. Nesse sentido, a figura 21 (a) mostra o espectro de EDX que correlaciona a intensidade em função da energia em elétrons-Volts (eV) da FFC contendo o óxido de grafeno. Nesse espectro, observa-se, nitidamente, a presença de duas bandas bem definidas, uma em 0,25 keV característica do carbono, e outra em

0,5 keV, característica do oxigênio. [102] A presença do traço elementar do oxigênio indica que o grafeno contém grupamentos hidrofílicos (óxido de grafeno) e corrobora com os espectros de FTIR, Raman e de difração de raios X.

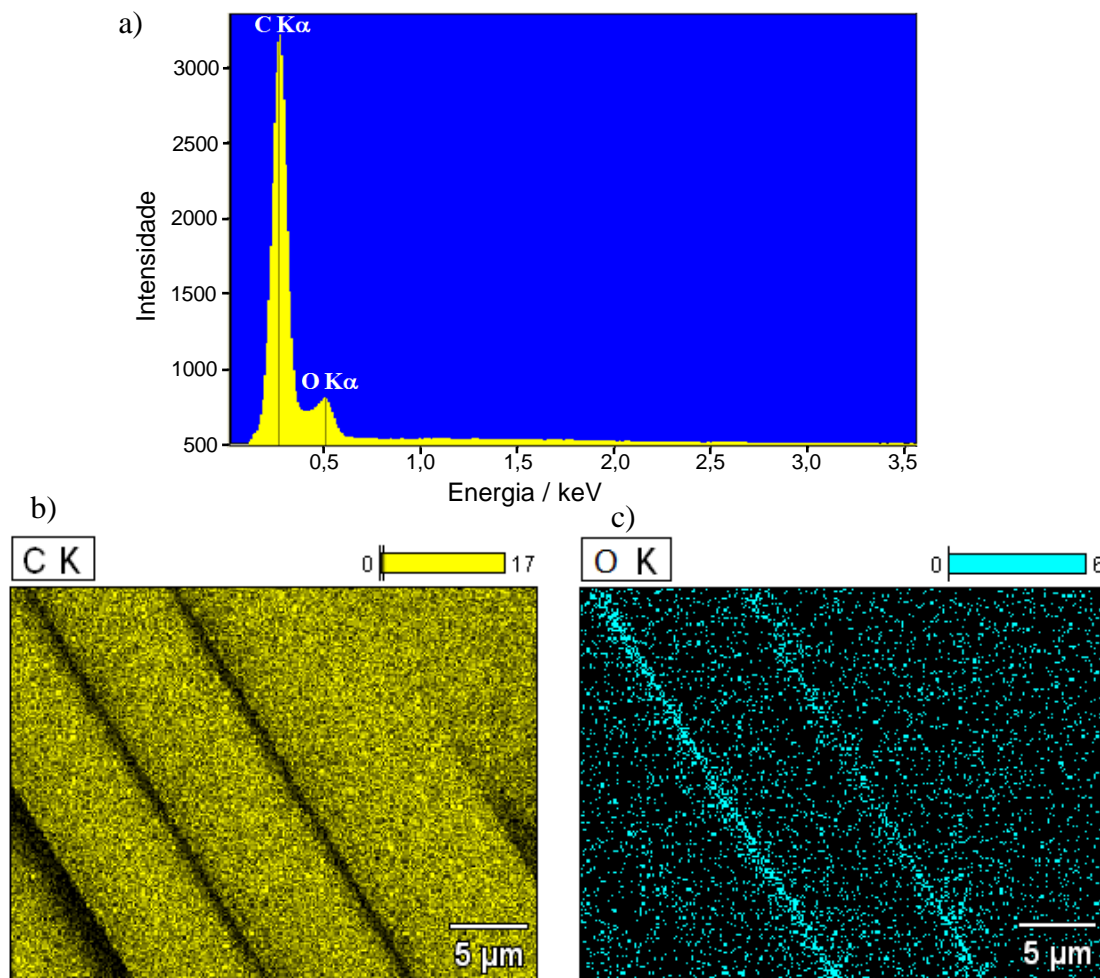


Figura 21 – (a) Espectro de EDX para a FFC-OG e mapeamento químico do carbono (b) e do oxigênio (c).

Outro fato importante é a ausência de picos provenientes de impurezas da síntese do óxido de grafeno. Isso pode ser confirmado através do mapeamento químico do carbono e do oxigênio realizado na FFC-OG, como pode ser visto nas figuras 21 (b) e (c), respectivamente. A figura 21 (b) mostra claramente três fibras juntas, onde praticamente toda região destacada pela cor amarela representa o mapeamento químico da presença de traços do carbono. Por outro lado, o mapeamento químico do oxigênio é destacado pela cor azul na figura 21 (c). Nessa figura, observa-se, claramente, que uma

das fibras concentra a maior quantidade de traços de oxigênio nas bordas da fibra. Isso pode ser explicado pelo fato de que essa fibra sofreu uma maior oxidação no processo de esfoliação, do qual resultou em uma maior quantidade de grupamentos carboxílicos na região equatorial das folhas de óxido de grafeno. Portanto, a partir dos resultados analisados provenientes das técnicas de FTIR, Raman, raios-X e EDX, acredita-se que a estrutura química do óxido de grafeno obtida a partir da síntese é baseada segundo a figura 22. Também, é plausível a presença de defeitos na estrutura do plano basal do óxido de grafeno. Além disso, há uma maior predominância de grupamentos carboxílicos, sendo possível a presença de grupos (OH) e de epóxidos.

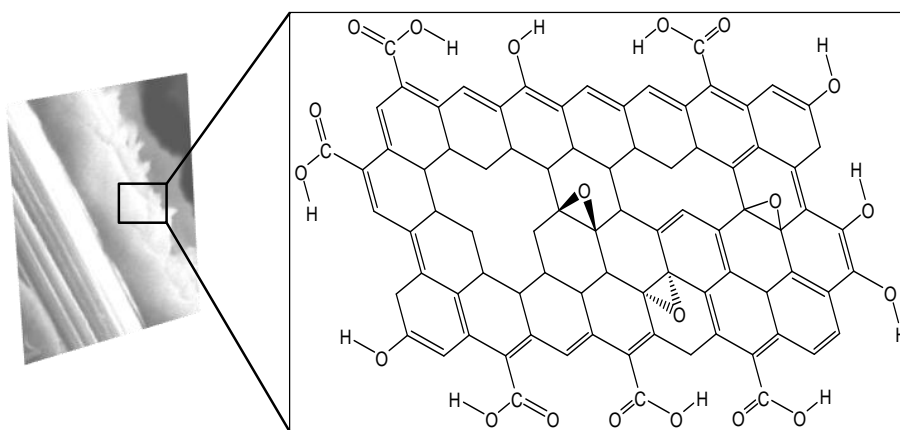


Figura 22– Estrutura química proposta do óxido de grafeno esfoliado na superfície da FFC.

4.4 Voltametria Cíclica dos Bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx

Empregou-se a voltametria cíclica para analisar o comportamento redox da enzima GOx imobilizada na superfície das FFC sem e com a presença do óxido de grafeno (FFC-OG). O sistema utilizado foi o convencional de três eletrodos: Ag/AgCl_{Sat} como referência, um contra-eletródo de platina e a fibra de carbono modificada com a GOx como eletródo de trabalho. Antes de investigar as propriedades redox das enzimas imobilizadas na fibra, analisou-se o comportamento eletroquímico das fibras de carbono antes e após a formação do OG *in situ*. A figura 23 mostra os voltamogramas cíclicos

para FFC sem tratamento (linha preta) e FFC-OG (linha verde) na região de potencial compreendida entre 0 e -0,8 V. Ambos os eletrodos FFC e FFC-OG apresentam um comportamento eletroquímico semelhante, em que não há nenhum processo faradaico. Observa-se apenas um pequeno aumento nas correntes residuais de oxidação para o eletrodo de FFC-OG. Esse aumento na corrente, provavelmente, pode estar atribuído ao aumento na rugosidade superficial da fibra, devido à presença do OG observado nas imagens de MEV-FEG.

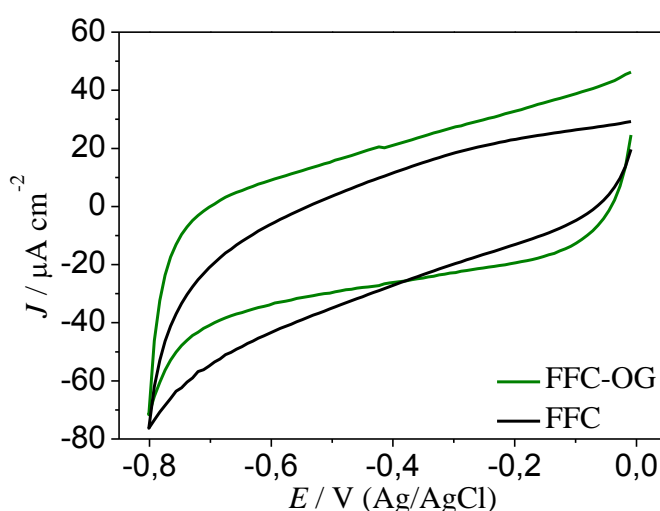


Figura 23 – Voltamogramas cíclicos para FFC sem tratamento (linha preta) e FFC-OG (linha verde). Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02. Velocidade de varredura: 30 mV s⁻¹.

Esse comportamento também foi reportado por Kang e coautores [103] ao investigarem as propriedades eletroquímicas de um eletrodo de carbono grafite modificado com grafeno. Kim e coautores [104] também reportaram que a presença do óxido de grafeno na superfície do eletrodo de carbono grafite aumenta a densidade de corrente elétrica em razão da elevada área de superfície que o grafeno proporciona.

O comportamento eletroquímico das FFC modificadas com a enzima GOx foi completamente diferente quando comparado ao comportamento das fibras sem a enzima. Ao imobilizar a GOx na fibra sem tratamento, nota-se um processo redox muito pequeno, como pode ser visto na linha vermelha da figura 24. No entanto, ao imobilizar

a GOx na FFC-OG, o processo redox aparece mais nítido e deslocado para regiões mais negativas de potencial, (linha preta da figura 23).

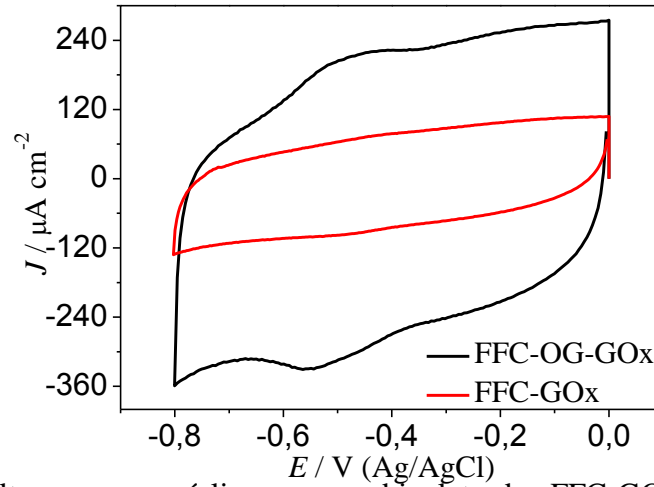


Figura 24 – Voltamogramas cíclicos para os bioeletrodos FFC-GOx (linha vermelha) e FFC-OG-GOx (linha preta). Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02. Velocidade de varredura: 30 mV s⁻¹.

O potencial formal (E^0) para ambos os bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx pode ser calculado pela equação 13:

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (13)$$

Onde, E_{pa} e E_{pc} são os potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente. O valor obtido de E^0 foi de -0,44 V para FC-GOx, enquanto que para o bioeletrodo FFC-OG-GOx, o valor foi de -0,50 V. Os valores de E_{pa} , E_{pc} e E^0 estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5 – Potenciais E_{pa} , E_{pc} e E^0 .

Bioeletrodo	Potencial/V		
	E_{pa}	E_{pc}	E^0
FFC-GOx	-0,41	-0,47	-0,44
FFC-OG-GOx	-0,48	-0,52	-0,50

Ambos os valores de potenciais estão próximos ao potencial formal teórico (E^0) do FAD da GOx reportados na literatura [105-107], tais como -0,434 V [108], -0,460 V [109] e -0,424 V [110]. O valor da separação de potencial de pico anódico e catódico apresentado foi de 60 e 50 mV para FFC-GOx e FFC-OG-GOx, respectivamente.

Valores abaixo de 60 mV indicam um processo reversível e um rápido mecanismo de trocas de cargas.

Dentro da enzima glicose oxidase, o cofator flaviana adenina dinucleotídeo (FAD) assume a sua forma reduzida (FADH_2) quando ele recebe dois prótons e dois elétrons, segundo a reação química da figura 25. De toda a estrutura química do FAD, o processo redox ocorre apenas nos anéis aromáticos da flavina, segundo os hidrogêneos destacados pela cor azul.

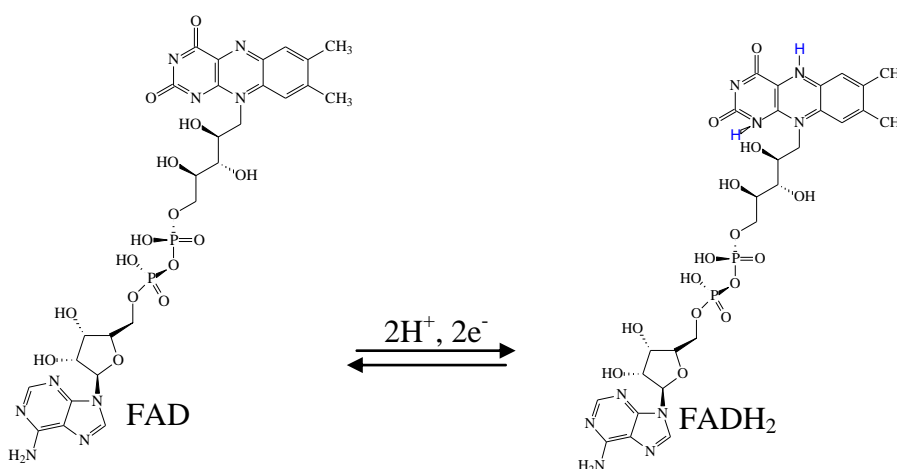


Figura 25 – Representação das estruturas químicas do FAD e FADH_2 .

A TDE da GOx para superfície de eletrodos sólidos é bem reportada na literatura. Várias estratégias de imobilização garantem ligações de caráter forte (por exemplo, ligações covalentes) e de caráter fraco (interações eletrostáticas). Por exemplo, Cai e Chen [111] obtiveram a transferência direta de elétrons da GOx para a superfície do eletrodo de carbono grafite na presença de nanotubos de carbono funcionalizados com grupamentos carboxílicos (COO^-). Nesse trabalho, os autores atribuíram a comunicação da GOx com o eletrodo devido às características dos nanotubos como dimensão, estrutura eletrônica, elevada condutividade elétrica e principalmente devido a presença de grupos oxigenados, tais como C=O , O-H e C-O . Ivnitski e coautores [112] produziram um bioânodo de biocélula de glicose a partir de um papel de carbono modificado com nanotubos de carbono e a enzima GOx. A

estratégia para a obtenção da TDE da enzima para o eletrodo foi a imobilização da GOx pelo método do *entrapment* “aprisionamento”. Especificamente, a estratégia adotada aqui para a obtenção da TDE da GOx para a superfície da fibra foi a esfoliação química da fibra com a produção de folhas de óxido de grafeno *in situ*. Nesse aspecto, a interação esperada entre o OG contendo os grupamentos carboxílicos e a GOx é de caráter não covalente, como ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas.

4.5 Estudo Cinético da Transferência Direta de Elétrons

Para investigar o fenômeno de transferência direta de elétrons na interface eletrodo/enzima, realizaram-se vários ciclos em diferentes velocidades de para ambos os sistemas FFC-GOx e FFC-OG-GOx, figuras 26 (a) e (b). Observa-se que os processos eletroquímicos atribuídos ao FAD, presentes no interior da enzima GOx, aumentam conforme haja o aumento da velocidade de varredura para os dois eletrodos .

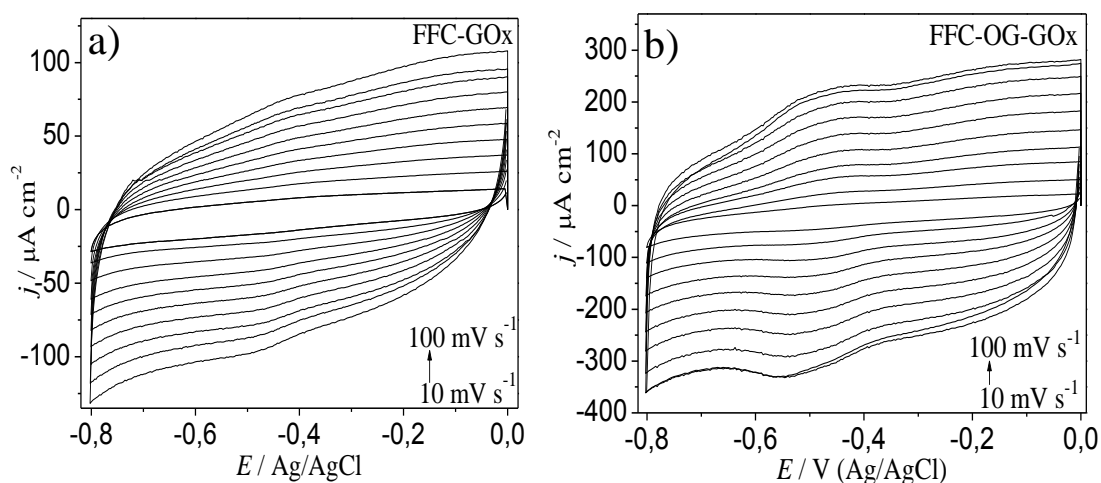


Figura 26 – Voltamogramas cíclicos para os bioeletrodos (a) FFC-GOx e (b) FFC-OG-GOx em diferentes velocidades de varredura: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02.

O aumento da velocidade de varredura promove o aumento das densidades de correntes de pico anódico (J_{pa}) e catódico (J_{pc}). Dessa forma, construindo-se os gráficos da dependência das densidades de pico máximo em função da velocidade de varredura (ν), obtêm-se duas retas, como pode ser observado nas figuras 27 (a) e (b). Esse

comportamento indica que os processos eletroquímicos são governados por transferência de cargas [113] na interface GOx/FFC.

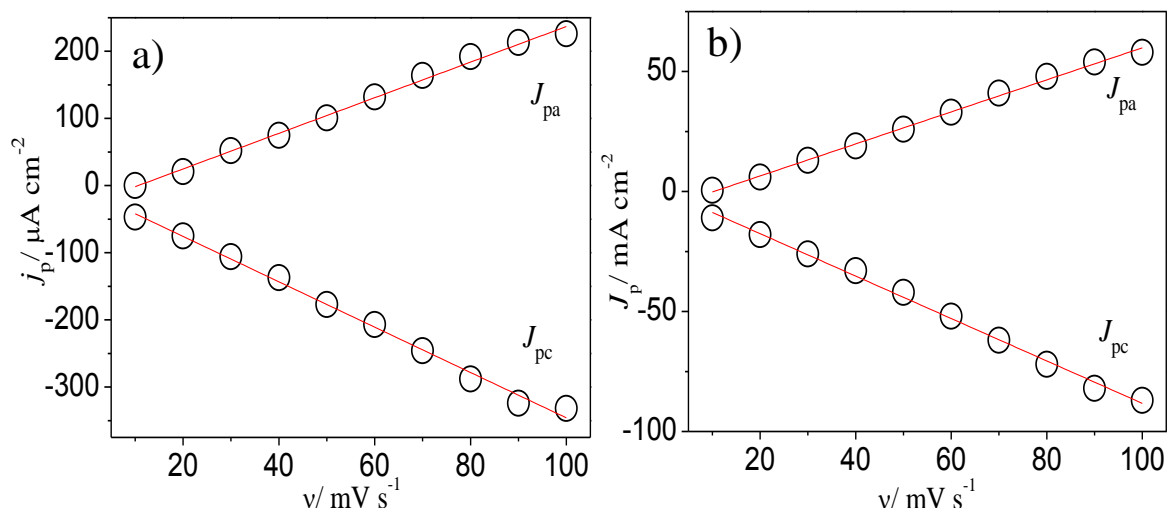


Figura 27 – Gráficos mostrando a dependência das densidades máximas de corrente de pico anódico (J_{pa}) e catódico (J_{pc}) em função da velocidade de varredura. (a) FFC-GOx e (b) FFC-OG-GOx. Eletrólito: tampão fosfato de sódio, pH 7,02.

Outro ponto extremamente importante é a estabilidade dos processos redox, o qual será abordado no tópico a seguir.

4.6 Estabilidade eletroquímica do Bioeletrodo FFC-OG-GOx

O estudo da estabilidade eletroquímica foi realizado apenas para o bioeletrodo FFC-OG-GOx, uma vez que este apresentou processos redox mais elevados. A figura 28 (a) apresenta 20 voltamogramas cíclicos registrados consecutivamente a 50 mV s^{-1} . Nota-se, evidentemente, que os processos eletroquímicos não perdem corrente faradaica e nem sofrem deslocamentos dos potenciais redox do FAD consideravelmente. Esse comportamento pode ser confirmado quando se constrói um gráfico da dependência dos potenciais de pico anódico em função dos ciclos realizados (figura 28 b). No 20º ciclo, a perda de corrente de oxidação foi de 9%. Isso revela que o bioeletrodo FFC-OG-GOx apresenta uma elevada estabilidade eletroquímica e que a enzima encontra-se

fortemente adsorvida na superfície da fibra. Assim, todos esses resultados indicam que o bioeletrodo FFC-OG-GOx é altamente aplicável como ânodos de biocélulas a combustível. No entanto, o tópico a seguir apresenta a discussão mais detalhada sobre a aplicabilidade do bioeletrodo em biocélulas a combustível.

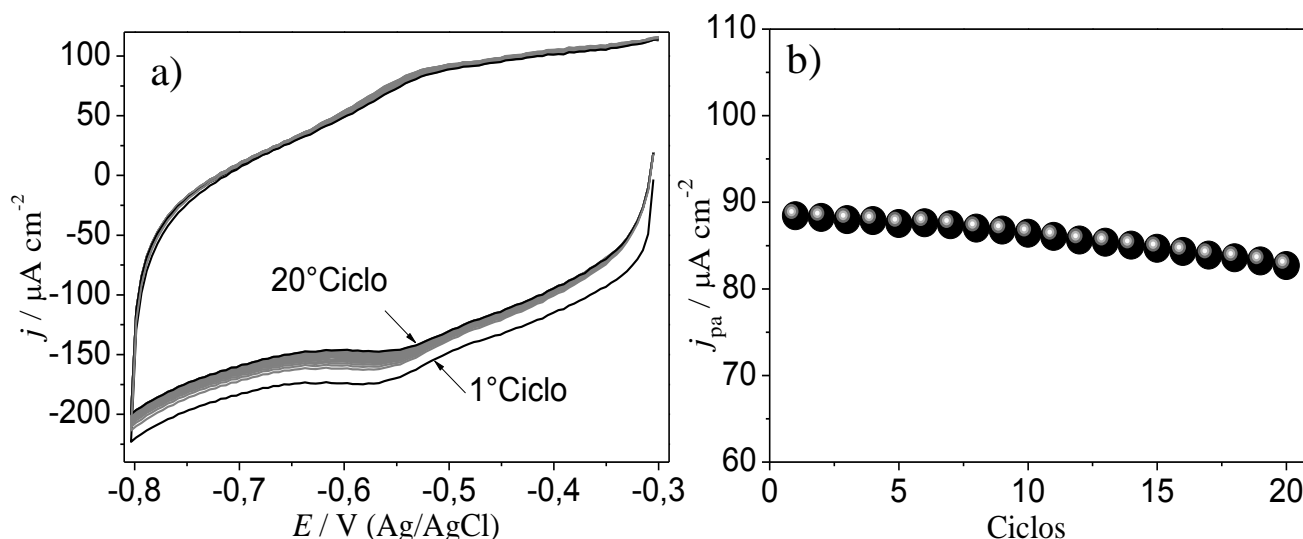


Figura 28 – (a) Teste de estabilidade eletroquímica do bioeletrodo FFC-OG-GOx com 20 ciclos registrados a cada 30 minutos. Velocidade de varredura: 50 mVs^{-1} . Eletrólito: tampão fosfato de sódio pH 7,02. (b) Gráfico mostrando a dependência das densidades de corrente de pico máximo em função do tempo.

4.7 Cinética de Transferência de Elétrons

As propriedades cinéticas de transferência de elétrons na interface eletrodo/enzima correspondem a um ponto chave no desempenho de bioeletrodos aplicáveis em biodispositivos. Nesse aspecto, a capacidade e a velocidade de trocas de elétrons, nessa interface, afetam severamente o desempenho final dos biodispositivos. Dessa maneira, o estudo da cinética de transferência de elétrons para os bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx foi explorado variando-se a velocidade de varredura de 10 a 2000 mVs^{-1} , como pode ser observado nas figuras 29 (a) e (b). Nota-se, claramente, que os processos redox do FAD permanecem nítidos até 2000 mV s^{-1} , apenas para o

bioeletrodo FFC-OG-GOx. A relação linear entre a velocidade de varredura e os potenciais de pico anódico e catódico também permanecem, como pode ser visto nas figuras 29 (c) e (d). No entanto, para o bioeletrodo FFC-GOx o processo eletroquímico do par redox FAD/FADH₂ diminui a intensidade ao passo que a velocidade de varredura é aumentada.

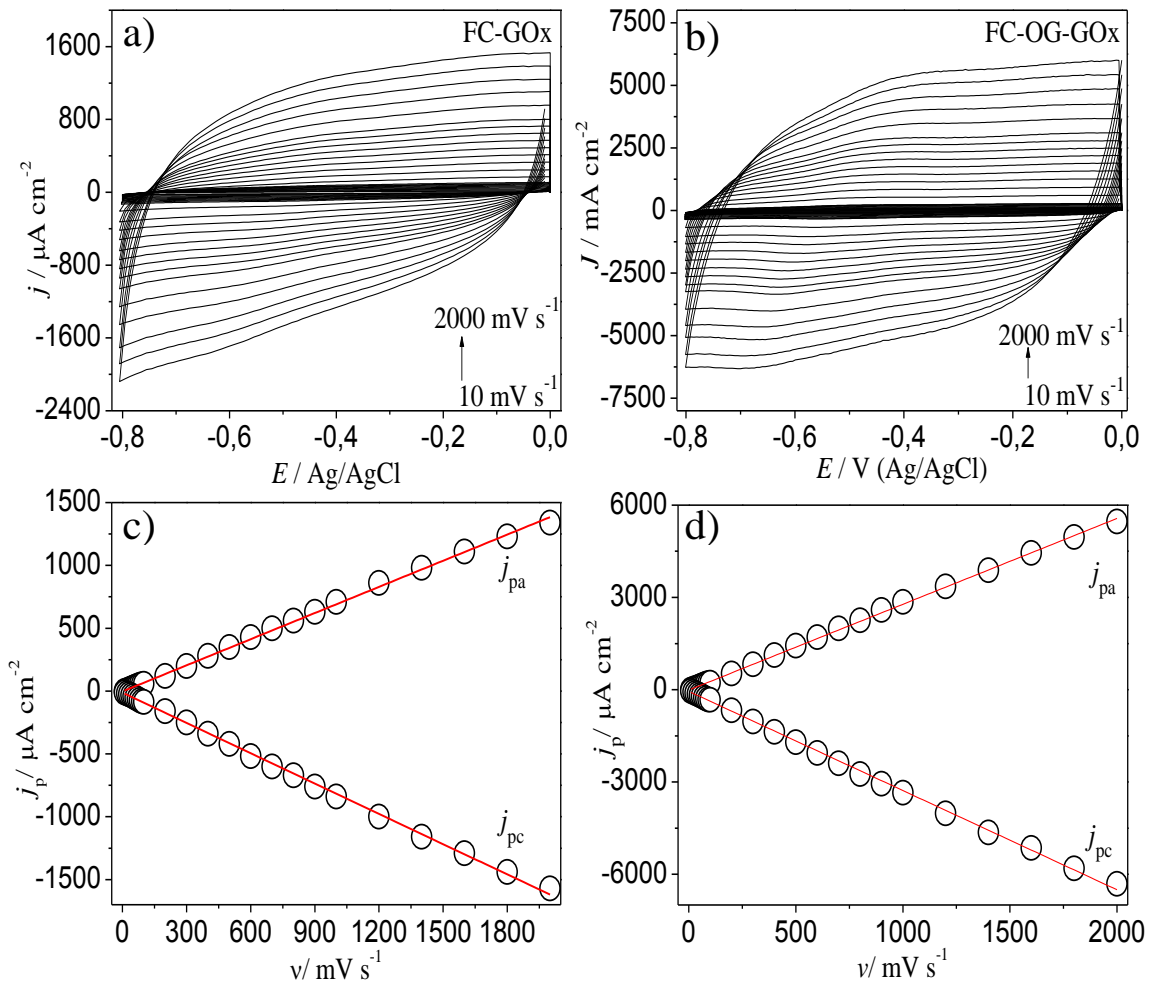


Figura 29 – Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 mVs^{-1} para (a) FFC-GOx e FFC-OG-GOx (b). Dependência dos potenciais de pico anódico e catódico em função do log da velocidade de varredura para os bioeletrodos FFC-GOx (c) e FFC-OG-GOx (d).

4.7.1 Teoria de Butler-Volmer para DET

Alguns trabalhos na literatura [49] discutem a transferência de elétrons para enzimas fortemente adsorvidas em eletrodos sob condições não catalíticas. Especificamente, a situação não catalítica refere-se ao comportamento redox enzimático na ausência de um substrato específico. Aqui, empregou-se as equações de Laviron [40] para obter os parâmetros cinéticos para transferência de elétrons (em sobrepotencial zero) na interface entre a enzima GOx e a superfície das fibras com e sem o óxido de grafeno. Baseado na teoria de Butler-Volmer (BV) [113, 114], as velocidades de transferência de elétrons podem ser descritas por uma dependência exponencial semiempírica das constantes de velocidade com o sobrepotencial ($E-E^0$), conforme as seguintes equações:

$$k_{red}^{BV} = k^0 \exp(-\alpha F(E - E^0)/RT) \quad (10)$$

$$k_{oxi}^{BV} = k^0 \exp((1 - \alpha)F(E - E^0)/RT) \quad (11)$$

Nesse formalismo, k^0 é a constante de velocidade padrão (em sobrepotencial zero), n é o número de elétrons transferidos e α é o coeficiente de transferência eletrônica, que representa o grau de simetria entre as constantes de velocidade de oxidação e redução ($\alpha = 0,5$ para um sistema totalmente simétrico). Os parâmetros k^0 e α podem ser determinados a partir do tratamento matemático proposto por Laviron [40]. O método se baseia na teoria de Butler-Volmer e os únicos dados experimentais necessários são os sobrepotenciais. Para estimar o valor de α , os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) são estudados em função do $\log v$. Conforme apresentado na Figura 30, em altas velocidades é observada uma relação linear (retas vermelhas) entre E_p e o $\log v$ com inclinações de $-2,3RT/\alpha nF$ e $2,3RT/(1-\alpha)nF$ para os picos catódico e anódico, respectivamente. A partir da inclinação dessas retas, o coeficiente

de transferência eletrônica (geralmente, $0,3 < \alpha < 0,7$ para processos quase reversíveis) pode ser calculado de acordo com a equação 12, ou a partir das velocidades de varredura (equação 14) [115]:

$$\log \frac{k_a}{k_c} = \log \left[\frac{\alpha}{(1-\alpha)} \right] \text{ ou } \frac{k_a}{k_c} = \frac{\alpha}{(1-\alpha)} \quad (14)$$

$$\frac{v_a}{v_c} = \frac{\alpha}{(1-\alpha)} \quad (15)$$

Onde k_a e k_c são as inclinações das retas derivadas dos gráficos E_{pa} e E_{pc} versus $\log v$. Uma vez estimado o valor de α , a constante de velocidade padrão k^0 pode ser determinada aplicando-se a condição de $E - E^{0'} = 0$ na equação 15, que com alguns rearranjos matemáticos se reduz na equação 16 [40].

$$\text{Log} k^0 = \alpha \text{Log}(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \text{Log} \alpha - \text{Log} \frac{RT}{nFv} - \frac{\alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p}{2,3RT} \quad (16)$$

$$k^0 = \frac{\alpha n F v_c}{RT} = \frac{(1-\alpha) \alpha n F v_a}{RT} \quad (17)$$

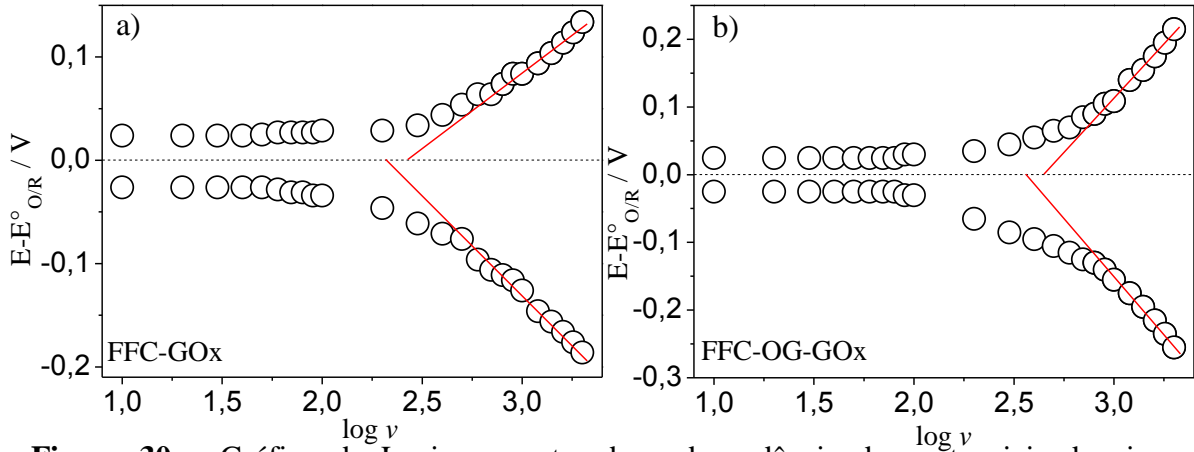


Figura 30 – Gráfico de Laviron mostrando a dependência dos potenciais de pico anódico e catódico em função do logaritmo da velocidade de varredura (v) para FFC-GOx (a) e FFC-OG-GOx (b).

O valor de α obtido foi de 0,56 para o bioeletrodo FFC-GOx (figura 30 a) e de 0,57 para FFC-OG-GOx (figura 30 b). A partir desses parâmetros, os valores das

constantes cinética de transferência de elétrons em sobrepotencial zero (k^0) foram calculados e sumarizados na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de k e de α para os bioeletrodos FFC-GOx e FFC-OG-GOx.

Bioeletrodo	α	k^0/s^{-1}
FFC-GOx	0,56	9,08
FFC-OG-GOx	0,57	15,04

O elevado valor de k^0 é atribuído à presença do óxido de grafeno nas FFC sobre as quais aproximam o FAD da GOx e a superfície eletródica do carbono e também ao aparecimento das bordas de grafite. Por outro lado, o valor de k^0 calculado para o sistema FFC-GOx foi de $9,08 \text{ s}^{-1}$. Comparativamente com outros valores de k^0 reportados na literatura [116-118], o sistema FFC-OG-GOx apresentou um maior valor, confirmando que a presença do óxido de grafeno promove um rápido mecanismo de trocas de elétrons nessa interface.

4.7.2 Teoria de Marcus para DET

Embora amplamente utilizado para descrever a cinética de transferência de elétrons, o formalismo de Butler-Volmer possui uma série de restrições e condições de contorno. O pressuposto principal da teoria de BV é que as energias de ativação para ambas as curvas, catódica e anódica, são uma função linear do sobrepotencial e não levam em consideração o efeito da energia de reorganização (λ) nas constantes de velocidade [113, 114]. Como consequência, valores superestimados de $k_{\text{red}}/k_{\text{oxi}}$ serão obtidos. Esses desvios podem ser compreendidos pelo fato da teoria de BV considerar as superfícies de reação lineares, em vez de parabólicas (ou seja, a energia potencial varia linearmente em vez de parabolicamente ao longo da coordenada de reação) e ignorar as contribuições, na velocidade, dos estados no eletrodo para qualquer potencial

diferente do potencial aplicado (nível de Fermi) [83]. Deste modo, a teoria de Marcus [80-82] se torna mais adequada para o estudo de reações de transferência de elétrons de proteínas redox adsorvidas.

A teoria de Marcus foi desenvolvida originalmente para reações de transferência homogênea de elétrons [49,80-82], quando aplicada a sistemas heterogêneos, e dessa forma, superou as restrições previstas pelo formalismo de Butler-Volmer. Para a transferência de elétrons entre um eletrodo e uma espécie redox adsorvida, Chidsey [34] derivou uma relação entre as constantes de velocidade (k_{red}/k_{oxi}) e o sobrepotencial (equação 6), por integração da equação de Marcus [49,80-82], que descreve a velocidade de transferência de elétrons entre um doador e um receptor sob todos os níveis de Fermi no eletrodo, usando a distribuição de Fermi-Dirac para explicar a probabilidade de ocupação de cada nível, uma vez que a transferência de elétrons pode ocorrer para ou a partir de qualquer nível de Fermi no eletrodo.

$$k_{red/oxi} = \frac{k_{max}}{\sqrt{4\pi\lambda/RT}} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\exp(-1/4\lambda RT[\lambda \pm F(E-E^0) - RTx]^2)}{1 + \exp(x)} dx \quad (6)$$

A constante de velocidade máxima, k_{max} , é o limite de k , quando o sobrepotencial tende ao infinito e é dado por:

$$k_{max} = \frac{4\pi^2 V_0^2}{N_A h RT} \exp(-\beta r) \quad (18)$$

Onde V_0 representa o grau de acoplamento eletrônico, r é a distância entre o doador e o receptor (em Å) e β é o coeficiente de decaimento (em Å⁻¹). As constantes de velocidade podem ser avaliadas numericamente a partir da equação 6 usando a metodologia proposta por Heering e colaboradores [83]. Utilizando o software Matlab® R2013a, essa metodologia (descrita no tópico 3.4 da parte experimental) [84,85] foi empregada para calcular as curvas $\log(k_{red} + k_{oxi})$ vs $E-E^0$ para diferentes valores de energia de

reorganização. As curvas apresentadas na figura 31 são similares às obtidas anteriormente por outros autores [42, 118]. Para altos valores de λ a soma das constantes de velocidade aumenta de forma logarítmica com o aumento do sobrepotencial, conforme previsto pelo modelo de Butler-Volmer (figura 31, linha vermelha).

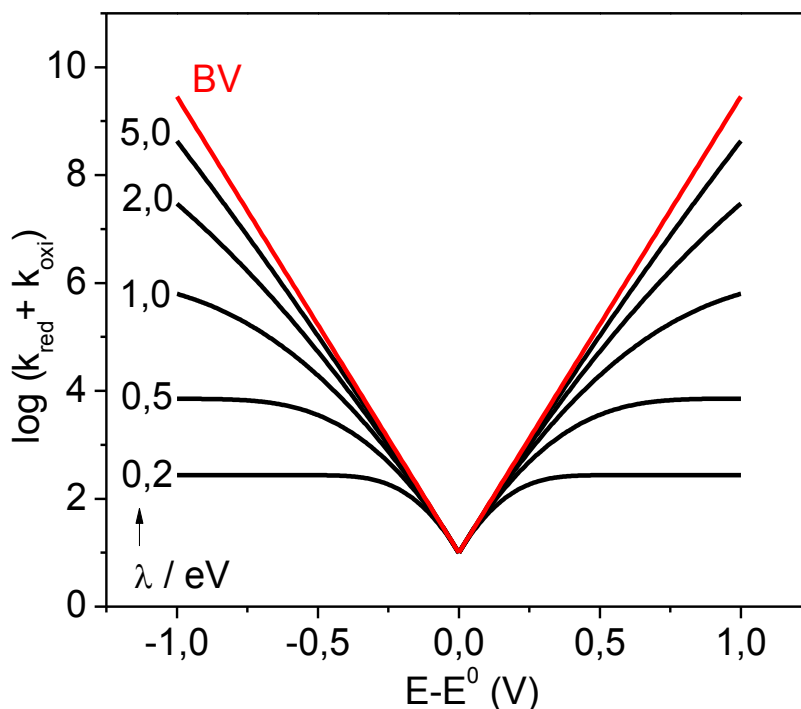


Figura 31 – Gráfico dos sobrepotenciais ($E - E^0$) em função do logaritmo das constantes de velocidade de transferência de elétrons de redução e oxidação ($k_{red} + k_{oxi}$). As curvas pretas calculadas segundo a equação de Marcus com diferentes valores de λ . As linhas retas vermelhas foram calculadas segundo as equações 10 e 11, como previstas pelo comportamento de Butler-Volmer.

A partir dessas considerações é possível analisar teoricamente o comportamento das constantes, para FFC-GOx e FFC-OG-GOx, levando-se em consideração as proposições de Butler-Volmer e Marcus. Nesse sentido, nas figuras 31 (a) e (b) mostram curvas teóricas que correlacionam os sobrepotenciais ($E - E^0$) em função do logaritmo das constantes de oxidação (k_{oxi}^{BV}) e redução (k_{red}^{BV}), conforme previsto por Butler-Volmer (linhas retas pretas) e segundo a teoria de Marcus (curvas azul, vermelha e verde). As curvas representadas por bolas pretas representam o comportamento

experimental do $\log v$ em função dos sobrepotenciais. As linhas retas nessas duas figuras foram calculadas segundo as equações 10 e 11, como previsto por Butler-Volmer (BV).

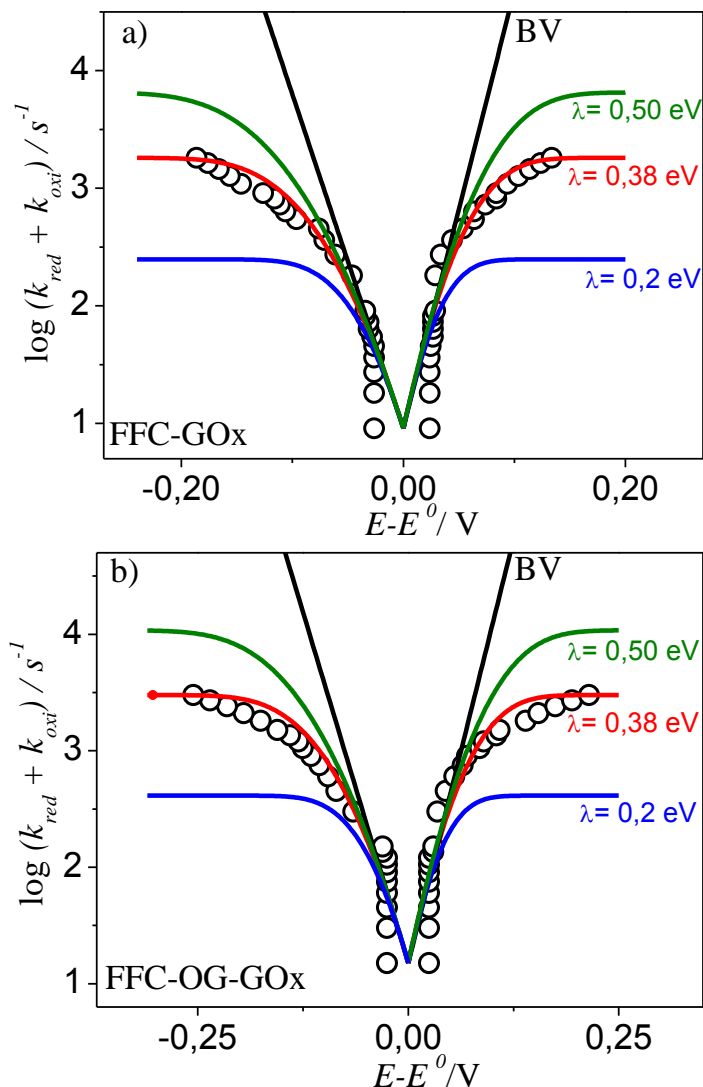


Figura 31 – Gráfico da medida do decaimento das constantes em função dos sobrepotenciais ($t = 25^\circ\text{C}$). Curvas foram calculadas segundo a equação 6 com: $\lambda = 0.2$ eV (azul), $\lambda = 0.38$ eV (vermelho) e $\lambda = 0.5$ eV (verde) com $k^0 = 9,08 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,56$ para FFC-GOx (a) e $k^0 = 15,04 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0,57$ para FFC-OG-GOx (b).

Para os sistemas FFC-GOx e FFC-OG-GOx, o comportamento experimental (representado pelas bolas pretas), previsto por BV, se aproxima das curvas teóricas quando a energia de reorganização da enzima é de 0,38 eV (curva da linha vermelha).

As equações de Butler-Volmer equivalem a um caso limite da equação integrada de Marcus com λ tendendo ao infinito. Experimentalmente, isso significa que as equações de Butler-Volmer só podem ser utilizadas para determinar as velocidades de transferência de elétrons com suficiente acurácia, quando a energia de reorganização do sistema é muito maior que o sobrepotencial máximo aplicado. Isso acontece porque a coordenada de reação parabólica assumida na teoria de Marcus é estreitamente aproximada a uma função linear, quando o potencial aplicado é muito menor do que a energia de reorganização. Entretanto, para valores menores de energia de reorganização, é observado um aumento exponencial do $\log(k_{\text{red}} + k_{\text{oxi}})$ em função do sobrepotencial, até a formação de um platô, onde a velocidade de transferência de carga é máxima, k_{max} . Isso ocorre quando o sobrepotencial é muito maior do que a energia de reorganização e reflete o fato de que toda a distribuição das moléculas redox ativas com estados disponíveis para transferir elétrons (estados desocupados para redução e ocupados para oxidação) é enquadrada exclusivamente pelos estados no eletrodo que, por sua vez, também estão disponíveis para a transferência de elétrons (estados ocupados para redução e desocupados para oxidação) [49, 42, 118]. Quando k_{max} é alcançado, a aplicação de maiores potenciais não cria novos estados disponíveis para transferência eletrônica, nem aumenta a probabilidade de transferência de elétrons entre os dois estados, portanto, as constantes de velocidade se tornam independentes do sobrepotencial. Esse platô formado é o análogo eletroquímico da região de inversão de Marcus para transferências de elétrons intra e intermolecular [49].

O valor de $\lambda = 0,38$ foi usado para gerar as curvas para FFC-GOx e FFC-OG-GOx no gráfico da figura 32. Como previsto pela teoria de Marcus, em baixos sobrepotenciais as constantes aumentam exponencialmente e assim, aproximam-se assintoticamente de um valor de patamar máximo (k_{max}) em elevados sobrepotenciais. A

partir dessa figura, a constante máxima atingida para FFC-OG-GOx foi duas vezes maior quando comparada a constante obtida para o bioeletrodo FFC-GOx (linha vermelha), o que indica que a presença do óxido de grafeno facilita os mecanismos de trocas de elétrons.

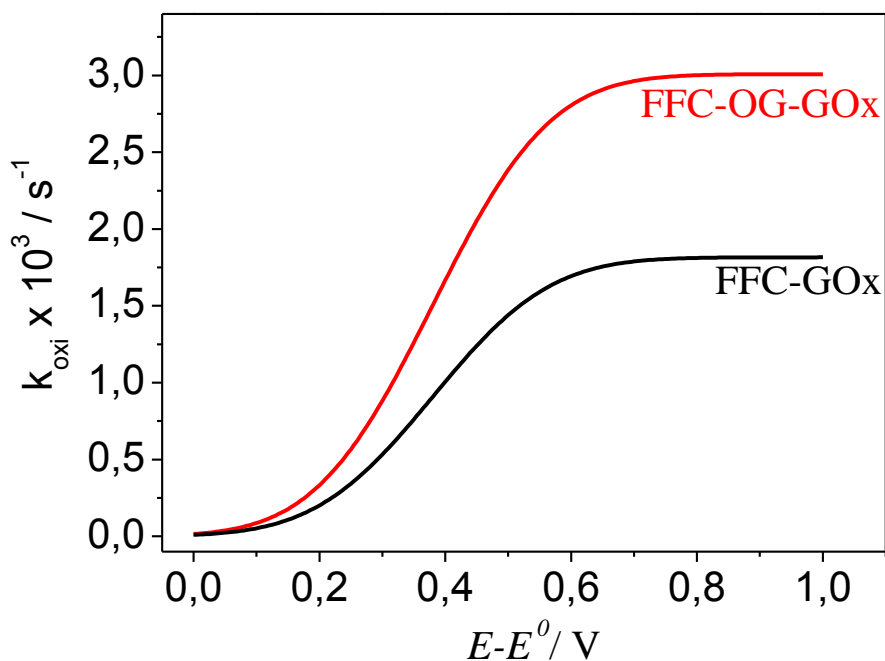


Figura 32 – Gráficos da constante de velocidade de TE de oxidação (k_{oxi}) em função do sobrepotencial para FFC-GOx ($k^0 = 9.08 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0.56$) (linha preta) e FFC-OG-GOx ($k^0 = 15.04 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0.57$) segundo a teoria interfacial de Marcus (equação 6 com $\lambda = 0,38 \text{ eV}$).

4.7.3 Dependência da TDE com a distância

Outra maneira de analisar a influência do óxido de grafeno na TDE é através da distância entre o FAD e a superfície da fibra de carbono. Estudos reportados na literatura [119, 120] mostram que a TDE ocorre quando a distância entre o cofator enzimático e a superfície do eletrodo é pequena suficiente para permitir a transferência do elétron (entorno de 13 Å). Nesse sentido, inicialmente se investigou o posicionamento do FAD dentro da estrutura proteica da GOx via simulações realizadas

no software Jmol Versão 12.2.15. A partir dessa visualização, o FAD não fica exatamente no centro da proteína, como pode ser observado na figura 33. Nessa figura, observa-se a representação da GOx contendo 4 distâncias (14,08, 19,36, 19,55 e 26,38 Å) entre as duas moléculas do FAD e a periferia da proteína. Considerando essa simulação, a TDE efetiva será favorecida se a enzima estiver preferencialmente imobilizada pelo lado onde a distância da periferia da proteína e o FAD sejam entorno de 14 Å. No entanto, o processo de imobilização adotado aqui promove uma adsorção enzimática de forma randômica, ou seja, de forma aleatória na superfície da fibra. Isso explica o fato do baixo sinal da TDE observado para o bioeletrodo FFC-GOx, no qual somente as enzimas adsorvidas através da menor distância conseguem trocar elétrons com a fibra.

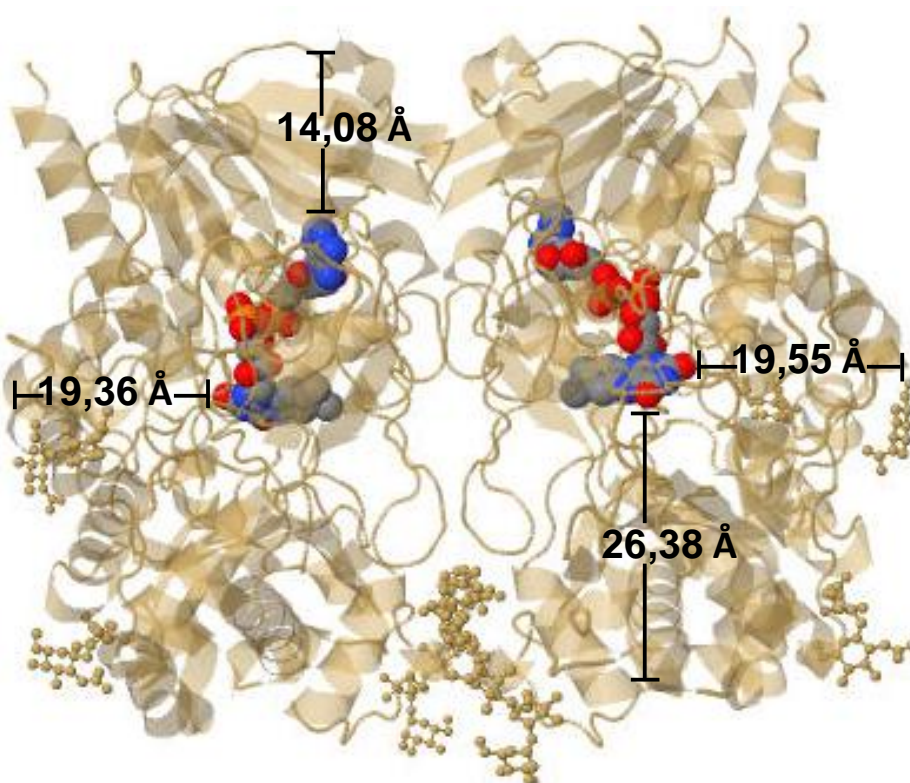


Figura 33 – Posição do FAD (bolas coloridas) dentro da enzima GOx (*RCSB Protein Data Bank*, código 1GPE). Estrutura e distâncias obtidas por meio de simulação realizada no software Jmol Versão 12.2.15.

A figura 34 (a e b) mostra uma representação esquemática do processo de adsorção da enzima na superfície da FFC e da FFC-OG, respectivamente. Na superfície da fibra com a morfologia homogênea, ou seja, sem óxido de grafeno, a TDE só é realizada pela menor distância (14,08 Å) entre o FAD e a superfície da fibra (figura 33 a). Por outro lado, quando a enzima orienta-se na superfície do eletrodo FFC pelos lados onde o FAD encontra-se com os maiores valores de distância de 19,36 ou 26,38 Å a TDE não é favorecida.

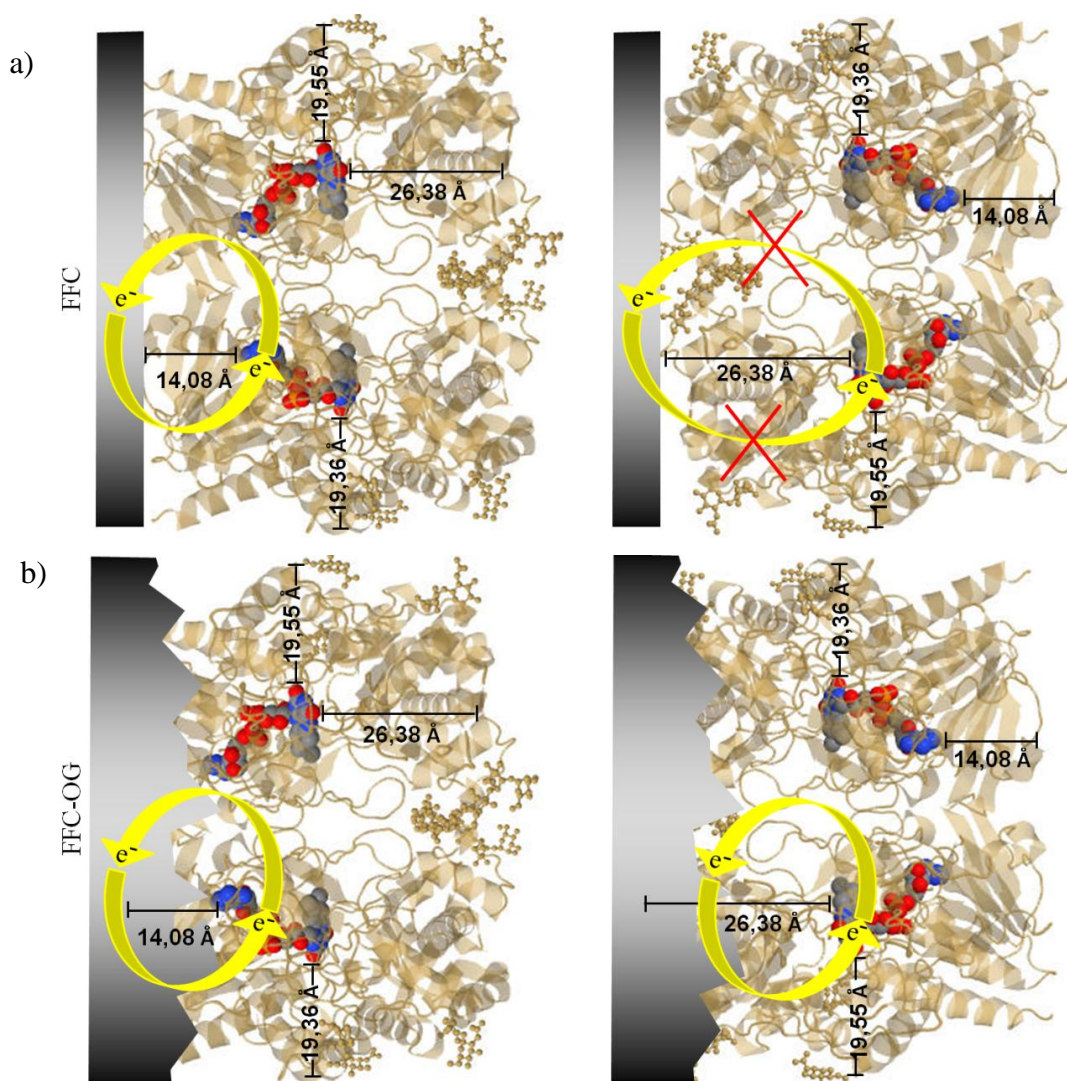


Figura 34 – Esquema representativo das possíveis orientações de adsorção da enzima (a) na superfície da FFC e (b) FFC-OG. As bolas coloridas representam o FAD. Distâncias calculadas utilizando-se o software Jmol Versão 12.2.15.

4.8 Bioeletrocatalise para Oxidação da Glicose

A aplicabilidade do bioeletrodo FFC-OG-GOx como bioânodo de BCs foi investigada por meio de testes eletroquímicos na presença de glicose. A figura 35 mostra as curvas de polarização ($j \times E$) na escala de potencial compreendida entre -0,8 a 0,0 V em diferentes concentrações de glicose. Nessa figura, observa-se que o aumento na concentração de glicose promove o aumento na corrente de oxidação. Para potenciais mais negativos, entre -0,8 e -0,4 V, a variação de corrente de oxidação é mais pronunciada. Por outro lado, para potenciais entre -0,4 e -0,2 V, a variação na corrente de oxidação diminui, indicando que essa região corresponde ao estado quase-estacionário de corrente (I_{es}). Segundo o gráfico, a reação na ausência de glicose apresenta um potencial inicial de oxidação do FAD de -0,54 V. Entretanto, na presença de 4 mmol L⁻¹ de glicose esse potencial é deslocado para -0,74 V. Além disso, a corrente de eletro-oxidação do FAD em 0 V é de 22 $\mu\text{A cm}^{-1}$ na ausência de glicose, e de 26 $\mu\text{A cm}^{-2}$ na presença de 4 mmol L⁻¹. Esses comportamentos indicam que o bioeletrodo oxida baixas concentrações de glicose.

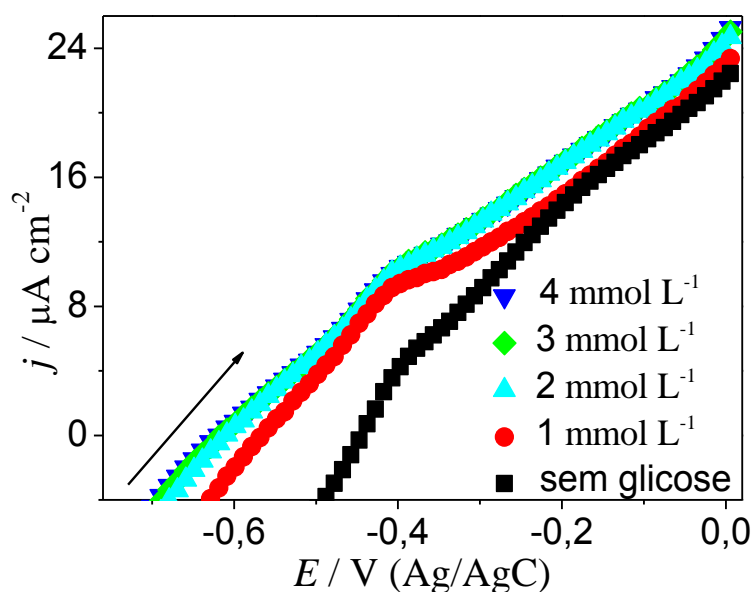


Figura 35 – Curvas de polarização para o bioânodo FFC-OG-GOx na ausência de glicose (■) e na presença de diferentes concentrações de glicose: 1 (●), 2 (▲), 3 (◆), 4 (▼) mmol L⁻¹. Eletrólito: tampão fosfato de sódio pH 7,2. Velocidade de 10 mV s⁻¹.

Segundo Lesovac e coautores [121], o mecanismo proposto para a reação entre a glicose e a glicose oxidase ocorre por abstração de hidretos. O mecanismo de abstração de hidreto é descrito como a remoção de um próton do grupo hidroxil do carbono 1 (C_1) da glicose por um grupo básico da enzima GOx. A transferência do hidreto ocorre do C_1 da glicose para o nitrogênio 5 do FAD [122], conforme proposto pelo autor no esquema da figura 36. Nessa reação a molécula de água contida na forma oxidada da enzima (FAD) é substituída pela glicose simultaneamente. Em seguida, ocorre a transferência de um próton para o resíduo da histidina 516 (His) e a transferência de um ânion hidreto para o FAD. Finalmente a lactona é substituída pela água, levando a formação da forma $FADH^-$. [123-125]

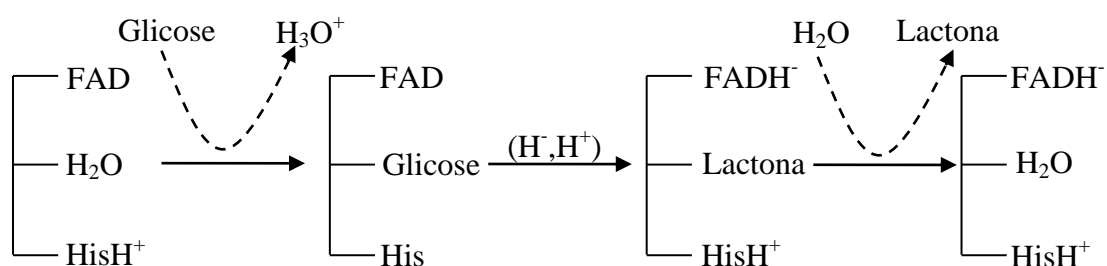


Figura 36 – Representação esquemática reproduzida da referência [122] para o processo de abstração de hidreto na reação entre a glicose e a glicose oxidase.

Para entender melhor o desempenho eletrocatalítico da enzima imobilizada, realizaram-se experimentos de cronoamperometria. Baseado nos estudos de curva de polarização aplicou-se -0,3 V durante 400 segundos. Esse potencial foi escolhido, pois, é nele onde se atinge a corrente de estado quase-estacionário para a oxidação de glicose. Nesse sentido, a figura 37 mostra o cronoamperograma para o bioânodo FFC-OG-GOx na presença de sucessivas adições de glicose. Cada seta indicada na figura corresponde

a uma adição de 100 μL de glicose na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ durante 400 segundos. O tempo necessário para atingir a corrente de estado quase-estacionário logo após a adição é de 8s, indicando uma rápida resposta [126]. Esse tempo de resposta é inferior a outros observados na literatura [127, 128]. O aumento na concentração de glicose promove rapidamente o aumento na corrente de oxidação e atinge o nível de saturação em elevadas concentrações, como esperado pelo comportamento de Michaelis-Menten [129]. Esse comportamento indica que a glicose é facilmente oxidada em baixas concentrações para o bioânodo FFC-OG-GOx. A rápida resposta pode estar atribuída à facilidade de difusão da glicose no biofilme de GOx e náfon formada na superfície da fibra de carbono. [130]

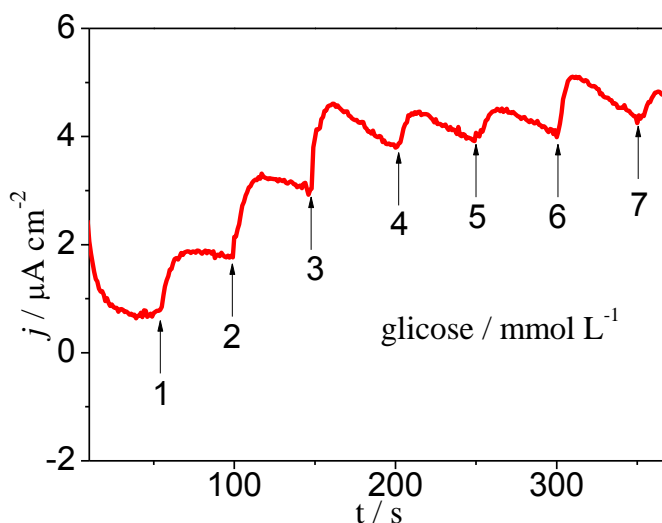


Figura 37 – Resposta cronoamperométrica do bioânodo FFC-OG-GOx na presença de sucessivas adições de 100 μL de glicose a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito: tampão fosfato de sódio pH 7,2, desoxigenado. Potencial aplicado de $-0,3 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$.

Outro fator importante que pode ser obtido por meio desses estudos é a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}). [129] Muitas enzimas exibem um comportamento hiperbólico da velocidade inicial da reação (V_0) em função da concentração inicial do substrato $[S]_0$ (equação 19), segundo o comportamento de Michaelis-Menten. O K_M^{app} mede a afinidade entre a enzima e o substrato. Valores pequenos de K_M refletem afinidade elevada da enzima pelo substrato e, portanto, atingirá a máxima eficiência catalítica em

baixas concentrações de substrato. Por outro lado, grandes valores de K_M refletem baixa afinidade da enzima pelo substrato. Nesse sentido, a partir da figura 38 (a), que corresponde ao gráfico da densidade de corrente de estado quase-estacionário em função da concentração de glicose, é possível modelar o comportamento catalítico segundo Michaelis-Menten. Nesse gráfico, observa-se que há uma região linear até a terceira adição de glicose (3 mmol L⁻¹), que está representada pela linha reta. No entanto, para concentrações acima de 3 mmol L⁻¹, a enzima atinge o seu estado de saturação.

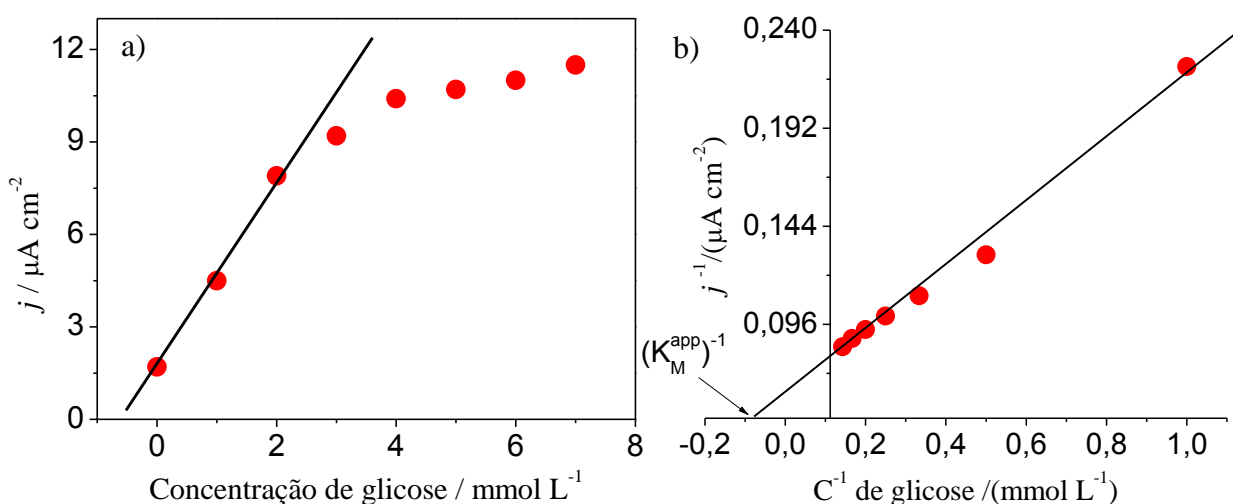


Figura 38 – (a) Gráfico de Michaelis-Menten que correlaciona às densidades de correntes de estado estacionário em função da concentração de glicose e (b) gráfico dos duplos Recíprocos (Lineweaver–Burk).

A partir de tratamentos algébricos da equação 19, obtém-se a equação 20 (Lineweaver–Burk), onde (j_0) é a densidade de corrente inicial e C_0 é a concentração inicial de glicose. Essa equação pode ser representada por um gráfico chamado de gráfico dos duplos recíprocos, (figura 38 b). Esse gráfico possui uma linha reta cuja inclinação $(K_M^{app}/J_{m\acute{a}x})$ apresenta um intercepto de $1/j_{m\acute{a}x}$ no eixo Y e um intercepto de $-1/K_M^{app}$ no eixo X. [129] O baixo valor de K_M^{app} obtido (1,1 mmol L⁻¹) para a GOx, reflete uma elevada afinidade entre a enzima e o substrato.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M^{\text{app}} + [S]}{v_{\text{máx}}[S]} \quad (19)$$

$$\frac{1}{J_{\text{es}}} = \frac{K_M^{\text{app}}}{J_{\text{máx}}C_0} + \frac{1}{J_{\text{máx}}} \quad (20)$$

O valor obtido para a K_M^{app} foi muito menor do que outros valores citados na literatura [130-132] para a transferência direta de elétrons da GOx. A tabela 7 apresenta os valores de K_M^{app} e outros reportados na literatura.

Tabela 7 – Valores reportados de K_M^{app} para diferentes bioeletrodos.

Bioeletrodo	$K_M^{\text{app}}/\text{mmol L}^{-1}$	Ref.
CG-NTC-GOx-náfion	9,8	[130]
CG-Qui-GOx	2,5	[131]
Grafeno-Qui-GOx	4,4	[132]
CG-CdTeNP-NTC-GOx	5,1	[133]
FFC-OG-GOx	1,1	Esse trabalho

CG = carbon grafite, Qui= quitosana, CdTeNP= nanopartículas de CdTe, NTC= nanotubos de carbono

Contudo, todos esses resultados mostram-se promissores para aplicação do bioanodo FFC-OG-GOx em biodispositivos para geração de energia.

5.0 CONCLUSÃO

A esfoliação química com a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KMnO}_4$ realizada nas FFC promoveu a formação *in situ* de óxido de grafeno e de bordas de grafite, conforme visto nas imagens de MEV-FEG.

A presença de grupos hidrofílicos no óxido de grafeno foi confirmada por meio das espectroscopias FTIR, Raman, raios-X e EDX.

A GOx foi imobilizada com sucesso conforme as respostas redox apresentadas. O potencial redox do bioeletrodo FFC-GOx foi de -0,43 V, diferentemente do potencial do bioeletrodo FFC-OG-GOx, que foi de -0,5 V *versus* Ag/AgCl.

A constante heterogênea de transferência de elétrons foi duas vezes maior para o bioeletrodo FFC-OG-GOx, conforme calculado pela teoria de Marcus. As curvas simuladas através da teoria de Marcus obteve um comportamento aproximado ao experimental quando se empregou o valor da energia de reorganização de 0,38 eV.

Testes de cronoamperometria e curva de polarização na presença de diferentes concentrações de glicose mostraram um aumento nas correntes de oxidação de glicose. O valor obtido de K_M^{app} foi de 1,1 mmol L⁻¹. O baixo valor de K_M^{app} revela um rápido mecanismo de oxidação de glicose. Todos esses resultados mostraram-se promissores para a aplicabilidade do bioânodo FFC-OG-GOx em BCs de glicose.

6.0 REFERÊNCIAS

- [1] M. Piccolino. Trends Neurosci. 1997, 20, 443–448.
- [2] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong. Chem. Rev. 2008, 108, 2439–2442.
- [3] Y. Tokita, T. Nakagawa, H. Sakai, T. Hatazawa. SONY's biofuel cell. 213 th ECS Meeting, Abstract n° 258, The Electrochemical Society. EUA, Arizona, 2008.
- [4] M. Winter, R. J. Brodd, Chem. Rev. 104, 4245 (2004).
- [5] M. C. Potter, Proc. R. Soc. London Ser. B 1911, 84, 260–263.
- [6] R Bentley, Glucose oxidase. In The Enzymes, Vol. 7, eds P. D. Boyer, H. Lardy & K. Myrback. Academic Press, London, pp. 567-86. 1963.
- [7] R. C. Bean, W. Z. Hassid. J. Biol. Chem. 1956, 218, 425-36.
- [8] R. C Bean, G. G. Porter, B. Murray. J. Biol. Chem. 236, 1235-1240.
- [9] A. I. Schepartz, M. H. Subers. Biophys, Acta, 1964, 85, 228-37.
- [10] J. H. Dowling, H. B. Levine. J. Bacterial. 1956, 72, 555-560.
- [11] J. Wang. Chem. Rev. 2008, 108, 814-825.
- [12] K. Wanga, H. Yang, L. Zhu, J. Liao, T. Lu, W. Xing, S. Xing, Q. Lv. J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2009, 58, 194–198.
- [13] C. E. Coulthard, , R. Michaelis, W. F. Short, G. E. H. Skrimshire, A. F. B. Standfast, J. H. Birkinshaw, H. Raistrick. Biochem. J. 1945, 39, 24-36.
- [14] D. Keilin, E. F. Hartree. Biochem. 1952, 50, 331-341.
- [15] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, L. Ananthanarayan. Biotechnol. Adv. 2009, 27, 489–501
- [16] S. Witt, G. Wohlfahrt, D. Schomburg, H.-J. Hecht, H. M. Kalisz. Biochem. J. (2000) 347, 553-559.

- [17] H. M. Kalisz, H. J. Hecht, D. Schomburg, R. D. Schmid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 2, 138–142.
- [18] K. O. Eriksson, I. Kourteva, K. Yao, J. L. Liao, F. Kilar, S. Hjerten. *J. Chromatogr.* 1987, 397, 239–249.
- [19] C. Clark Jr., C. Lyons, *Ann. NY Acad. Sci.* 1962, 102, 29-45.
- [20] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier. *Biotechnol. Adv.* 2012, 30, 489–511.
- [21] O. Fatibello Filho, M. D. Capelato, *Quim. Nova* 1992, 15, 28-31.
- [22] I. Karube, *Em Handbook of Measurement Science*; Sydenham, P. H.; Thom, R., eds.; Wiley: Chichester, 1992.
- [23] S. Andreescu, T. Noguer, V. Magearu, J-L. Marty, *Talanta* 2002, 57, 169-173.
- [24] W. H. J Hogarth, J. C. D. Costa, G. Q. M. Lu, *J. Power Sources* 2005, 142, 223-237.
- [25] G. Liu, Y. Lin, V. Ostafna, J. Wang. *Chem. Commun.* 2005, 27, 3481–3483.
- [26] S. Zhang, N. Wang, Y. Niu, C. Sun. *Sens. Actu. B*, 2005, 109, 367–374.
- [27] A. Kaushik, R. Khan, P. R. Solanki, P. Pandey, J. Alam, S. Ahmad, B.D. Malhotra. *Biosen. Bioelectron.* 2008, 24, 676–683.
- [28] S. Zhao, K. Zhang, Y. Bai, W. Yang, C. Sun. *Bioelectrochem.* 2006, 69, 158–163.
- [29] H. Wu, R. Olier, N. Jaffrezic-Renault, P. Clechet, A. Nyamsi, C. Martelet, *Electrochim. Acta*, 1994, 39, 327–331.
- [30] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, R. S. Ruoff. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 228–240.
- [31] Y. Ayato, N. Matsuda, *Chem. Lett.* 2009, 38, 504–508.
- [32] M. J. Moehlenbrock, S. D. Minteer, *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, 1188–1191.
- [33] S. Kerzenmacher, J. Ducreé, R. Zengerle, F. Von Stetten, *J. Power Sourc.* 2008, 182, 1-4.

- [34] Y. Liu, S. Dong, *Electrochem. Commun.* 2007, 9, 1423–1426.
- [35] K. Stolarczyk, E. Nazaruk, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electrochim. Acta* 2008, 53, 3983–3986.
- [36] F. N. Crespilho, M. E. Ghica, M. Florescu, F. C. Nart, O. N. Oliveira Jr., C. Brett, *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 1665–1669.
- [37] D. H. Fan, J. Y. Sun, K. J. Huang, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2010, 76, 44–47.
- [38] J. Kim, H. Jia, P. Wang. *Biotechnol Adv.* 2006, 24, 296– 308.
- [39] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7, 3773-3784.
- [40] E. Laviron. *J. Electroanal. Chem. Inter. Electrochem.* 1979. 101. 19-28.
- [41] A. L. Eckermann, D. J. Feld, J. A. Shaw, T. J. Meade. *Coord. Chem. Rev.* 2010. 254, 1769-1802.
- [42] C.E.D. Chidsey. *Science*, 1991, 251. 919-922.
- [43] R. S. Farid, C. C. Moser, P. L. Dutton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993, 3, 225-230.
- [44] G.W. Canters, M. van de Kamp, Protein-mediated electron transfer. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992, 2, 859-869.
- [45] L. J. Jeuken, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 2,. 67-76.
- [46] R. A. Marcus. *J.Chem. Phys.* 1956, 24, 966-978.
- [47] M. G. Evans, M. Polanyi. *Trans. Far. Soc.* 1935, 31, 875-894.
- [48] H. Eyring, *Chem. Ver.* 1935, 17, 65-77.
- [49] C. Léger, P. Bertrand. *Chem. Rer. Columbus*, 2008. 108, 2379-2438.
- [50] W. Schmickler, E. Santos, *Interfacial electrochemistry*. 2010, New York: Springer.
- [51] A. K. Geim, K. S. Novoselov. *Nat. Mater.* 2007, 6, 183-191.
- [52] X. L. Li, X.R. Wang, L. Zhang, S.W. Lee, H. Daí. *Science*, 2008, 319,1229-1232.

- [53] M. D. Stoller, S.J. Part, Y.W. Zhu, J.H. An, R.S. Ruoff, *Nano Lett.* 2008, 8, 3498-3501.
- [54] P. Wu, Q. Shao, Y. Hu, J. Jin, Y. Yin, H. Zhang, C. Cai. *Electrochim. Acta*, 2010, 55, 8606–8614.
- [55] M. Pumera. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 4146–4157.
- [56] L. M. Malard, M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus. *Phys. Repor.* 2009, 473, 51-87.
- [57] X. Zuo, S. He, D. Li, C. Peng, Q. Huang, S. Song, C. Fan, *Langmuir*, 2010, 26, 1936-1941.
- [58] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska, L. Niu, *Anal. Chem.* 2009, 81, 2378-2382.
- [59] C.L. Fu, W.S. Yang, X. Chen, D.G. Evans, *Electrochem. Commun.* 2009, 11, 997-1000.
- [60] X. H. Kang, J. Wang, H. Wu, I.A. Aksay, J. Liu, Y.H. Lin, *Biosens. Bioelectron.* 2009, 25, 901-904.
- [61] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsorv. *Science*, 2004, 306, 666-669.
- [62] U. Hofmann, H. R. Ber. *Dtsch. Chem. Ges.* 1939, 72, 754-771.
- [63] R. G. Monatsch. *Chem. Rev.* 1946, 76, 381-417.
- [64] W. Scholz, H. P, Boehm. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 1969, 369, 327-340.
- [65] M. Mermoux, Y. Chabre, A. Rousseau, *Carbon*, 1991, 29, 469-474.
- [66] A. Left, H. He, M. Forster, J. Klinowski. *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 4477-4482.
- [67] T. Szabó, O. Berkesi, P. Forgó, K. Josepovits, Y. Sanakis, D. Petridis, I. Dékány. *Chem. Mater.* 2006, 18, 2740-2749.
- [68] Honotoria-Lucas, C.; Lopex-Peinada, A. J.; Lopex-Gonzalez, J. D.; Rojas Cervantes, M. L; Martin-Aranda, R. M. *Carbon* 1995, 33, 1585-1592.

- [69] Nakajima, T.; Matsuo, A. *Carbon* 1988, 26, 357-361.
- [70] Nakajima, T.; Matsuo, Y. *Carbon* 1994, 32, 469-475.
- [71] Walker, P. L.; Radovic, L. R. *Chemistry and Physics of Carbon*; Dekker: New York.
- [72] Kinoshita, K. *Carbon, Electrochemical and Physicochemical Properties*; John Wiley and Sons: New York, 1988.
- [73] McCreery, R. L. In *Electroanalytical Chemistry*; Bard, A. J., Ed.; Dekker, New York, 1991; Vol 17.
- [74] Leon y Leon, C. A.; Radovic, L. R. In *Chemistry and Physics of Carbon*; Thrower, P. A., Ed.; Dekker: New York, 1994; Vol 24.
- [75] Richard L. McCreery. *Chem. Rev.* 2008, 108, 2646–2687.
- [76] Luz R. A. S, Iost RM, Crespilho FN. Nanomaterials for biosensors and implantable biodevices. In: Crespilho FN, editor. *Nanobioelectrochemistry. From implantable biosensors to green power generation*. Dordrecht, Germany: Springer; 2013.
- [77] F. C. Sales, R. M. Iost, M. V. Martins, M. C. Almeida and F. N. Crespilho, *Lab Chip*, 2013, 13, 468–474.
- [78] S. Niyogi, E. Bekyarova, M. E. Itkis, J. L. McWilliams, M. A. Hamon, R. C. Haddon. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 7720-7721.
- [79] N. I. Kovtyukhova, P. J. Ollivier, B. R. Martin, T. E. Mallouk, S. A. Chizhik, E. V. Buzaneva, A. D. Gorchinskiy. *Chem. Mater.* 1999, 11, 771-778.
- [80] R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, 1956, 24, 966–978.
- [81] R. A. Marcus, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1964, 15, 155–196.
- [82] R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 811, 265–322.
- [83] Heering, H.A., J. Hirst, and F.A. Armstrong. *J. Phys. Chem. B*, 1998. 102, 6889-6902.

- [84] Luz R. A. S. Influência de Nanopartículas de Ouro na Transferência Heterogênea de Elétrons do Citocromo c Imobilizado em Eletrodos de Ouro. 2014, Tese de Doutorado. Universidade Federal do ABC- Santo André-São Paulo.
- [85] M. V. A. Martins, A. R. Pereira, R. A. S. Luz, R. M. Iost, F. N. Crespilho. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 17426-17436.
- [86] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, Saunders Golden Sunburst Series, Brooks Cole, 2000.
- [87] M. A. Montes-Morán, D. Suárez, J. A. Menéndez, E. Fuentes. *Carbon* 2004, 42,1219-1225.
- [88] A. Dandekar, R. T. K. Baker, M. A. Vannice. *Carbon* 1998, 36, 1821–1831.
- [89] J. A. Dean, *Analytical Chemistry Handbook*, p. 5,60-5,62. Nova York: McGraw-Hill, 1995.
- [90] J. A. Dean, *Analytical Chemistry Handbook*, p. 5,63-5,69. Nova York: McGraw-Hill, 1995.
- [91] Z. Ötvös, G. Onyestyák, A. Hance, I. Kiricsi, L. V. C. Rees, *Carbon* 2006, 44, 1665–1672.
- [92] M. Zhou, Y. Zhai, S. Dong. *Anal. Chem.* 2009, 81, 5603-5613.
- [93] Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R.; Jorio, A. *Phys. Rep.* 2005, 409, 47.
- [94] S. S. Tzeng, *Carbon* 2006, 44, 1986–1993.
- [95] F. C. Tai, C. Wei, S. H. Chang, W. S. Chend. *J. Raman Spectrosc.* 2010, 41, 933–937.
- [96] Z. Ni, Y. Wang, T. Yu, Z. Shen. *Nano Res.* 2008, 1, 273- 291.
- [97] Ferrari, A. C.; Robertson, J. *Phys. ReV. B* 2000, 61, 14095.
- [98] F. Tuinstra, J. L. Koenig. *J. Chem. Phys.* 1970, 53, 1126–1130.
- [99] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner. *Science*, 2003, 299, 1877–1881.

- [100] A. Salimi, E. Sharifi, A. Noorbakhsh, S. Soltanian, *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 3146–3153.
- [101] S. Park, J. An, I. Jung, R. D. Piner, S. J. Na, X. Li, A. Velamakanni, R. S. Ruoff. *Nano Letters*, 2009, 9, 1593.
- [102] Shubin Yang, Xinliang Feng, Long Wang, Kun Tang, Joachim Maier, and Klaus Mullen. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 4795–4799.
- [103] X. Kang, J. Wang, H. Wu, I. A. Aksay, J. Liu, Y. Lin. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25, 901–905.
- [104] Y.-R. Kim, S. Bong, Y.-J. Kang, Y. Yang, R. K. Mahajan, J. S. Kim, H. Kim, *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 25, 2366–2369.
- [105] A. Salimi, E. Sharifi, A. Noorbakhsh, S. Soltanian. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 3146–3153.
- [106] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner. *Science* 2003, 299, 1877–1881.
- [107] Y. J. Zhang, Y. F. Shen, D. X. Han, Z. J. Wang, J. X. Song, F. Li, L. Niu. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 23, 438–443.
- [108] Zhao, S., Zhang, K., Bai, Y., Yang, W., Sun, C. *Bioelectrochemistry* 2006, 69, 158–163.
- [109] Jia, N., Liu, L., Zhou, Q., Wang, L., Yan, M., Jiang, Z., 2005. *Electrochim. Acta* 51, 611–618.
- [110] Wang, G., Thai, N.M., Yau, S.T., 2006. *Electrochem. Commun.* 8, 987–992.
- [111] C. Cai, J. Chen. *Analytical Biochemistry*. 332, 2004, 75–83.
- [112] Ivnitski, D.; Branch, B.; Atanassov, P.; Apblett, C. *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 1204–1210.
- [113] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, Wiley, New York, 2001.
- [114] Tender, L., M.T. Carter, and R.W. Murray, *Anal. Chem.* 1994. 66, 3173–3181.

- [115] Yagati, A. K., T. Lee, J. Min, J.-W. Choi *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 92, 161–167.
- [116] Luo, X., A. J. Killard, M. R. Smyth. *Electroanal.* 2006, 18, 1131–1134.
- [117] S. Alwarappan, S. R Singh, S. Pillai, A. Kumar, S. Mohapatra. *Anal. Let.* 2012, 45, 746–753.
- [118] K. Weber, S. E. Creager, *Anal. Chem.* 1994, 66, 3164–3172.
- [119] M. T. Carter, G. K. Rowe, J. N. Richardson, L. M. Tender, Terrill, R. H.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 2896–2899.
- [120] S. Demin, E. A. H. Hall, *Bioelectrochem.* 2009, 76, 19–27.
- [121] V. Leskovac, Trivic S, Wohlfahrt G, Kandrac J, Pericin D. *Int J Biochem.* 2005, 37, 731–750.
- [122] Bright, H. J., & Appleby, M. J. *Biol. Chem.* 1969, 244, 3625–3634.
- [123] Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D., & Schomburg, D. J. *Mol. Biol.* 1993, 229, 153–172.
- [124] Gibson, Q. H., Swoboda, B. E. P., & Massey, V. J. *Biol. Chem.* 1964, 239, 3927–3934.
- [125] Walpole, C. S. J., Wrigglesworth, R. In M. I. Page & A. Williams (Eds.), *Oxidoreductase-flavoenzymes. Enzyme Mechanisms.*, London: Royal Society of Chemistry. 1987, 506–522
- [126] J.-M. You, S. Jeon, *Electroanalysis* 2011, 23, 2103 – 2108.
- [127] B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3170–3174.
- [128] W. Z. Jia, K. Wang, Z. J. Zhu, H. J. Song, X. H. Xia. *Langmuir.* 2007, 23, 11896–11900.
- [129] D. L. Nelson, M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3th, New York, EUA, 2000.
- [130] M. M. Rahman, A. Umar, K. Sawada. *Sens. Actuators B.* 2009, 137, 327–333.

- [131] Q. Sheng, K. Luo, L. Li, J. Zheng. *Bioelectrochemistry*, 2009, 74, 246-253.
- [132] X. Kang, J. Wang, H. Wu, I. A. Aksay, J. Liu, Y. Lin. *Biosen Bioelectron.* 2009, 25, 901-905.
- [133] Q. Liu, X. Lu, J. Li, X. Yao, J. Li. *Biosen. Bioelectron.* 2007, 22, 3203-3209.

7.0 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO (2011-2015)

7.1 Participação em congressos e eventos científicos

1. Apresentação de Poster no III Workshop do Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica-INEO.(Encontro) *Electrochemical cell carcinogen HEP-G2 and HTC scanning electrochemical microscopy (SECM)*. Nazaré Paulista- SP, 2011.
2. Apresentação Oral no XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. (Simpósio) *Nanoestruturas de óxi-hidróxidos de ferro (III) estabilizada em matriz polimérica para aplicação em cátodos biomiméticos de biocélulas a combustível*. Bento Gonçalves – RS, 2011.
3. Apresentação de pôster no XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica. (Congresso) *Enzima artificial baseada em nanopartículas de óxido-hidróxidos de ferro para aplicação em biocátodos miméticos de biocélulas a combustível*. Fortaleza-Ce, 2012.
4. Apresentação de pôster na II Conferência USP. *Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase in the Presence Graphene Sheet exfoliated from Carbon Fiber*. Itirapina-SP, 2012.
5. Apresentação de pôster no 64º Encontro Anual da Sociedade Internacional de Eletroquímica. *Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase in the Presence Graphene Sheet exfoliated from Carbon Fiber*. Santiago de Querétaro, México.2013.

7.2 Resumos publicados em Anais de Congressos no período de trabalho

1. Pereira, A. R., Iost, R. M., Martins, M. V. A., Nantes, I. L., Crespilho, F. N. *Caracterização de nanopartículas de paládio estabilizadas pela enzima glicose oxidase*.

XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Bento Gonçalves-RS, 2011.

2. Barreto, G. R., Martins, M. V. A., Crespilho, F. N. *Eletroquímica de nanopartículas de ouro imobilizadas em magnetita*. XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Bento Gonçalves-RS, 2011.

3. Martins, M. V. A., da Silva, W. C., Crespilho, F. N. *Nanoestruturas de óxi-hidróxidos de ferro (III) estabilizadas em matriz polimérica para aplicação em cátodos biomiméticos de biocélulas a combustível*. XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Bento Gonçalves-RS, 2011.

4. Martins, M. V. A., Palermo, J M, Oliveira, K T, Crespilho, F. N. *TMPyP(4Me)I4 E ZnTMPyP(4Me)Cl4: Síntese e caracterização espectroscópica e eletroquímica em meio fisiológico*. XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Bento Gonçalves-RS, 2011.

5. Iost, R M, Oliveira, G. M., Martins, M. V. A., Kim, J. H., Jong-Sung, Crespilho, F. N. *Estudo biocatalítico da enzima glicose oxidase em eletrodos modificados com nanocápsulas de carbono e a enzima glicose oxidase*. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis-SC, 2011,.

6. Coelho, A G., Silva, A T B, Silva, W. C., Crespilho, F. N., Martins, M. V. A., Merkoçi, A. *Investigação microscópica das nanopartículas de Ouro dispersas em quitosana*. 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis-SC, 2011.

7. Martins, M. V. A., da Silva, W. C., Crespilho, F. N. *Enzima artificial baseada em nanopartículas de óxido-hidróxidos de ferro para aplicação em biocátodos miméticos de biocélulas a combustível*. XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica. Fortaleza-Ce, 2012.

8. Pereira, A. R., Iost, R. M., Martins, M. V. A., Nantes, I. L., Crespilho, F. N. *Estudo da interação molecular entre nanopartículas de paládio e a enzima glicose oxidase*. XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica. Fortaleza-Ce, 2012.
9. Martins, M. V. A.; Crespilho, F. N. *Síntese e Caracterização de nanopartículas de ouro para a aplicação em bioeletrodos*. In: *III Workshop da Rede Nanobiomed*, 2012, Luís Correia-Pi.
10. Martins, M. V. A.; Crespilho, F. N. *Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase in the Presence Graphene Sheet exfoliated from Carbon Fiber*. Santiago de Querétaro, México. 2013.

7.3 Artigos publicados em periódicos

7.3.1 Publicação da Tese

Martins, M. V. A., Pereira, A. R., Luz, R. A. S., Iost, R. M., Crespilho, F. N., *Evidence of short-range electron transfer of a redox on graphene oxide electrodes*. Phys. Chem. Chem. Phys. 2014, 16, 17426-17436.

7.3.2 Outras publicações obtidas no período da Tese

- 1- Olyveira, Gabriel M., Kim, Jung Ho, Martins, M. V. A., Iost, Rodrigo M., Chaudhari, Kiran N., Yu, Jong-Sung, Crespilho, Frank N. *Flexible Carbon Cloth Electrode Modified by Hollow Core-Mesoporous Shell Carbon as a Novel Efficient Bio-Anode for Biofuel Cell*. J. Nanosci. Nanotechnol. 2012, 12,356 - 360.
- 2 - Mugnol, Katia C. U., Martins, M. V. A., Nascimento, Edvaldo C., Nascimento, Otaciro R., Crespilho, Frank N., Arantes, Jeverson T., Nantes, Iseli L. *Interaction of Fe³⁺-meso-tetrakis (2,6-dichloro-3-sulfonatophenyl) porphyrin with cationic bilayers: magnetic switching of the porphyrin and magnetic induction at the interface*. Theoretical Chemistry Accounts. 2011, 130, 829 - 837.
- 3 - Pereira, Andressa R., Iost, Rodrigo M., Martins, M. V. A., Yokomizo, Cesar H., da Silva, Welter C., Nantes, Iseli L., Crespilho, Frank N. *Molecular interactions and*

structure of a supramolecular arrangement of glucose oxidase and palladium nanoparticles. PCCP. Physical Chemistry Chemical Physics 2011, 13, 12155-12162.

4 - de Sousa Luz, Roberto A., Martins, M. V. A., Magalhães, Janildo L., Siqueira, José R., Zucolotto, Valtencir, Oliveira, Osvaldo N., Crespilho, Frank N., da Silva, Welter Cantanhêde. *Supramolecular architectures in layer-by-layer films of single-walled carbon nanotubes, chitosan and cobalt (II) phthalocyanine*. *Materials Chemistry and Physics*. , 2011, 130, 1072-1077.

5 – V. Marangoni, Martins, M. V. A., Zucolotto, Valtencir, Oliveira, Osvaldo N., J A Souza, Crespilho, Frank Nelson. *The processing of polyelectrolyte-covered magnetite nanoparticles in the form of nanostructured thin films*. J. Nanopart. Res. 2012, 14, 769.

6 - Ferreira, F. C. P, Rodrigo M Iost , Martins, M. V. A., Maria C Almeida and Frank Nelson Crespilho. *An Intravenous Implantable Glucose/Dioxygen Biofuel Cell with Modified Flexible Carbon Fiber Electrodes*. Lab. Chip. 2012, 13, 468-474.

7 – Liang, R. N.; Gonçalves, W. D. ; Martins, M. V. A.; Crespilho, Frank Nelson . *Filtros Digitais por Transformadas de Fourier Aplicados em Eletroquímica*. Quím. Nova, 2013, 36, 165.

8 – Silva, A. T. B.; Coelho, A. G.; Lopes, L. C. S.; Martins, M. V. A.; Crespilho, F. N.; Silva, W. C.; *Nano-assembled Supramolecular Films from Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles and Cobalt (II) Phthalocyanine*. J. Braz. Chem. Soc. 2013. 24. 1237-1245.

9 – Rodrigo M Iost, Ferreira, F. C. P, Martins, M. V. A., Maria C Almeida and Frank Nelson Crespilho. *Glucose Biochip based on Flexible Carbon Fiber Electrodes: In Vivo Diabetes Evaluation in Rats*. Chem. Electro. Chem. 2015, Aceito para publicação.

7.4 Prêmios

1. Martins, M.V.A. Crespilho, F. N. Direct Electron Transfer from immobilized Glucose Oxidase on Graphene-Flexible Carbon Fiber. XIX-SIBEE, Melhor pôster em Bioeletroquímica. Campos do Jordão-SP, 2013.

2. 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.

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* (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.

4. 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.