



Universidade Federal da Bahia - Escola Politécnica
Programa de pós-graduação em Engenharia Química

**“DESENVOLVIMENTO DE BIOÂNODOS PARA OXIDAÇÃO DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COM POTENCIAL PARA
APLICAÇÃO EM BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL”**

GALA ROSALES MUÑOZ

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.

ORIENTADO POR:

JAIME SOARES BOAVENTURA FILHO

CO-ORIENTADO POR:

SILVANA MATTEDI E SILVA

VALÉRIA CRISTINA FERNANDES

*Hoy se concluye una etapa, no es una puerta
que se cierra, es una página que se pasa, mil
puertas que se abren.*

*Y no fue un camino simple, la vida puede ser
simple pero la ciencia no lo es, es trabajosa, es
para valientes.*

*Quise renunciar tantas veces, creí que no lo iba a
lograr más.*

*Pero cuando iba a caer alguien su mano extendía
y yo proseguía.*

*Hoy se concluye esta etapa, gracias doy a Dios
por el camino, por las manos extendidas, por la
creatividad, por las ideas y por los amigos y
familia.*

AGRADEÇO...

A mim mesma pela coragem de terminar;

A meus orientadores pelas discussões e orientações oferecidas;

Às amigas de iniciação científica que me auxiliaram tanto;

Aos amigos e colegas que me fizeram rir e desestressar tanto para poder continuar;

A minha família, João Paulo e Ana Sophia que são uma grande riqueza conquistada nesta longa jornada;

A minhas grandes amigas e confidentes, família adotiva que este belo país me presenteou;

E a minha linda família de origem, Colômbia pátria querida, que me acompanhou na distância e na proximidade para que este projeto fosse realidade. Obrigada mi mami Teresa e mi prima Catalina por seu apoio e por representar em peso à família colombiana;

OBRIGADA SENHOR!!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVOS	20
GERAL.....	20
Específicos.....	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL	21
BIOELETRODOS	25
CATALASE.....	26
IMOBILIZAÇÃO	29
LÍQUIDOS IÔNICOS	36
METODOLOGIA.....	46
Reagentes	46
Síntese dos líquidos iônicos	46
Caracterização e propriedades dos líquidos iônicos sintetizados	48
CONSTRUÇÃO DOS BIOELETRODOS	49
Desenvolvimento do bioeletrodo pelas técnicas layer by layer (LBL) e deposição eletroquímica.....	49
Desenvolvimento do bioeletrodo pela técnica de entrecruzamento de enzimas agregadas (CLEA).....	52
RESULTADOS	60
Síntese e caracterização dos líquidos iônicos próticos estudados	60

Acetato de Pentaetilenohexamônio.....	61
Líquidos Iônicos da Série do Cátion N-metil-2hidroxi-etilamônio	68
Construção do bioeletrodo.....	73
Desenvolvimento do bioeletrodo pelas técnicas layer by layer (LBL) e deposição eletroquímica.....	74
Desenvolvimento do bioeletrodo pela técnica de entrecruzamento de enzimas agregadas (CLEA)	84
Atividade e solubilidade da catalase nos líquidos iônicos	84
Síntese e caracterização dos CLEAs	93
CONCLUSÕES	135
TRABALHOS FUTUROS	137
REFERÊNCIAS	138
APÊNDICE	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transferência eletrônica usados na tecnologia de biocélulas a combustível: a) DET transferência eletrônica direta e b) MET transferência eletrônica auxiliada por uma espécie mediadora redox. Adaptado de Moehlenbrock e Minteer (2008).....	22
Figura 2. Desenho típico de um eletrodo modificado com enzima. Adaptado de Putzbach e Ronkainen (2013).....	25
Figura 3. Estruturas das três classes de catalases presentes na natureza. <i>Esquerda:</i> catalase da classe 1, <i>centro:</i> catalase da classe 2, <i>direita:</i> catalase da classe 3. <i>Ilustração obtida de</i> Goodsell (2004).	26
Figura 4. Esquema da construção de um bioeletrodo por interação layer by layer. 1 e 3 representam os passos de adsorção do poliânion e o policátion, respectivamente. Os passos 2 e 4 são etapas de lavagem. Adaptado de Iost e Crespilho (2012).	31
Figura 5. Esquema geral para preparação de CLEAs. Modificado de Sheldon (2011)..	32
Figura 6. Reações base de Schiff (1) e tipo Michael (2) do glutaraldeído com as proteínas (Mingeault <i>et al.</i> , 2004).	33
Figura 7. Da esquerda para a direita: cátions de alquil-amônios, fosfônios, di-alquil-imidazólios e N-alquil-piridínios. Extraído de Ghandi (2014).	38
Figura 8. Propriedades dos LI, as técnicas eletroquímicas disponíveis e suas aplicações eletroquímicas. Modificado de Shiddiky e Torriero (2011).	38
Figura 9. Estratégias para solubilização de proteínas em líquidos iônicos. (PEG: polietileno glicol). Modificado de Armand <i>et al.</i> (2009).	42
Figura 10. Série de Hofmeister e classificação dos íons entre cosmotrópicos e caotrópicos. Modificado de Yang (2009).	44
Figura 11. Sistema reacional dos líquidos iônicos sintetizados nesse trabalho	47
Figura 12. Célula eletroquímica utilizada.....	49
Figura 13. Eletrodo de titânio modificado.....	50
Figura 14. Esquema do processo de construção do bioeletrodo depositando catalase e [PEHA][Ac] na superfície de carbono vítreo pelas técnicas layer by layer e deposição eletroquímica. Baseada em Saadati <i>et al.</i> (2012).....	52

Figura 15. Sistema eletroquímico usado na caracterização dos bioeletrodos CLEA. Eletrodo de trabalho (material catalítico introduzido no eletrodo oco), eletrodo de referência (fio de prata) e contra eletrodo (placa de platina).....	58
Figura 16. Eletrodo oco da Metrohm com diâmetro interno de 5 mm. Referência: RDE.BLANK 80415.	58
Figura 17. Esquema da reação do acetato de pentaetilenohexamônio, [PEHA][Ac]	61
Figura 18. Esquema da reação dos líquidos iônicos da série do [m-2HEA ⁺].	61
Figura 19. FTIR do acetato de pentaetilenohexamônio e seus precursores. A) espectro do ácido acético, B) espectro da pentaetilenohexamina e C) espectro do [PEHA][Ac].	62
Figura 20. Curva de análise termogravimétrica do [PEHA][Ac] em atmosfera inerte. .	63
Figura 21. Curva de DSC para [PEHA][Ac] com aquecimento seguida de resfriamento	64
Figura 22. DSC dos precursores do [PEHA][Ac] (Curva azul: pentaetilenohexamina; Curva vermelha: ácido acético)	64
Figura 23. Efeito da temperatura na condutividade de misturas binárias [PEHA][Ac]/água (% em massa de LI)	65
Figura 24. Efeito da temperatura na viscosidade de misturas binárias [PEHA][Ac]/água (% em massa de LI)	66
Figura 25. Walden plot para as diferentes composições de [PEHA][Ac] em água (% em massa de LI).....	67
Figura 26. Espectro FTIR para o [m-2HEA][Ac].	69
Figura 27. Influência do ânion na condutividade dos líquidos iônicos da série [m-2HEA ⁺] (~95% em massa de LI) A) Condutividade representada seguindo um modelo de Arrhenius, logσ vs. 1000/T; B) condutividade vs. T.	69
Figura 28. Efeito da temperatura na viscosidade de misturas binárias [m-2HEA][Pr]/água (% em massa de LI)	70
Figura 29. Efeito da composição mássica na viscosidade das misturas binárias [m-2HEA][Pr]/água (% em massa de LI).....	71
Figura 30. Influência do ânion na viscosidade para os líquidos com o cátion [m-2HEA ⁺] (% em massa de LI)	72
Figura 31. Walden plot para os líquidos iônicos da série do cátion [m-2HEA ⁺]	73
Figura 32. Voltamogramas cíclicos da eletro-oxidação do [PEHA][Ac] na superfície de carbono vítreo, em tampão fosfato (pH = 7,0). ν = 100 mV s ⁻¹ . Os círculos azuis mostram a localização dos picos pouco definidos.	75

Figura 33. Curvas de crescimento das camadas de catalase na superfície do substrato. (a) Resposta voltamétrica do eletrodo de carbono vítreo (CV) e (b-f) 1º a 5º ciclos de deposição de catalase em CV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	77
Figura 34. Comparação dos voltamogramas cíclicos (VC) do (a) eletrodo CV e (b) do eletrodo modificado CV/([PEHA][Ac]c/CAT) ₅ , ambos em tampão fosfato (pH = 7,0). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	78
Figura 35. VC comparativos de a) ECV, b) eletrodo modificado CV/CAT, c) eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac] e d) eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT, todos os VCs conduzidos em tampão fosfato (pH 7) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	79
Figura 36. VCs do eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT na ausência e presença de H ₂ O ₂ em diferentes concentrações, desde o interno ao externo: 0,0, 0,2, 0,4, 0,9 e 1,1 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato (pH 7,0) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	80
Figura 37. VCs do eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac] na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ : a) 0 b) 0,9 e c) 1,1 mmol L ⁻¹ (todos obtidos em tampão fosfato (pH 7,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).	81
Figura 38. VCs para o eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT a diferentes velocidades de varredura, desde o interno ao externo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s ⁻¹ em tampão fosfato pH 7,0. Inset: gráfico da corrente de pico catódico $E_p = -0,46 \text{ V}$ vs. Velocidade de varredura.	82
Figura 39. 1º (a) e 250º (b) voltamograma registrado para o eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT em tampão fosfato (pH 7,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	83
Figura 40. Espectro UV-Vis para os líquidos iônicos da série [m-2HEA ⁺] (razão de diluição em tampão fosfato 1:29 (v/v)) (A linha preta corresponde à absorvância em 240 nm).	85
Figura 41. Variação do pH com o aumento da concentração de líquido iônico da série do [m-2HEA ⁺] em uma mistura binária (LI/tampão).	87
Figura 42. Efeito da concentração de [m-2HEA][Ac] na atividade da enzima catalase.	88
Figura 43. Efeito da concentração de [m-2HEA][Pr] na atividade da enzima catalase.	89
Figura 44. Efeito da concentração de [m-2HEA][Bu] na atividade da enzima catalase.	89
Figura 45. Efeito da concentração de [m-2HEA][Pe] na atividade da enzima catalase.	90
Figura 46. Variação da atividade de catalase em função do número de carbonos do ânion e da concentração dos líquidos iônicos. Tendência de atividade da enzima com o aumento da cadeia do ânion é acompanhada pelas linhas de amarração.	92

Figura 47. Espectro infravermelho da catalase “ <i>in natura</i> ”.	94
Figura 48. Estrutura do N-metilacetamida (NMA).	94
Figura 49. Espectro infravermelho da catalase imobilizada (CAT-I) pelo método CLEA.	96
Figura 50. Espectro infravermelho do grafite cru.	96
Figura 51. Espectro infravermelho da catalase imobilizada com grafite (CAT-G) pelo método CLEA.	97
Figura 52. Espectro infravermelho da catalase imobilizada com o líquido iônico [m-2HEA][Ac] (CAT-mA).	98
Figura 53. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-I nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.	99
Figura 54. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-G nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.	99
Figura 55. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-[PEHA][Ac] nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.	100
Figura 56. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-mA nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.	101
Figura 57. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-I na presença de nafion® nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.	102
Figura 58. Ilustração do eletrodo oco preenchido com material catalítico CAT-I.	102
Figura 59. Resposta voltamétrica do eletrodo CAT-I na ausência (linha preta) e na presença de nafion® (linha vermelha). Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.	103
Figura 60. Comparativos de estabilidade do bioeletrodo CAT-I após diversas manipulações em diferentes dias. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.	104
Figura 61. (A) Estudo das velocidades de varredura (voltamogramas interno ao externo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s ⁻¹) para o eletrodo CAT-I no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu\text{A}$) e catódico ($I_{pc}/\mu\text{A}$) vs. velocidade de varredura v (mV s ⁻¹) para: (B) o par de picos redox I e (C) o par de picos redox II.	106
Figura 62. Variação de potencial do pico catódico para o par de picos 2.	107

Figura 63. Estudo a altas velocidades de varredura para o bioeletrodo CAT-I em tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. (voltamogramas interno ao externo: 100 a 3000 mV s ⁻¹)	107
Figura 64. Resposta do bioeletrodo CAT-I por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: A – B) frequência (8 a 150 Hz), A = 0,1 V, ΔE = 2 mV, C – D) amplitude (0,01 a 0,3 V), f = 8 Hz e ΔE = 2 mV, e E – F) incrementos de potencial ΔE (1 a 20 mV), f = 8 Hz e A = 0,1 V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de -0,17 V.	110
Figura 65. Tratamento cinético do bioeletrodo CAT-I em tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; a partir de medidas de voltametria de onda quadrada, f = 8 Hz, A = 100 mV, ΔE = 2 mV. v = 15,6 mV s ⁻¹ : A) na adição sucessiva de aliquotas de 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio, B) Variação da corrente de pico E_{pc} = -0,17 V, em função da concentração de peróxido de hidrogênio e C) Linearização da curva B para a determinação dos parâmetros K_M e I_{max}	111
Figura 66. Voltametria cíclica comparativa dos bioeletrodos CAT-G e CAT-I. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , v = 50 mV s ⁻¹	113
Figura 67. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo CAT-G até 50 scans. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, v = 50 mV s ⁻¹	114
Figura 68. A) Estudo das velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s ⁻¹) para o bioeletrodo CAT-G no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu A$) e catódico ($I_{pc}/\mu A$) para: B) o par de picos redox II e C) o par de picos redox I, vs. velocidade de varredura v (mV s ⁻¹).	115
Figura 69. Voltametrias cíclicas para o bioeletrodo CAT-G a 10 mV s ⁻¹ (curva preta) e a 20 mV s ⁻¹ (curva vermelha) em tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹	116
Figura 70. Resposta do bioeletrodo CAT-G por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: A – B) frequência (Hz), A = 0,1 V, ΔE = 2 mV, C – D) amplitude (V), f = 8 Hz e ΔE = 2 mV, e E – F) incrementos de potencial ΔE (mV), f = 8 Hz e A = 0,1 V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de -0,33 V.	117
Figura 71. Estudo cinético do bioeletrodo CAT-G em tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; a partir de medidas de voltametria de onda quadrada, f = 8 Hz, A = 100 mV, ΔE = 2 mV. v = 15,6 mV s ⁻¹ : A) na adição sucessiva de aliquotas de 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio, B) Variação da corrente de pico E_{pc} = -0,33 V, em função da concentração	

de peróxido de hidrogênio e C) Linearização da curva B para a determinação dos parâmetros K_M e I_{max}	119
Figura 72. Voltametria cíclica comparativa dos bioeletrodos CAT-[PEHA][Ac], CAT-G e CAT-I. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, $v=50$ mV s ⁻¹	121
Figura 73. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] até 120 varreduras. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, $v = 50$ mV s ⁻¹	121
Figura 74. A) Estudo das velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s ⁻¹) para o bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu A$) e catódico ($I_{pc}/\mu A$) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura $v^{1/2}$ (mV s ⁻¹) ^{1/2} para: B) o par de picos redox I e C) o par de picos redox II.	122
Figura 75. Resposta do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: A – B) frequência (8 a 100 Hz), $A = 0,1$ V, $\Delta E = 2$ mV, C – D) amplitude (0,02 a 0,2 mV), $f = 8$ Hz e $\Delta E = 2$ mV, e E – F) incrementos de potencial ΔE (1 a 6 mV), $f = 8$ Hz e $A = 0,1$ V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de -0,40 V.....	124
Figura 76. Estudo cinético do bioeletrodo CAT- [PEHA][Ac] em tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; a partir de medidas de voltametria de onda quadrada, $f= 8$ Hz, $A = 100$ mV, $\Delta E = 2$ mV. $v = 15,6$ mV s ⁻¹ : A) na adição sucessiva de aliquotas de 0,5 μL de peróxido de hidrogênio, B) Variação da corrente de pico $E_{pc} = -0,40$ V, em função da concentração de peróxido de hidrogênio e C) Linearização da curva B para a determinação dos parâmetros K_M e I_{max}	125
Figura 77. Voltametria cíclica comparativa dos bioeletrodos CAT-mA, CAT-[PEHA][Ac], CAT-G e CAT-I. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, $v=50$ mV s ⁻¹ ..	126
Figura 78. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo CAT-mA até 50 varreduras. Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0, $v = 50$ mV s ⁻¹	127
Figura 79. A) Estudo das velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s ⁻¹) para o eletrodo CAT-mA no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. B) Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu A$) e catódico ($I_{pc}/\mu A$) para o par de picos redox 2 vs. velocidade de varredura $v^{1/2}$ (mV s ⁻¹) ^{1/2}	128
Figura 80. Resposta do bioeletrodo CAT-mA por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: A – B) frequência (8 a 150 Hz), $A = 0,1$ V, $\Delta E = 2$ mV, C – D) amplitude (0,02 a 0,3 mV), $f =$	

8 Hz e $\Delta E = 2$ mV, e E – F) incrementos de potencial ΔE (1 a 10 mV), $f = 8$ Hz e $A = 0,1$ V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de -0,40 V.	129
Figura 81. Resposta voltamétrica para o bioeletrodo CAT-mA: A) na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Método: voltametria de onda quadrada em tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , pH 7,0. $A = 0,1$ V, $\Delta E = 1$ mV e $f = 8$ Hz. B) Resposta da corrente em valor absoluto versus concentração de peróxido de hidrogênio.	130
Figura 83. Voltamograma cíclico da eletroxidação do [PEHA][Ac] na superfície de titânio	157
Figura 84. VC comparativos entre o eletrodo modificado com [PEHA][Ac] e antes da modificação. Conduzidos em tampão fosfato pH = 7,0	158
Figura 85. Resposta voltamétrica do eletrodo de titânio (Ti) e 1º, 3º e 5º ciclos de deposição de catalase e [PEHA][Ac] em CV, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50$ mV s ⁻¹	159
Figura 86. Voltamograma cíclico da eletroxidação do [PEHA][Ac] na superfície de titânio modificado com carbono Vulcan.	159
Figura 87. Resposta voltamétrica do eletrodo de titânio modificado (TiC) e 1º a 7º ciclos de deposição de catalase e [PEHA][Ac] em CV, tampão fosfato pH 7,0, $v = 50$ mV s ⁻¹	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos íons entre cosmotrópicos e caotrópicos. Modificado de Yang (2009).	45
Tabela 2. Líquidos iônicos sintetizados nesta tese e suas respectivas nomenclaturas. ..	47
Tabela 3. Estrutura molecular dos líquidos iônicos utilizados nos procedimentos de imobilização.....	60
Tabela 4. Substrato de carbono vítreo e bioeletrodos construídos pelas técnicas de layer by layer e deposição eletroquímica	74
Tabela 5. Testes qualitativos de solubilidade da enzima catalase nos líquidos iônicos da série [m-2HEA ⁺].	86
Tabela 6. Materiais eletrônicos sintetizados e o código utilizado para elas.	93
Tabela 7. Principais parâmetros eletroquímicos e cinéticos obtidos para os quatro bioeletrodos construídos pelo método CLEA.....	131
Tabela 8. Comparação deste trabalho com bioeletrodos de outros autores.	134

RESUMO

As células diretas de etanol (DAFC do inglês *Direct Alcohol Fuel Cell*) são uma alternativa bastante promissora na aplicação de energias renováveis, graças à longa expertise em toda a cadeia produtiva e de distribuição do etanol no Brasil. Mas apesar desta grande vantagem, seu uso ainda se encontra fortemente comprometido devido a reações paralelas indesejáveis que podem levar à inativação total do catalisador de platina. Assim, o objetivo deste trabalho, como contraproposta a esta problemática, foi desenvolver bioânodos baseados na enzima catalase, com potencial para serem aplicados em biocélulas a combustível. A capacidade de transferência eletrônica direta destes bioânodos foi avaliada a partir da adição de substâncias condutoras como líquidos iônicos próticos (LIPs) e grafite; além de serem testadas duas metodologias de imobilização; layer by layer combinada com deposição eletroquímica e entrecruzamento da enzima sem suporte do tipo CLEA (do inglês, *cross-linked enzyme aggregates*). Todos os LIPs utilizados (série do [m-2HEA⁺] e o [PEHA][Ac]) foram caracterizados físico-quimicamente e seu efeito na atividade e solubilidade da catalase foi avaliado. A partir destes resultados uma série de Hofmeister foi construída encontrando que o LIP com ânion acetato é o mais adequado para manter e até melhorar a estabilidade e atividade da enzima. Como resultado do uso das técnicas combinadas de imobilização, foi obtido o bioeletrodo CV/([PEHA][Ac]/CAT)₅ e avaliado eletroquimicamente. A partir do método CLEA, foram construídos quatro bioeletrodos com catalase (CAT-I, CAT-G, CAT-[PEHA][Ac] e CAT-mA). Nestes, avaliou-se a adição de dois LIPs ([m-2HEA][Ac] e [PEHA][Ac]) ancorados ao sistema imobilizado. Igualmente, o efeito do grafite foi avaliado sendo o mesmo ancorado em outro bioeletrodo com catalase. Estes bioeletrodos foram caracterizados física e físico-quimicamente e sua resposta eletroquímica foi avaliada frente ao substrato H₂O₂. Com estes bioeletrodos, parâmetros cinéticos foram obtidos e os mesmos comparados com resultados encontrados na literatura para outros bioeletrodos. Encontrou-se que os LIPs favorecem o processo de transferência eletrônica e o microambiente da enzima. Em geral, apresentaram parâmetros cinéticos melhores quando comparados com líquidos iônicos apróticos e até competitivos com bioeletrodos a base de materiais nanocarbonáceos. Consequentemente, os bioeletrodos a base de catalase e construídos pelas metodologias de imobilização desenvolvidas neste trabalho, se encontraram promissores para aplicação na construção de biocélulas a combustível.

ABSTRACT

Direct Alcohol Fuel Cells (DAFC) are a very promising alternative in the application of renewable energies, with great expertise in the entire ethanol production and distribution chain in Brazil. But despite this great advantage, the use of this technology is still strongly compromised due to undesirable parallel reactions that may lead to the total inactivation of the platinum catalyst. Thus, the objective of this work, as a counterproposal to this problem, was to develop bioanodes based on the catalase enzyme, with potential to be applied in biofuel cells. The direct electron transfer capability of these bioanodes was evaluated by the addition of conductive substances such as protic ionic liquids (PILs) and graphite; besides being tested two methodologies of immobilization; layer by layer combined with electrochemical deposition and cross-linking of the non-supported enzyme called CLEA (cross-linked enzyme aggregates). All the PILs used (series of [m-2HEA +] and [PEHA] [Ac]) were physicochemically characterized and their effect on catalase activity and solubility was evaluated. From these results a series of Hofmeister was constructed finding that the PIL with anion acetate is the most suitable to maintain and even improve the stability and activity of the enzyme. As a result of the use of the combined immobilization techniques, the bioelectrode CV/([PEHA][Ac]/CAT)₅ was obtained and electrochemically evaluated. From the CLEA method, four catalysts were constructed with catalase (CAT-I, CAT-G, CAT-[PEHA][Ac] and CAT-mA). In these, an addition of two PILs ([m-2HEA] [Ac] and [PEHA] [Ac]) anchored to the immobilized system was evaluated. Likewise, the effect of the graphite was evaluated, being the same anchored in another bioelectrode with catalase. These bioelectrodes were characterized physically and physico-chemically and their electrochemical response was evaluated against the H₂O₂ substrate. With these bioelectrodes, kinetic parameters were obtained and compared with results in the literature for other bioelectrodes. It has been found that PILs favor the electronic transfer process and the microenvironment of the enzyme. In general, they presented better kinetic parameters when compared with aprotic ionic liquids and competitive results with bioelectrodes based on nanocarbonaceous materials. Consequently, the bioelectrodes based on catalase and constructed by the immobilization methodologies developed in this work, have found promising for application in the construction of biofuel cells.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o investimento em novas tecnologias mais sustentáveis e amigáveis com o meio ambiente, está em auge. Diversos grupos de pesquisa trabalham no aprimoramento da aplicação de tecnologias baseadas em energias alternativas como a eólica, elétrica, hídrica, nuclear, biomassa, geotérmica, solar e de biocombustíveis.

Referente à produção de energia elétrica, têm-se as células a combustível com tecnologia já consolidada, amplamente pesquisada e em constante aprimoramento. O catalisador principal usado nestes sistemas é a platina. Recentemente, a modificação destas células, substituindo os catalisadores inorgânicos pelos biológicos está sendo também pesquisada e aprimorada. Esta nova tecnologia é chamada de biocélulas a combustível.

As biocélulas, apresentam várias vantagens em relação às células inorgânicas; como por exemplo, não formam substâncias tóxicas como subprodutos, possuem elevada eficiência na catálise enzimática, permitem o uso de condições mais amenas de reação, como temperatura entre 303 a 333 K e diminuição de custos (elimina o uso da platina) em escala de laboratório (Calabrese Barton, Gallaway e Atanassov, 2004), (Santoro *et al.*, 2018), (Rewatkar, Bandapati e Goel, 2018).

Entretanto, estas ainda apresentam uma série de desvantagens em relação às células inorgânicas, como baixa geração de potência de saída e de corrente elétrica, baixa estabilidade e reduzido tempo de vida útil da enzima. Mas, apesar destes desafios, a aplicação das biocélulas a combustível é uma realidade e a procura pela melhora de sua eficiência na produção de energia elétrica é cada dia mais importante (Topcagic e Minteer, 2006), (Arechederra, Treu e Minteer, 2007), (Kim *et al.*, 2013), (Aquino Neto *et al.*, 2015), (Gamella, Koushanpour e Katz, 2018).

Comparativamente, a produção de energia elétrica catalisada por elementos biológicos como enzimas, está atualmente em evolução, chegando a obter densidades de corrente da ordem de $1 - 10 \text{ mA cm}^{-2}$. Para as células convencionais, estes valores alcançam 1 A cm^{-2} para células de hidrogênio e 500 mA cm^{-2} para as que funcionam com metanol, respectivamente (Calabrese Barton, Gallaway e Atanassov, 2004).

Apesar da discrepância nestes valores, com as densidades de corrente obtidas para as células biológicas é oportuno avaliar a aplicação destas na substituição de baterias de íon lítio, usadas em aparelhos eletrônicos portáteis tais como computadores (Meredith e Minteer, 2012). Igualmente, na área da saúde estão sendo desenvolvidas biocélulas, para serem implantadas em animais vivos, como ratos e caracóis. Estas utilizam como combustível a própria glicose dos organismos e são baseadas nos processos naturais de enzimas oxirredutases, imobilizadas nos eletrodos. Este desenvolvimento busca substituir dispositivos, como marcapassos e bombas de insulina implantadas no homem, que atualmente funcionam com baterias inorgânicas (Cinquin *et al.*, 2010), (Halámková *et al.*, 2012).

Mas para visualizar aplicações de maior porte ou ainda a possibilidade de comercialização, se faz necessário superar muitos desafios de desempenho e estabilidade das biocélulas. Rasmussen, Abdellaoui e Minteer, (2016) listam uma série de estratégias para superar estes problemas. No que tange às baixas densidades de corrente e de potência, maiores velocidades para os processos de transferência eletrônica entre as enzimas e os eletrodos são necessárias. Igualmente, a atividade catalítica da enzima assim como a capacidade de carregar altas quantidades de enzima sobre a superfície dos eletrodos devem ser aprimoradas.

Na presente tese, o aprimoramento nos processos de transferência eletrônica entre a enzima e o eletrodo foi estudado. Foram avaliados diversos tipos de imobilização da biomolécula escolhida (catalase) e a contribuição de materiais condutores (pequenas moléculas) que são parte constitutiva dos bioânodos desenvolvidos.

Assim, foi estudada a aplicação de materiais como líquidos iônicos próticos e metais que podem contribuir para melhores e mais eficientes mecanismos de transferência eletrônica entre a enzima catalase e o substrato metálico. Neste caso, os líquidos iônicos são interessantes de serem aplicados na construção de bioeletrodos pois possuem propriedades importantes, como relativamente alta condutividade iônica, ampla janela de potencial e quase nenhuma volatilidade, entre outras. Adicionalmente, sua aplicação na área de eletroquímica já é alvo de estudo com a finalidade de serem usados em dispositivos eletroquímicos (Opallo e Lesniewski, 2011), (Shiddiky e Torriero, 2011).

A enzima catalase é alvo de aplicação devido a sua capacidade de oxidar etanol. Esta enzima, pertence ao grupo das oxirredutases, possui um centro metálico responsável da

atividade enzimática frente ao peróxido de hidrogênio; mas ela também é capaz de oxidar outras substâncias com grupos doadores de prótons como é o caso dos álcoois (Mehler, 1957), (DeMaster, Dahlseid e Redfern, 1994).

A partir desta característica se fez interessante a possibilidade de aplicar esta enzima nas atuais células a combustível de etanol (DAFC, Direct Alcohol Fuel Cell) as quais possuem atualmente um entrave por contaminação e perda de eficiência no catalisador. Os catalisadores em geral são a base de platina ou uma liga de platina com metais nobres, como rutênio e paládio. No seu ciclo de catálise de oxidação do etanol, subprodutos como monóxido de carbono podem se absorver irreversivelmente na platina, diminuindo sua eficiência e até inutilizando completamente o catalisador. (Bai *et al.*, 2005), (Wang, Zou e Cai, 2015), (Jiang *et al.*, 2018).

A enzima catalase já é amplamente estudada na construção de biossensores de peróxido de hidrogênio, com a aplicação de pequenas moléculas que favorecem o processo de transferência eletrônica; porém poucas publicações são encontradas relativas à aplicação desta enzima em biocélulas a combustível (Giroud *et al.*, 2011), (Stolarczyk *et al.*, 2012), (Agnès *et al.*, 2013), (Ammam e Fransaer, 2013), (Lamberg *et al.*, 2014), (Stolarczyk *et al.*, 2014), (Slaughter e Kulkarni, 2016). Uma leitura detalhada destas referências e da busca em bases de dados científicos permite concluir que a aplicação da catalase em biocélulas a combustível se restringe à dismutação de peróxido de hidrogênio (oxidação e redução), sempre em uma configuração de complexo multi-enzimático. Portanto, até o presente momento não foi aproveitada essa habilidade da enzima na oxidação do etanol para aplicações em biocélulas a combustível.

Já na área de biossensores, muitas moléculas promotoras da transferência eletrônica foram testadas, entre elas, materiais nanocarbonáceos (Wang *et al.*, 2014), materiais semicondutores como titânia (Wu *et al.*, 2013), biomoléculas como aminoácidos (Ezhil Vilian, Chen e Lou, 2014), antraquinonas (Periasamy, Ho e Chen, 2011), polímeros (Vatsyayan, Bordoloi e Goswami, 2010), surfactantes (Hashemnia *et al.*, 2011) e alguns com líquidos iônicos apróticos (Wang *et al.*, 2007), dentre outros.

Os líquidos iônicos próticos diferentes aos apróticos tem a habilidade de formar estruturas com ligações hidrogênio (Hayes *et al.*, 2013), fato que possibilita a participação destes líquidos nos processos de transferência protônica. Com isto, estes podem contribuir no transporte de cargas entre a enzima e o substrato metálico, levando a pressupor assim,

uma contribuição na transferência eletrônica (Docampo-Álvarez *et al.*, 2016). Adicionalmente, os líquidos próticos são muito mais baratos que os apróticos, assim como seu método de síntese é muito mais simples. Finalmente, os líquidos iônicos próticos já possuem estudos que avaliam sua ecotoxicidade e os resultados apontam que estes são muito menos tóxicos que os líquidos iônicos apróticos (Peric *et al.*, 2014).

Com tudo isto, não são encontrados na literatura, trabalhos que envolvam o uso de líquidos iônicos próticos na construção de biossensores ou em geral, bioeletrodos aplicados à enzima catalase. Somente um trabalho reporta o uso da enzima glicose oxidase com um líquido iônico prótico (trifluorometanosulfonato de N-etil-imidazólio) para a construção de um biossensor na detecção de glicose (Liu *et al.*, 2012).

Enquanto às metodologias de imobilização encontradas na literatura destacam-se as de adsorção física (Zhou *et al.*, 2008) e ligação covalente na superfície do substrato (Wu *et al.*, 2013). Alguns trabalhos usam encapsulamento em matrizes poliméricas (Vatsyayan, Bordoloi e Goswami, 2010) e muitos mais pastas de carbono modificadas que por vezes levam a enzima misturada na própria pasta (Liu *et al.*, 2012) e por outras a mesma é depositada na superfície do eletrodo modificado (Wang *et al.*, 2016). No presente trabalho, foram testadas outras metodologias de imobilização; inicialmente uma combinação entre a deposição eletroquímica e a interação eletrostática por layer by layer na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. Isto principalmente com o objetivo de conhecer a interação entre a catalase e os líquidos iônicos próticos.

Posteriormente foi testada uma metodologia sem suporte, onde a imobilização ocorre por ligação covalente entre a própria enzima e um agente entrecruzante, a qual é chamada de CLEA (do inglês, Cross-Linked Enzyme Aggregates) (Zhao, 2010). Cabe destacar que, mesmo, esta metodologia sendo amplamente utilizada para a imobilização da enzima catalase, a mesma nunca foi avaliada eletroquimicamente e muito menos associada com líquidos iônicos dentro do seu próprio processo de síntese. Desta forma, a associação entre a construção de um bioeletrodo a base de catalase pelo método de imobilização CLEA em conjunto com um líquido iônico prótico para avaliar sua habilidade e contribuição no processo de transferência de carga, e sua competência para a construção de um bioeletrodo, foi a principal contribuição do presente trabalho.

OBJETIVOS

GERAL

Desenvolver e avaliar bioânodos baseados na enzima catalase, ancorada por diferentes métodos de imobilização, em materiais condutores como líquidos iônicos próticos e grafite, para potencial aplicação em biocélulas a combustível.

Específicos

- Sintetizar líquidos iônicos próticos adequados à aplicação em bioeletrodos.
- Caracterizar física e físico-quimicamente os líquidos iônicos sintetizados.
- Determinar o grau de ionicidade dos líquidos iônicos sintetizados a partir de um Walden plot.
- Levantar uma série de Hofmeister a partir da determinação do efeito dos líquidos iônicos da série do [m-2HEA⁺] sobre a solubilidade e a atividade da catalase.
- Construir bioeletrodos a partir da metodologia de imobilização combinada entre os métodos layer by layer e deposição eletroquímica; avaliar os bioeletrodos eletroquimicamente.
- Construir bioeletrodos a partir da metodologia de imobilização tipo CLEA da catalase ancorada com líquidos iônicos e grafite.
- Avaliar as propriedades químicas, eletroquímicas e morfológicas dos bioeletrodos desenvolvidos pelo método CLEA.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL

Em geral uma célula a combustível é um dispositivo que transforma a energia química em elétrica a partir da oxidação de um combustível no ânodo, e da redução de um oxidante no cátodo. Isto é obtido a partir de reações catalisadas normalmente por metais como platina pura ou mistura desta com outros metais nobres (Peighambardoust, Rowshanzamir e Amjadi, 2010).

As biocélulas a combustível surgem como uma contraproposta às células a combustível nas quais os catalisadores são biomoléculas capazes de conduzir reações de oxido-redução. Estas biomoléculas podem ser enzimas, complexos multi-enzimáticos ou mesmo o próprio microrganismo que contém no seu metabolismo os processos catalíticos (Bullen *et al.*, 2006).

A primeira observação registrada da produção de energia elétrica a partir de biomoléculas foi realizada em 1912 pelo professor Potter quem conseguiu gerar energia elétrica a partir do metabolismo do açúcar em células de leveduras (Moehlenbrock, Michael J e Minteer, 2008). Na área de depósito de patentes se observa que os primeiros trabalhos registrados em biocatalisadores datam do ano de 1961 mas só a partir do ano de 1998 houve um real interesse e investimento no desenvolvimento da tecnologia de biocélulas (Rosales, Boaventura e Druzian, 2013).

Em geral uma biocélula está constituída por um bioânodo onde ocorre a oxidação, um biocátodo onde ocorre a redução, e um circuito externo metálico capaz de conduzir os elétrons gerados no bioânodo (Davis e Higson, 2007). Geralmente, as biocélulas possuem também uma membrana, a qual deve permitir unicamente a transferência protônica, evitando o fenômeno de “*crossover*” do combustível. Porém, muitas outras biocélulas, devido à especificidade dos biocatalisadores, são desenvolvidas sem nenhuma membrana, podendo esta ser dispensada (Gomez, Shipovskov e Ferapontova, 2010).

As biocélulas podem ser divididas segundo o biocatalisador, como células a combustível microbianas e células a combustível enzimáticas; sendo que na primeira são os mesmos

microrganismos os que conduzem as reações redox e na segunda, estas reações são responsabilidade das enzimas (Leech, Kavanagh e Schuhmann, 2012). As biocélulas a combustível também podem ser classificadas segundo a forma de transferência eletrônica; o MET do inglês Mediated Electron Transfer e o DET do inglês Direct Electron Transfer. Na Figura 1 a seguir são ilustrados estes dois mecanismos.

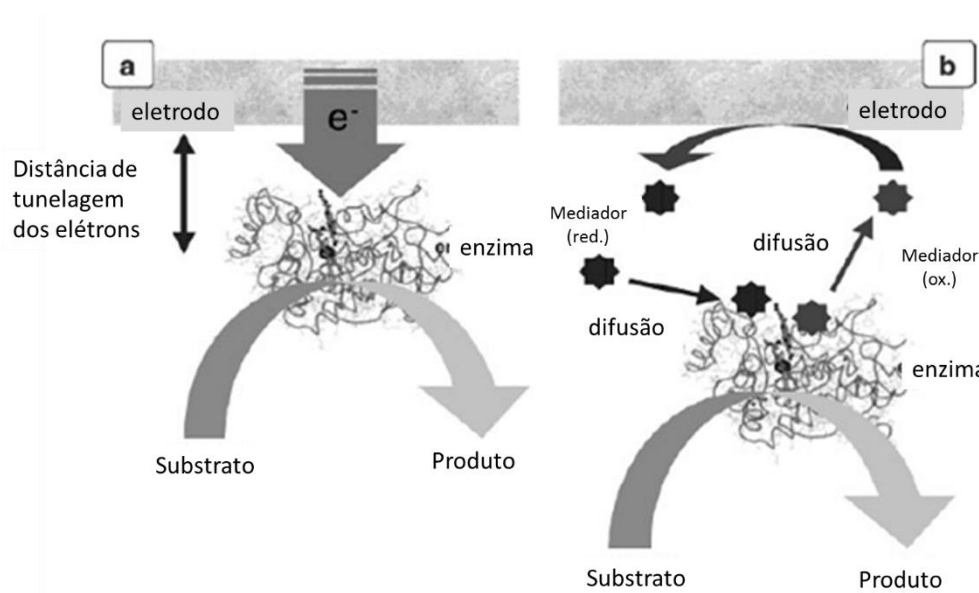


Figura 1. Mecanismos de transferência eletrônica usados na tecnologia de biocélulas a combustível: a) DET transferência eletrônica direta e b) MET transferência eletrônica auxiliada por uma espécie mediadora redox. Adaptado de Moehlenbrock e Minteer (2008).

No MET são usadas moléculas mediadoras como os próprios cofatores das enzimas ou outras substâncias inorgânicas, como ferroceno ou azul de metileno, as quais possuem múltiplos estados redox. Estas moléculas são usadas para aceitar ou doar elétrons do sítio ativo da enzima e para auxiliar no transporte de carga da superfície do eletrodo (Meredith e Minteer, 2012). Porém, este tipo de transferência apresenta vários inconvenientes, como sobrepotenciais dos mediadores (que podem chegar a gerar resistência na célula), instabilidade dos mesmos em algum estado de oxidação, maiores custos e menores áreas efetivas de transferência. Além disto, pode apresentar toxicidade e lixiviação (baixa biocompatibilidade) e, em certos casos a depender da substância, longas distâncias para serem percorridas pelos elétrons, o que gera uma lenta transferência dos mesmos (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008).

No DET a enzima encontra-se em contato direto com a superfície metálica do substrato, seja esta última modificada ou não. O DET ocorre a partir da habilidade da enzima de atuar como um “transdutor molecular” que converte o sinal químico diretamente em sinal elétrico, através da transferência de carga para uma espécie redox estável a qual é por sua vez capaz de transferir essa carga a outra molécula ou superfície do eletrodo. Estas espécies redox são principalmente centros metálicos presentes em muitas enzimas, os quais são capazes de realizar a transferência catalítica dos elétrons (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008). Exemplos destes centros redox são os grupos heme nos quais íons de metais como Fe, Co e Mn estão presentes em enzimas como catalase, citocromo, peroxidases, entre outras (Prabhulkar *et al.*, 2012).

Em geral as enzimas utilizadas são as do grupo das oxidoredutases, responsáveis de inúmeros processos biológicos que envolvem transferência de elétrons, como metabolismo, fotossíntese, respiração, dentre outros (Prabhulkar *et al.*, 2012).

As enzimas redox possuem altos números de *turnover*, por exemplo, a catalase apresenta $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ e lacase $1,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$; sendo que este fator de *turnover* corresponde ao número máximo de moléculas de substrato que a enzima pode converter a produto por sítio catalítico por segundo (Nelson e Cox, 2005). Dessa forma, se esperaria que a cinética de transferência eletrônica fosse alta e por consequência altas correntes de saída fossem obtidas em dispositivos como biocélulas a combustível (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008).

Entretanto, as respostas obtidas nas biocélulas não condizem com essa situação; valores de saída de corrente e potência são geralmente baixos e não comparáveis com os obtidos pelas células inorgânicas (Calabrese Barton, Gallaway e Atanassov, 2004). Isto é devido principalmente a uma ineficiente transferência eletrônica entre a biomolécula e o substrato metálico.

Os sítios ativos das enzimas ficam profundamente colocados no interior de longas cadeias polipeptídicas o que dificulta a transferência dos elétrons. Os mesmos devem ficar orientados no mais próximo contato possível com o substrato metálico, a fim de favorecer o processo de transferência eletrônica (Cosnier *et al.*, 2016).

Adicionalmente a isto, outros fenômenos nesse contato enzima – eletrodo podem levar a inibição da transferência, como alto grau de desnaturação da biomolécula a depender do

tipo de imobilização aplicada e a distribuição irregular de cargas superficiais nas proteínas (Li, Luo e Feng, 2001).

Assim, para alcançar correntes eletrocatalíticas apropriadas, três principais obstáculos devem ser considerados: orientação do sítio ativo da enzima, suficiente carga enzimática na superfície do substrato metálico e mecanismo de transferência eletrônico.

A orientação se refere à disposição da enzima na superfície do eletrodo. Ou seja, mecanismos para diminuir o caminho que deve ser percorrido pelos elétrons para que assim a transferência seja o mais eficiente possível. Para isto, vem se estudando a orientação da enzima a nível molecular, seja por interações físicas ou químicas. Utilizam-se ligantes aderidos à superfície do eletrodo, os quais interagem com o sítio redox da enzima ou resíduos de aminoácidos próximos a este; favorecendo a orientação do mesmo.

Outra forma de favorecer a orientação das enzimas, é a sua imobilização em matrizes altamente condutivas, nas quais a transferência direta pode ocorrer em qualquer direção (Meredith e Minteer, 2012). A forma de imobilização da enzima no eletrodo afeta diretamente a sua orientação na superfície metálica. Assim, sabe-se que fortes interações proteína-superfície contribuem para a imobilização de biomoléculas com orientações mais uniformes (Xie *et al.*, 2015).

Enquanto à carga enzimática na superfície do substrato metálico encontra-se na literatura que a quantidade ideal das biomoléculas presentes na superfície do eletrodo, deve ser maior a uma simples monocamada, pois esta só, produz valores muito baixos de densidade de potência e de corrente nas células. Mas, não deve ser tão alta, pois ao invés de agir como um condutor seu comportamento ficaria semelhante ao de um isolante (Meredith e Minteer, 2012).

Finalmente, para que o processo de transferência dos elétrons seja o mais rápido possível, deve ser estudada a interação entre a biomolécula e o substrato metálico, podendo ser estudada a adição de pequenas moléculas promotoras que favoreçam essa interação entre as interfaces. Assim, no presente trabalho serão desenvolvidos bioeletrodos nos quais poderão ser estudados os efeitos da adição dessas substâncias promotoras, além de diversas metodologias de imobilização, alternativas às propostas em outros trabalhos científicos.

BIOELETRODOS

Os bioeletrodos são em geral, eletrodos quimicamente modificados, expressão que data desde a década de 60 e que foi criada a partir da imobilização de grupos funcionais acomplexantes (Pereira, Santos e Kubota, 2002) em um material inorgânico. Em 1967 foi incorporado um catalisador biológico (a enzima glicose oxidase) (Updike e Hicks, 1967) onde Moses; Wier e Murray (1975) foram os primeiros a se referir a esses eletrodos por este nome e concluíram que a preparação de superfícies é o primeiro passo para desenvolver eletrodos quimicamente modificados com aplicações eletroquímicas.

Um bioeletrodo se enquadra então no conceito de eletrodo quimicamente modificado e pode ser definido como um dispositivo composto de um elemento biológico sensível, intimamente ligado a um sistema transdutor. Este elemento biológico deve identificar uma determinada substância por meio de uma reação bioquímica específica. A resposta pode ser na forma de fluxo de elétrons, emissão de calor, variação de massa, entre outros. Finalmente, o transdutor eletroquímico deverá transformar e quantificar o sinal resultante desta interação entre o composto biológico e a substância alvo (Silva, 2013).

Em bioeletrodos enzimáticos, a reação do substrato específico (analito) é catalisada no sítio ativo da enzima, e a corrente resultante é quantificada por um transdutor do tipo eletroquímico (Oliveira, 2008); a Figura 2 representa o sistema do bioeletrodo e aquisição do sinal.

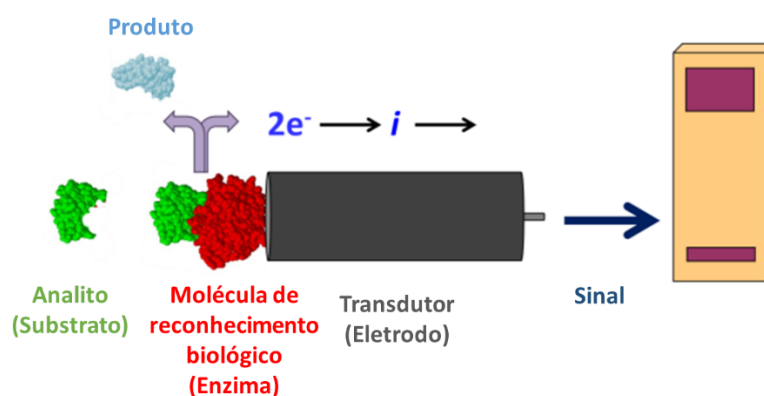


Figura 2. Desenho típico de um eletrodo modificado com enzima. Adaptado de Putzbach e Ronkainen (2013).

Assim, em um sentido amplo, um eletrodo é um terminal onde ocorrem reações eletroquímicas devidas a diferentes substâncias eletroativas presentes no meio eletrolítico. Neste eletrodo, se conduz uma corrente elétrica que pode ser originada desde dentro ou fora dele.

Como toda reação eletroquímica, as reações redox promovidas por biomoléculas, envolvem fluxo de elétrons. Mas para que este fluxo possa ser medido, precisa-se de um meio que promova e amplifique essa resposta biológica. Assim, uma combinação sinérgica entre um elemento inorgânico, normalmente um metal, e um elemento biológico dá como resultado um bioeletrodo.

Um bioânodo é um tipo de bioeletrodo, onde o catalisador é uma espécie biológica capaz de oxidar uma substância no meio reacional. No presente trabalho foram construídos bioânodos capazes de dismutar o peróxido de hidrogênio. Nestes, a enzima catalase foi testada e o efeito da adição de substâncias promotoras da transferência eletrônica e de diferentes metodologias de imobilização foi avaliado.

CATALASE

A enzima catalase é classificada pela IUPAC como 1.11.1.6, da classe das oxiredutases (Sober, 1970). Está composta por quatro subunidades idênticas com sítios ativos porfirínicos, similares aos da hemoglobina, sendo que em cada um deles, um íon férrico está presente e é responsável pela atividade catalítica da enzima (Goodsell, 2004) (Figura 3).

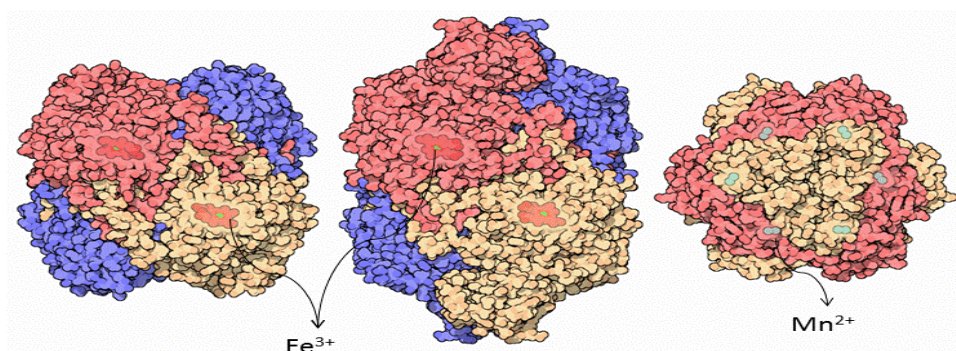
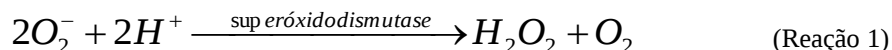
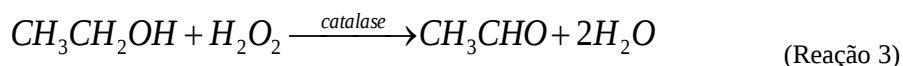


Figura 3. Estruturas das três classes de catalases presentes na natureza. *Esquerda*: catalase da classe 1, *centro*: catalase da classe 2, *direita*: catalase da classe 3. *Ilustração obtida de Goodsell (2004).*

A catalase é considerada uma enzima ubíqua presente principalmente nas peroxissomas, faz parte do sistema de proteção da célula contra a oxidação devida à formação de radicais livres, produtos de reações secundárias do oxigênio presente em todos os organismos aeróbios desde bactérias até o homem. Esta enzima decompõe o peróxido de hidrogênio formado no interior da célula pela enzima superóxido dismutase (Reação 1), liberando água e oxigênio como produtos finais (Reação 2) (Kimbrough, Magoun e Langfur, 1997). Isto é definido como atividade catalática (Lente e Pepoy, 1990).



Outros estudos demonstram que quando em presença de outras substâncias tóxicas dentro do organismo, como o etanol (em geral doadores de prótons), a catalase oxida entre 2-3% desta espécie, protegendo a célula da intoxicação na presença de concentrações relativamente baixas de H_2O_2 (Reação 3) (Júnior *et al.*, 1998) (Mehler, 1957). Isto é definido como atividade peroxidática.



A literatura é relativamente escassa sobre a utilização da catalase para a oxidação direta do etanol. No trabalho de Akyilmaz e Dinçkaya (2003), foi desenvolvido um biossensor baseado na catalase imobilizada para determinação de etanol em bebidas; a resposta da enzima se correlacionou com a produção de O_2 , medido por uma sonda de teflon tipo Clark. O biossensor respondeu linearmente à concentração de etanol entre 0,05 a 1,0 mmol L⁻¹ com um limite de detecção de 0,05 mmol L⁻¹ e um tempo de resposta de 3 minutos.

Campanella *et al.* (2010) desenvolveram um biossensor para determinar concentrações de etanol em gasolinas livres de chumbo, baseado em um princípio de substrato competitivo acoplado a um eletrodo amperométrico tipo Clark que detecta oxigênio. O biossensor respondeu linearmente numa faixa de concentração de etanol de 0,042 a 0,37 mmol L⁻¹ e um limite de detecção de 0,02 mmol L⁻¹.

Hnaïen; Lagarde E Jaffrezic-Renault (2010) construíram um biossensor bi-enzimático composto por álcool oxidase (AOX) e catalase (CAT). Neste biossensor a AOX oxida o etanol e produz peróxido de hidrogênio e acetaldeído e a CAT utiliza este peróxido produzido além de oxidar paralelamente o etanol a acetaldeído e água. Os autores obtiveram uma resposta linear acima de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de etanol. O biossensor não apresentou perda significativa de atividade após 3 meses, quando armazenado a 4°C , em solução de tampão fosfato 20 mmol L^{-1} e pH 7,2.

Angeloni et al. (2015) compararam dois biossensores para determinação de etanol, baseados nas enzimas catalase e álcool oxidase separadamente, imobilizadas em um disco de gel de K-carragena. Encontraram de forma geral, que o biossensor a base de catalase é mais adequado para determinação de etanol em bebidas alcoólicas por ser mais seletivo e econômico. Adicionalmente, o biossensor a base de catalase apresentou maior estabilidade operacional e reprodutibilidade, não sendo afetado por outros álcoois interferentes. Um limitante deste biossensor é o seu tempo de resposta, maior que 34 min comparado aos 25 min do biossensor a álcool oxidase.

Enquanto à utilização exclusiva da catalase em biocélulas a combustível para oxidação de etanol, nenhum trabalho foi publicado, até o final da confecção desta pesquisa. Considerando adicionalmente, que esta enzima tem habilidade para conduzir uma reação peroxidática e observando o cenário atual a célula a combustível direta a álcool (DAFC do inglês Direct Alcohol Fuel Cell), se deu origem à proposta deste trabalho de pesquisa.

As DAFC são as mais promissoras para aplicações em grande escala no setor energético. Álcoois, principalmente o etanol possuem alta capacidade calorífica, não toxicidade e estabilidade química (Bai *et al.*, 2005). Adicionalmente, a cadeia produtiva do etanol já está bastante consolidada, desde sua obtenção até sua distribuição final. Portanto, no Brasil e muitos países desenvolvidos é bastante viável sua utilização no desenvolvimento desta tecnologia (Wang, Zou e Cai, 2015).

Porém muitas dificuldades são enfrentadas devido ao envenenamento do catalisador com a formação de subprodutos produzidos durante a reação de oxidação do etanol. Os catalisadores mais usados são a platina pura ou esta misturada com metais nobres, como o rutênio e paládio. Estes subprodutos intermediários bloqueiam os sítios ativos do catalisador, gerando perdas no desempenho da célula até a inativação do material catalítico (Soukharev e Mano, 2004).

Diversos estudos já foram realizados; ligas de platina com outros metais, óxidos de metais e elementos não metálicos já foram utilizados; nenhuma alternativa mostrou-se efetiva para aumentar o desempenho do catalisador. Muitas questões mecanísticas ficam ainda sem responder e o efeito destes elementos externos não foi totalmente esclarecido (Wang, Zou e Cai, 2015).

Na busca por melhores resultados, destaca-se o trabalho de Falase et al. (2012), os quais desenvolveram um bioânodo suportado em um eletrodo de carbono vítreo com verde de polimetileno (como mediador eletroquímico), uma camada de nanopartículas de carbono de multiparede com NAD^+ (Nicotidamina Adenina Dinucleótido) e ADH (álcool dehidrogenase), e finalmente uma camada de tinta contendo Pt-Ru, para oxidar o etanol numa célula a combustível tipo DAFC. Com este híbrido, obtiveram melhoras nas correntes de saída de 1,48 vezes mais do que o eletrodo puro de Pt-Ru.

IMOBILIZAÇÃO

Essencialmente para que exista a comunicação entre a enzima e o substrato metálico é necessário que a enzima esteja intimamente ligada ao último. Assim, existem diferentes métodos de imobilização aplicados para a construção de bioeletrodos. Nestes métodos é desejável que a carga de enzima seja suficiente no metal transdutor e que esta esteja de preferência orientada na melhor posição, a fim de favorecer o transporte de elétrons a partir do efeito túnel (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008).

Com as técnicas de imobilização, podem se favorecer microambientes adequados onde a proximidade da enzima ao eletrodo permite uma transferência mais eficiente dos elétrons e conseqüentemente um incremento na densidade de corrente. Adicionalmente, a imobilização favorece o aumento na estabilidade da enzima (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008), além de evitar as perdas do biocatalisador permitindo a recuperação do mesmo e com isto seu reuso.

Para que a fixação das biomoléculas seja aplicável e eficiente, os seguintes requisitos devem ser atendidos:

- A imobilização das enzimas no transdutor metálico deve ser estável e eficiente,

- A atividade biológica da enzima deve ser mantida, sem alterar sua estrutura quaternária,
- A estrutura hospedeira (substrato metálico) deve ser biocompatível e quimicamente inerte,
- A biomolécula imobilizada deve estar na orientação correta frente aos substratos para permitir uma eficiente cinética de transferência eletrônica,
- A estabilidade da atividade deve ser mantida ao longo do tempo. (Cosnier, 2003).

Várias técnicas já foram desenvolvidas e aprimoradas a fim de assegurar a fixação das enzimas nos substratos. Dentre elas se destacam: ligação não covalente, como adsorção física (*casting* e *dripping* ou gotejamento), *entrapping* tipo sanduíche, *layer by layer* e encapsulamento; ou ligação covalente, como entrecruzamento, eletro-imobilização ou deposição eletroquímica (Ahuja *et al.*, 2007). Cada uma destas técnicas permite uma maior proximidade da enzima com o substrato ou transdutor metálico e serão brevemente descritas a seguir.

Ligação não covalente

Todos os procedimentos nos quais interações fracas, como as de van der Waals, hidrofóbicas e eletrostáticas, podem levar à fixação da enzima no substrato metálico, são considerados processos de imobilização por ligação não covalente.

A adsorção física se dá por interações hidrofóbicas entre a biomolécula e o material suporte (metálico, polimérico, etc.). Este tipo de imobilização é muito usado em sistemas não aquosos, nos quais a dessorção pode ser desconsiderada devido à baixa solubilidade das enzimas nesses solventes (Tischer e Kasche, 1999). As enzimas adsorvidas são protegidas contra a agregação, proteólise e interação com superfícies hidrofóbicas (Rahimi *et al.*, 2010), (Datta, Christena e Rajaram, 2013).

No *entrapping* tipo sanduíche e encapsulamento, as ligações se dão por interações eletrostáticas onde as biomoléculas são capturadas no meio de materiais suportes como polímeros condutores ou fibras. No tipo sanduíche, uma camada de enzima fica capturada no meio de camadas de polímero. Devido ao distanciamento da enzima com a superfície do eletrodo, este tipo de imobilização apresenta uma redução no transporte de massa, refletido como aumento na resistividade e com isto na cinética de transferência de elétrons (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008).

Encapsulamento é a captura física da enzima em poros ou matrizes de uma membrana na superfície do eletrodo (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008). Materiais como quitosana, alginato e matrizes sol-gel são os mais usados, onde mesoporos com alta área superficial e alta capacidade de adsorção, favorecem a distribuição uniforme das enzimas e a cinética de transferência eletrônica (Klotzbach *et al.*, 2006), (Shen *et al.*, 2011), (Sahney *et al.*, 2006).

Outro tipo de imobilização por ligações não covalentes é o *layer by layer* (LBL) ou camada por camada. Esta é uma técnica que envolve a deposição sequencial em um substrato, de duas espécies que interagem simultaneamente. O tipo mais comum de configuração LBL é baseado na deposição alternada de poliânions e policações obtendo assim multicamadas de polieletrólitos (Rydzeck *et al.*, 2015). Esta técnica é muito atrativa devido às diferentes arquiteturas de filmes nanoestruturados, que podem ser obtidas sobre os substratos sólidos, com relativa simplicidade e controle preciso da composição dos filmes, espessura, rugosidade e porosidade (Iost e Crespilho, 2012) (Figura 4).

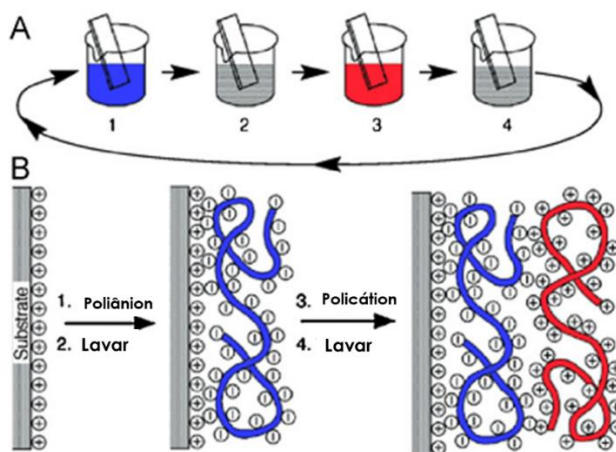


Figura 4. Esquema da construção de um bioeletrodo por interação layer by layer. 1 e 3 representam os passos de adsorção do poliânion e o policação, respectivamente. Os passos 2 e 4 são etapas de lavagem.

Adaptado de Iost e Crespilho (2012).

Ligação covalente

Enzimas são covalentemente ligadas ao substrato ou transdutor, através dos grupos funcionais dos aminoácidos como arginina, ácido aspártico e histidina, os quais em geral não são essenciais para a atividade catalítica (D'Souza, 1999).

Entrecruzamento é considerada uma das mais comuns e simples forma de imobilização por ligação covalente. Mas apesar disto, esta técnica não é muito atrativa na área de desenvolvimento de células a biocombustível pois o procedimento leva ao decréscimo na atividade catalítica (Moehlenbrock, Michael J. e Minteer, 2008). Porém, existem diversos trabalhos de desenvolvimento de bioeletrodos aplicando esta técnica (Wang *et al.*, 2014), (Wu *et al.*, 2013), (Stolarczyk *et al.*, 2012), (Galhardo, Torresi e Torresi, 2012), (Marx *et al.*, 2011), (Yu *et al.*, 2008).

Em geral, este tipo de imobilização consiste na aplicação de um agente de entrecruzamento normalmente bifuncional, o qual reage com os resíduos de aminoácidos por meio da reação de Schiff. O reagente mais comumente usado é o glutaraldeído devido ao seu baixo custo, alta eficiência, estabilidade e solubilidade em sistemas aquosos (Mingeault *et al.*, 2004). Apesar de não ser claramente elucidado, é aceito que as reações de entrecruzamento ocorrem entre os grupos amino livres dos resíduos de lisina da enzima ou proteína e o grupo carbonilo do glutaraldeído (Sheldon, 2011) (Barbosa *et al.*, 2014).

O método CLEA é um tipo de imobilização por entrecruzamento que não utiliza suporte. O fato de estar livre de suporte possui várias vantagens: aumento na concentração da atividade, devido a uma mínima ou desprezível diluição da enzima, alta estabilidade, diminuição nos custos de produção e flexibilidade no uso da enzima imobilizada (Schoevaart *et al.*, 2004). Este método consiste no entrecruzamento da enzima com glutaraldeído com uma prévia precipitação com algum composto que afete a constante dielétrica do meio ou em geral o estado de hidratação da enzima.

Na Figura 5 a seguir pode ser observado o esquema geral de produção das CLEAs.

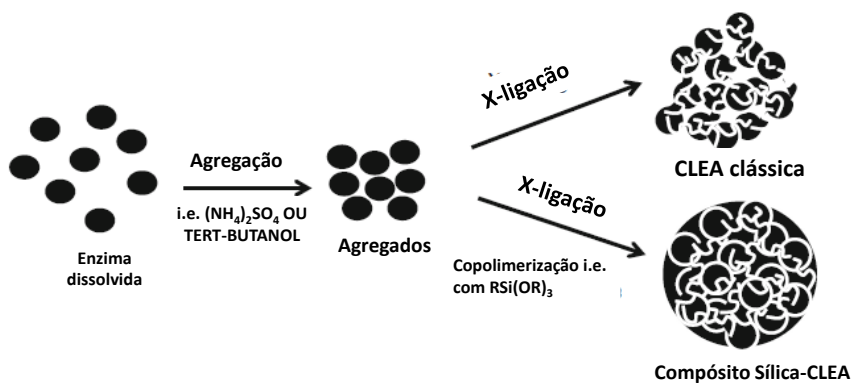


Figura 5. Esquema geral para preparação de CLEAs. Modificado de Sheldon (2011).

O glutaraldeído em geral forma condensações aldólicas inter e intramoleculares, entrecruzando geralmente resíduos de lisina a partir da formação de bases de Schiff e adições do tipo Michael 1,4 a aldeídos α,β – insaturados, reações todas dependentes do pH do meio reacional. Na Figura 6, observam-se estas duas reações que podem ocorrer no processo de entrecruzamento.

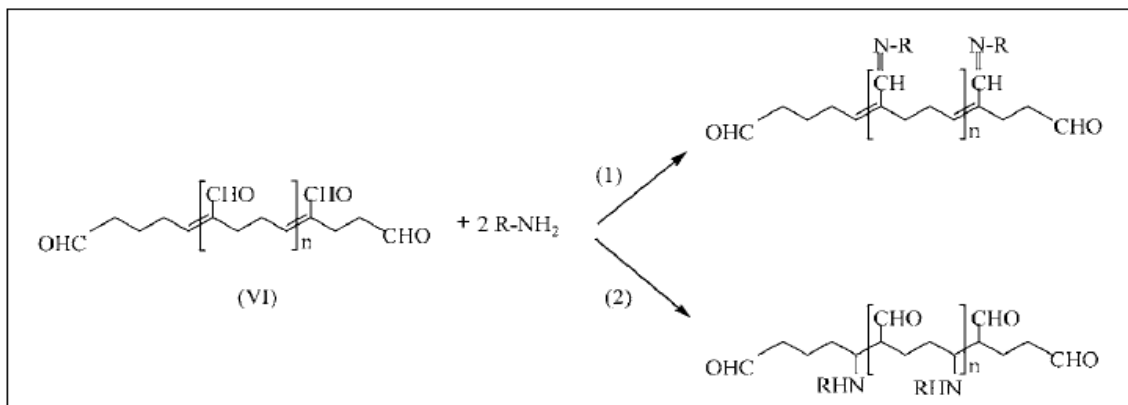


Figura 6. Reações base de Schiff (1) e tipo Michael (2) do glutaraldeído com as proteínas (Mingeault *et al.*, 2004).

As quantidades ideais de agente ligante ou entrecruzante são avaliadas para cada caso, sendo que não deve ser tão baixa que gere uma perda da enzima por difusão ao meio ou muito alta, ligando fortemente e fazendo perder sua estrutura quaternária, ou até a terciária. Frequentemente é aconselhável imobilizar a enzima de interesse na presença de um aditivo, como uma proteína não reativa, que pode fazer as vezes de um espaçador. Também pode ser imobilizada na presença do substrato ou inibidor competitivo que ajudem a manter estável o sítio ativo da enzima (D'Souza, 1999).

A partir da utilização desses aditivos, foram estudadas melhorias da eficiência catalítica e da estabilidade da enzima. Beltrame *et al.* (2015) utilizaram a proteína concentrada de soja como um agente espaçador na imobilização de invertase; este aditivo facilitou a disponibilidade do sítio ativo da enzima; obtendo assim maiores rendimentos na atividade enzimática. Diversos grupos de pesquisa usaram albumina de soro bovino como um fornecedor de resíduos de lisina, encontrando em geral um significativo efeito positivo na atividade final da enzima estudada. Até 100% da atividade inicial da solução da enzima foi mantido no imobilizado e a perda de atividade foi menor ao longo do tempo. Nestes trabalhos se conclui que a adição desta substância é benéfica para os casos em que a concentração de proteína inicial é baixa ou quando a proteína é suscetível à perda de

atividade devida ao excessivo entrecruzamento (Shah, Sharma e Gupta, 2006), (Guauque Torres, Foresti e Ferreira, 2013), (Tükel *et al.*, 2013).

Eletroimobilização

Este tipo de imobilização está relacionado à aplicação de um campo elétrico na enzima, a fim de induzir sua deposição em um elemento transdutor. Existem dois tipos de eletroimobilização: a deposição eletroquímica (ECD do inglês *electrochemical deposition*) e a deposição eletroforética (EPD do inglês *electrophoretic deposition*). Nestas duas técnicas, são empregados campos elétricos para produzir multicamadas de enzimas aparentemente uniformes e reprodutíveis sobre áreas muito pequenas. A manipulação das forças exercidas por um campo elétrico externo aplicado sobre a carga das enzimas, leva ao depósito das mesmas na superfície do eletrodo (Ammam, 2014). A técnica de deposição eletroquímica (ECD) é conhecida desde meados de 1970. Por outro lado, estudos envolvendo a pesquisa em EPD de enzimas são relativamente novos. Ambas técnicas empregam campos elétricos para depositar enzimas, mas as condições de cada processo e seus mecanismos são diferentes (Ammam, 2014).

Especificamente, a deposição eletroquímica ou eletrodeposição consiste na aplicação de um campo elétrico de corrente direta a uma célula eletroquímica, contendo a enzima em solução. Três fatores principais envolvem a eficiência na deposição: a carga superficial da enzima, o fenômeno de migração e a adesão da enzima no eletrodo (Ammam, 2014). As principais vantagens da imobilização eletroquímica são: o procedimento pode ser realizado em um único passo rápido e tanto a distribuição espacial da enzima, assim como a espessura das camadas podem ser controladas. Além disto, a carga envolvida no processo de deposição pode ser controlada para construir estruturas de multienzimas ou multicomponentes (Ahuja *et al.*, 2007).

Entretanto, os fenômenos básicos que envolvem esta técnica ainda não estão elucidados e pesquisas adicionais voltadas a compreender o mecanismo fundamental do ECD de enzimas se fazem necessárias (Ammam, 2014).

No campo das aplicações, esta tecnologia é recente no que se refere ao seu uso em biocélulas a combustível, encontrando ainda poucas publicações (Karnicka *et al.*, 2007), (Kim, Kim e Yoo, 2009), (Ackermann *et al.*, 2010), (Ammam e Fransaer, 2010), (Shen

et al., 2013), (Ammam, 2014). Nos anos posteriores não foram encontradas mais publicações específicas ao uso do ECD de enzimas para uso em biocélulas a combustível.

Em geral as técnicas de imobilização podem chegar a ser combinadas, onde interações covalentes e eletrostáticas para a construção de um bioeletrodo, são interessantes. Para a construção do primeiro bioeletrodo desenvolvido neste trabalho combinaram-se as técnicas de imobilização de layer by layer junto com a deposição eletroquímica. Isto permite assegurar uma maior estabilidade a camadas de enzima e polieletrólitos depositados na superfície do substrato metálico (Sun, Wang e Sun, 2008), (Salimi e Noorbakhsh, 2011).

Apesar de todos os esforços nas metodologias de imobilização muitas vezes a comunicação entre a enzima e substrato metálico encontra-se comprometida pois as enzimas possuem na maioria dos casos, sítios ativos profundamente localizados no interior das cadeias de polipeptídeos da sua estrutura.

Portanto, para melhorar o transporte de elétrons entre a enzima imobilizada e o transdutor muitas vezes não é suficiente aprimorar somente o procedimento de imobilização, encontrando necessário adicionar espécies mediadoras ou promotoras, as quais desempenham o papel de conectores entre o sítio ativo da enzima e a superfície do transdutor. Com isto se busca que as densidades de potência e de corrente da biocélula sejam melhoradas, assim como um aumento na janela de potencial também pode ser observado (Ammam, 2014).

Desta forma, as enzimas podem ser co-imobilizadas junto com outras substâncias promotoras da transferência eletrônica. Entre estas têm-se polímeros e sol-géis para aprisionar a enzima em matrizes (Cosnier, 1999), (Gerard, Chaubey e Malhotra, 2002), (Andronescu, Pöller e Schuhmann, 2014); proteínas como colágeno e albumina de soro bovino (Wu, Bentley e Payne, 2011); metais como platina e paládio ou óxidos metálicos (Male, Hrapovic e Luong, 2007), (Salimi *et al.*, 2007), (Shamsipur, Asgari, Mousavi, *et al.*, 2012), (Wang e Tan, 2014); nanomateriais como nanotubos de carbono e nanopartículas de metais (Chiu *et al.*, 2009), (Gao e Zheng, 2009), (Qiu *et al.*, 2009); e moléculas pequenas como mediadores (Shi *et al.*, 2014), (Salimi e Noorbakhsh, 2011).

LÍQUIDOS IÔNICOS

Recentemente, vários estudos têm se dirigido à aplicação dos líquidos iônicos (LIs), os quais podem melhorar a condutividade ou transferência de elétrons, bem como favorecer a ligação da enzima no transdutor metálico.

Diversos trabalhos sugerem que a incorporação de líquidos iônicos nos bioeletrodos ofereça diversas vantagens, como:

- maior condutividade,
- boa atividade biocatalítica,
- estabilidade a longo prazo e a mais altas temperaturas,
- sensibilidade superior,
- melhoras na linearidade,
- melhor seletividade, e
- a habilidade de fabricar bioeletrodos de terceira geração, ou seja, com transferência eletrônica direta entre a proteína e o eletrodo (Faridbod *et al.*, 2011).

Poucas publicações são encontradas, onde líquidos iônicos são imobilizados junto com enzimas aplicando a técnica de eletrodeposição (Xi *et al.*, 2008), (Zeng *et al.*, 2009). Um dos mais recentes foi publicado por Saadati *et al.* (2014) que construíram um bioeletrodo de hemoglobina a partir da técnica de LBL combinada com deposição eletroquímica, ciclando a biomolécula entre -0.7 e 0.7 V. Em outro trabalho, Saadati *et al.* (2012) desenvolveram um biossensor de peróxido de hidrogênio a base de catalase utilizando as mesmas técnicas. Nos dois trabalhos supracitados os autores constataram que os bioeletrodos construídos apresentaram excelente resposta eletroquímica, baixo limite de detecção, alta sensibilidade, afinidade ao substrato e incremento na capacidade de carga da enzima na superfície do eletrodo.

Já para a construção de bioeletrodos a partir do método CLEA não foram encontrados trabalhos científicos. Buscas realizadas até o ano de 2018, com palavras chave como “CLEA”, “protein*”, “biomolecule*” e “electrochemistry” na base de dados “*web of Science*”, não produziram nenhum resultado. Também foram realizadas buscas na mesma base de dados, com as palavras chave “ionic liquid” e “protic ionic liquid” em conjunto com a palavra “CLEA” e somente um review foi encontrado no qual se cita a metodologia

CLEA para a imobilização de uma lipase, a qual foi colocada em um meio reacional que continha um líquido iônico aprótico (Zhao, 2010). Porém, nada se fala da adição de líquidos iônicos ao próprio processo de elaboração dos CLEAs.

Conhecendo então o que se tinha na literatura neste aspecto, foram definidos a seguir os líquidos iônicos e foi esplanada uma breve revisão da sua aplicação na eletroquímica e as possíveis combinações dos mesmos no meio com biocomolêculas.

Os líquidos iônicos são por definição, sais constituídos de íons de natureza hidrofóbica e hidrofílica, líquidos a temperaturas abaixo de 373 K, se diferenciando por isto dos sais fundidos. O estado cristalino do sistema dos líquidos iônicos é suficientemente desestabilizado, levando-os a pontos de fusão próximos ou abaixo da temperatura ambiente. Essa desestabilização é principalmente devida à presença de compostos catiônicos grandes, os quais devido a efeitos estéricos geram uma redução das forças coulômbicas atrativas com os ânions. Em geral, a presença de componentes com estruturas mais complexas dificultam o empacotamento dos cristais (Belieres e Angell, 2007).

Gabriel (1888) apresentou em 1888 a primeira referência ao líquido iônico, nitrato de etanolamônio, com um ponto de fusão de 52 – 55 °C. Em 1914, Walden sintetizou o nitrato de etilamônio por transferência de um próton de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted, sem o uso de solventes (Zhao *et al.*, 2008). Este é o registro do primeiro líquido iônico prótico sintetizado.

Os líquidos iônicos podem ser agrupados em quatro categorias, tomando como base o tipo de cátion formado (Ghandi, 2014) (Figura 7):

- Os alquil-amônios
- Os di-alquil-imidazólios
- Os fosfônios
- Os alquil-piridínios

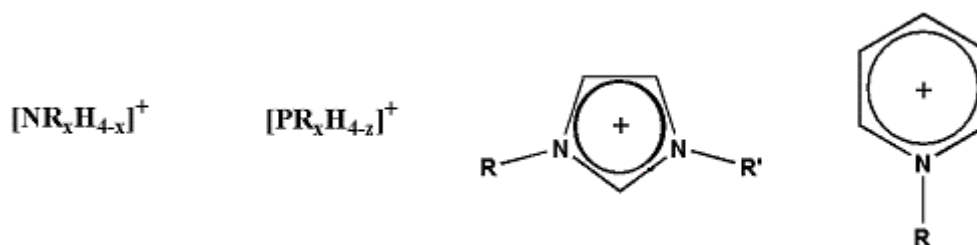


Figura 7. Da esquerda para a direita: cátions de alquil-amônios, fosfônios, di-alquil-imidazólios e N-alquil-piridínios. Extraído de Ghandi (2014).

Os líquidos iônicos também podem ser divididos em dois grupos principais: os líquidos iônicos apróticos e os líquidos iônicos próticos. Nos apróticos, uma molécula base é ionizada, transformando-se no cátion, ao aceitar qualquer grupo que não seja o próton no seu sítio básico. Por outro lado, os líquidos iônicos próticos são formados mediante a transferência de prótons de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted, como se observa na Reação 4 (Stoimenovski, Izgorodina e MacFarlane, 2010).



Como os líquidos iônicos são compostos somente por íons, estes podem apresentar alta condutividade iônica, baixa volatilidade e não inflamabilidade, entre outras propriedades. Assim, líquidos com estas características são materiais interessantes para serem usados na área de eletroquímica (Ohno, 2011). A Figura 8 resume as propriedades dos líquidos iônicos e as diversas aplicações que podem ser encontradas na área da eletroquímica.

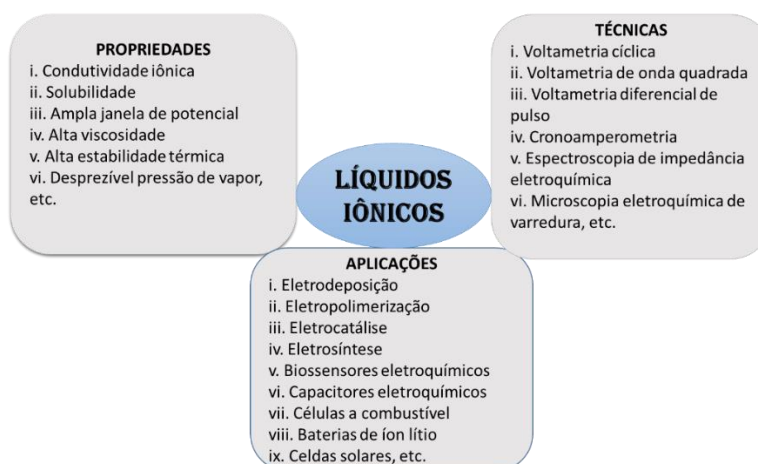


Figura 8. Propriedades dos LI, as técnicas eletroquímicas disponíveis e suas aplicações eletroquímicas. Modificado de Shiddiky e Torriero (2011).

Ampla literatura (incluindo livros e artigos) tem sido publicada, onde se descreve o uso dos LI na área de eletroquímica, como eletrólito para novos eletrodos de referência e dispositivos eletroquímicos como células a combustível, baterias e semicondutores. Da mesma forma, vários trabalhos descrevem o uso dos líquidos iônicos como solvente em processos de eletrodeposição de vários elementos reativos tais como Si, Ge, Ta e Al (Ohno, 2011), (Endres, Abbott e MacFarlane, 2008).

Outra importante aplicação é na incorporação em matrizes, sejam estas poliméricas ou de nanomateriais, visando desenvolver materiais compósitos com alta eficiência eletroativa para uso em biossensores, bioeletrodos e capacitores, entre outros. Em relação aos biossensores e bioeletrodos, os líquidos iônicos podem fornecer um microambiente adequado para as enzimas redox, a fim de manter a atividade enzimática e favorecer a transferência eletrônica direto do sítio ativo até o substrato metálico (Shiddiky e Torriero, 2011). A inclusão dos líquidos iônicos nestas matrizes pode ser realizada utilizando as técnicas de imobilização previamente apresentadas.

Na construção de híbridos entre LIs e nanomateriais de carbono, a combinação sinérgica de ambos componentes pode ser explorada em novos materiais eletroquímicos, tais como dispositivos armazenadores de energia, suportes utilizados para catálise e nanofiller em compósitos poliméricos. Este último, consiste em um agente de dopagem distribuído na matriz de um compósito, cujos elementos individuais tem no mínimo uma das suas dimensões em escala nanométrica (Tunckol, Durand e Serp, 2012).

Em geral, líquidos iônicos próticos apresentam marcantes diferenças em relação aos líquidos apróticos, dentre estas a presença de um próton permutável. Este fato é muito interessante para diversas aplicações, como solvente em reações conduzidas em meios ácidos ou como eletrólitos em células a combustível (Stoimenovski, Izgorodina e MacFarlane, 2010).

Apesar disto, as propriedades dos líquidos iônicos próticos dependem fortemente do seu grau de ionicidade, definido como o grau de transferência dos prótons do ácido à base. Para isto, considera-se que um sal é predominantemente iônico, quando pelo menos 99% dos componentes são ionizados, ou seja, o equilíbrio da Reação 4 é deslocado predominantemente para a direita (Stoimenovski, Izgorodina e MacFarlane, 2010).

Para determinar o grau de ionicidade, é comumente usada a regra de Walden, a qual relaciona a mobilidade iônica Λ com a viscosidade do líquido η , como mostra a Eq 1, onde C é uma constante de proporcionalidade dependente da temperatura (Pinkert *et al.*, 2011).

$$\Lambda\eta = C \quad (\text{Equação 1})$$

A partir da regra de Walden é possível obter o gráfico de $\text{Log } \Lambda$ vs. $\text{Log } \eta^{-1}$, comumente denominado de “*Walden plot*”, no qual é comparado o grau de ionicidade dos líquidos iônicos em relação a um padrão que é uma solução aquosa de KCl muito diluída.

Diversos trabalhos analisam a Walden plot e sua aplicação nos líquidos iônicos de formas relativamente diferentes, mas convergindo à definição de que valores próximos à linha do padrão de KCl correspondem a líquidos iônicos com alto grau de ionicidade; abaixo desta linha se atribui a líquidos iônicos de baixa ionicidade e acima da mesma, a líquidos superiônicos (Angell, Byrne e Belieres, 2007), (Belieres e Angell, 2007), (Fraser *et al.*, 2007), (Zhao *et al.*, 2008), (Pinkert *et al.*, 2011), (Song *et al.*, 2012), (Sun *et al.*, 2012), (Xu *et al.*, 2016).

Além disso, quando um líquido iônico está muito perto da linha ideal pode ser bem representado como um conjunto de íons independentes, no qual há ausência de interações íon-íon (Yoshizawa, Xu e Angell, 2003).

Outros trabalhos questionam a aplicação desta regra para líquidos iônicos puros baseada numa solução diluída de KCl; propondo alternativamente a “regra de Walden fracionada”. Esta regra é apresentada na Eq 2:

$$\Lambda_m^0 \eta^\alpha = C' \quad (\text{Equação 2})$$

Onde Λ_m^0 é a condutividade molar a diluição infinita e α o expoente obtido da inclinação da correlação linear da condutividade e a viscosidade, considerada não como a unidade mas sim como um valor próximo a 0,92 (Schreiner *et al.*, 2010). Outra forma de avaliar o grau de ionicidade, é medindo-se a capacidade de transferência protônica por meio da determinação de valores de pK_a de soluções aquosas de líquidos iônicos (Stoimenovski, Izgorodina e MacFarlane, 2010) (Adam, Bravo e Mancini, 2014).

Enquanto à aplicação dos líquidos iônicos, atualmente o principal interesse está voltado no desenho de novos solventes (Ohno, 2011). Isto é devido à propriedade de volatilidade desprezível dos líquidos iônicos, chegando assim a serem chamados de solventes verdes, os quais apresentam um alto potencial para substituir os solventes orgânicos. Nesse sentido, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de avaliar a toxicidade e biodegradabilidade de diversos líquidos iônicos. Em geral os próticos tem se apresentado muito menos tóxicos que os apróticos. No caso dos próticos o tamanho do ânion tem maior influência do que o cátion com respeito à atividade da microbiota do solo avaliado (Peric *et al.*, 2013), (Peric *et al.*, 2014). Esta característica é importante quando se pretende combinar líquidos iônicos com biomoléculas e ainda mais quando se deseja alguma característica específica nos líquidos, como polaridade, hidrofobicidade, presença de ligações de hidrogênio, viscosidade, etc. É por isto que os líquidos iônicos são considerados compostos versáteis e modeláveis às necessidades das aplicações.

De forma emergente, está sendo avaliada a utilização de líquidos iônicos como solvente, estabilizante e melhorador da atividade de biomoléculas. A água tem sido quase o único solvente no qual as biomoléculas são solubilizadas e na qual ocorrem as reações enzimáticas. No entanto, para dispositivos de longa vida, certos inconvenientes são observados quando o sistema está em meio aquoso, tais como: a volatilidade da água, a faixa de temperatura limitada e a faixa de pH muito estreita para a estabilização da proteína (Armand *et al.*, 2009).

Os líquidos iônicos vêm com o potencial para superar estes problemas, e para isto há pesquisas em desenvolvimento a fim de entender o processo de solubilização das biomoléculas nestes líquidos, também como permitir a condução de reações enzimáticas estáveis (Armand *et al.*, 2009). Assim, diversos trabalhos estão baseados no estudo da solubilidade e estabilidade de biomoléculas em líquidos iônicos (Zhao, 2010) (Vasanthan *et al.*, 2012) (Tavares, Rodriguez e Macedo, 2013) (Patel, Kumari e Khan, 2014) (Tischer *et al.*, 2014) (Tomlinson *et al.*, 2014).

Entretanto ainda não há informação suficiente a respeito das consequências biológicas da presença de líquidos iônicos nos meios onde as biomoléculas estão presentes. A dissolução de enzimas e a manutenção da sua efetiva reatividade requer a preservação da sua estrutura altamente ordenada, condição difícil de ser alcançada com líquidos iônicos

comuns, sendo que um mínimo número deles tem a capacidade de solubilizar proteínas sem desnaturá-las (Armand *et al.*, 2009).

Até o presente momento têm sido desenvolvidas três formas diferentes para solubilizar biomoléculas em líquidos iônicos. Na Figura 9 a seguir apresentam-se estas estratégias.

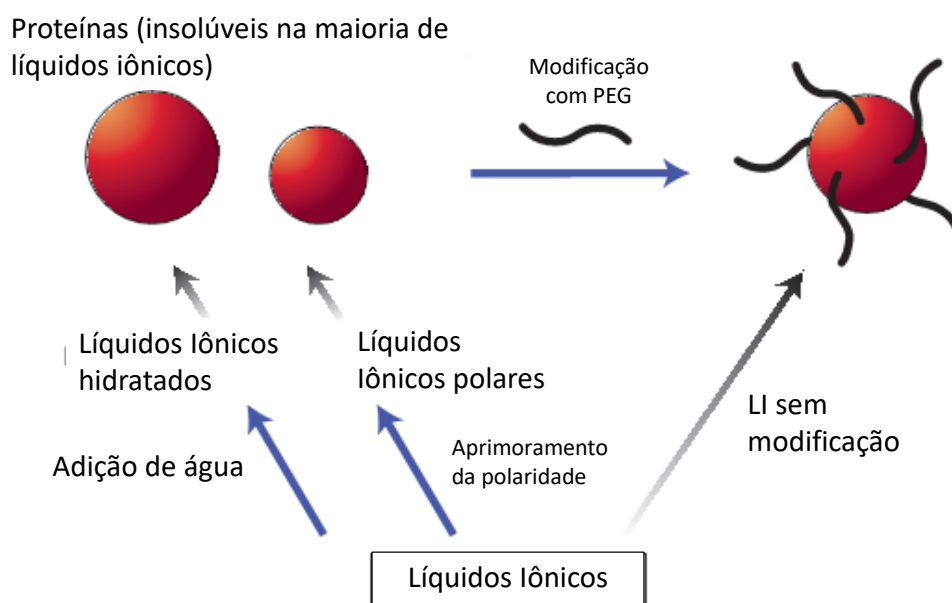


Figura 9. Estratégias para solubilização de proteínas em líquidos iônicos. (PEG: polietileno glicol).

Modificado de Armand *et al.* (2009).

A primeira consiste na solubilização das biomoléculas diretamente nos líquidos iônicos, procurando sempre utilizar os mais polares. Atualmente, já foi possível dissolver celulose em líquidos iônicos da série de alquilfosfatos, encontrando nestes, excelentes candidatos para a extração de polissacarídeos a partir de biomassas obtidas naturalmente (Ohno, 2011). Igualmente, no nosso grupo de pesquisa, Santos *et. al.* (2018) estão estudando a extração de lignina a partir de fibras naturais com a adição de líquidos iônicos próticos como acetato de 2-hidroxietilamônio.

A segunda estratégia utilizada é a hidratação de líquidos iônicos com adição de pequenas quantidades de água, retendo as propriedades do líquido iônico utilizado. Estas misturas são chamadas de líquidos iônicos hidratados, nas quais a atividade química da água se mantém muito baixa pois todas as moléculas de água estão solvatando fortemente os íons (Armand *et al.*, 2009). O citocromo *c* foi usado como uma enzima modelo para avaliar sua solubilidade em líquidos iônicos apróticos hidratados, encontrando que a melhor

solubilidade e estabilidade da enzima foi obtida no fosfato hidrogênio de colina com 20% de água (em peso). Assim, este líquido iônico apresentou potencial como um solvente promissor para manter a estrutura altamente ordenada, a atividade e estabilidade térmica do citocromo *c* (Fujita, MacFarlane e Forsyth, 2005). Isto revelou que a estrutura secundária e as interações moleculares na fenda heme do citocromo *c* foram fortemente influenciadas pela cosmotropicidade (íons fortemente hidratados que aceleram a estruturação da água) dos ânions dos líquidos iônicos (Fujita *et al.*, 2007). Esta informação é importante para a escolha dos melhores líquidos iônicos no que respeita à solubilização da catalase, também uma metaloenzima com presença de grupos heme.

Finalmente, a terceira forma de solubilização é a partir da modificação com poliéteres dos aminoácidos superficiais das proteínas. Entre estes têm-se, PEG (polietileno glicol), PEO (óxido de polietileno) e alguns éteres cíclicos que apresentam efeitos semelhantes ao PEG. As proteínas modificadas são solúveis em muitos líquidos iônicos devido à excelente afinidade das cadeias de poliéter com os íons dos líquidos (Armand *et al.*, 2009). A modificação com poliéteres é bastante efetiva, mas é bastante problemática para preparar e separar as proteínas modificadas das cadeias de poliéter que não reagiram (Fujita *et al.*, 2007).

Quando se trabalha com biomoléculas em contato com líquidos iônicos é interessante falar em fenômenos de cosmotropicidade e caotropicidade. Estes conceitos derivam da interação de íons com a água e seu efeito na rede molecular da mesma. Assim, se diz que um íon é cosmotrópico quando em geral estabiliza a estrutura da água, e um íon é caotrópico quando a desestabiliza. Isto significa que os íons podem favorecer ou quebrar as ligações hidrogênio das moléculas de água. Quando esses íons estão presentes em um meio que contém biomoléculas, seu efeito cosmotrópico ou caotrópico vai afetar a estrutura e com isto a estabilidade da biomolécula. Para entender melhor este fenômeno deve-se levantar uma série de Hofmeister. Na Figura 10 observa-se uma série de Hofmeister geral a qual contém tanto cátions quanto ânions.

Os efeitos de Hofmeister, ou íon específico, são geralmente ignorados mas estão sempre presentes na biologia (Boström *et al.*, 2003). A série Hofmeister foi notada pela primeira vez em 1888, e classifica a influência relativa dos íons no comportamento físico de uma ampla variedade de processos aquosos nos que se observa o dobramento de proteínas (Zhang e Cremer, 2006).

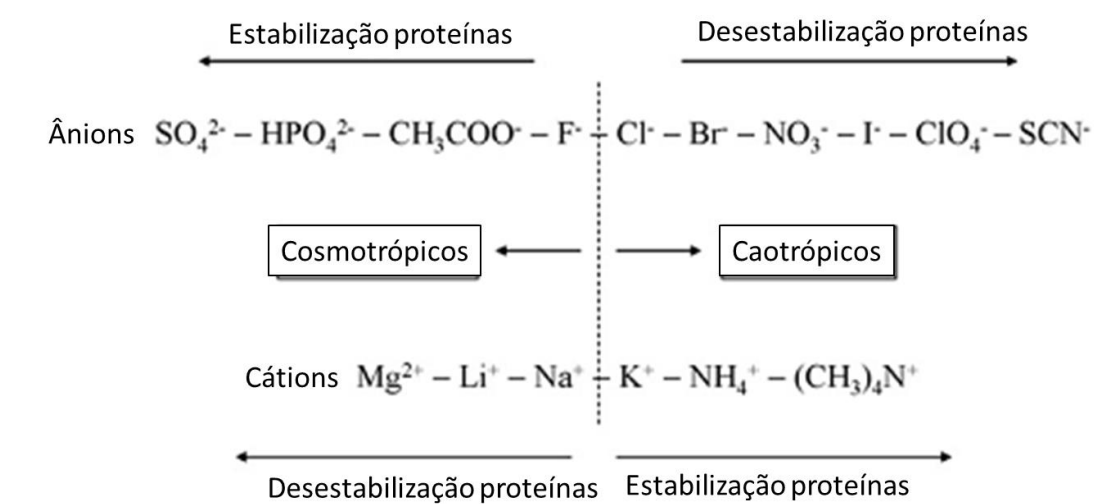


Figura 10. Série de Hofmeister e classificação dos íons entre cosmotrópicos e caotrópicos. Modificado de Yang (2009).

Como observado na Figura 10 os ânions cosmotrópicos estabilizam as proteínas, porém os cátions cosmotrópicos a desestabilizam. Já os ânions caotrópicos desestabilizam as proteínas e os cátions caotrópicos as estabilizam. Isto ocorre, porque os ânions cosmotrópicos favorecem à enzima a minimizar sua área superficial exposta ao solvente, o que leva a aquisição de um estado mais compacto nativo devido à força motriz restaurada do efeito hidrofóbico na enzima (Boström, Williams e Ninham, 2004).

Os cátions em geral, mostram um efeito menos forte comparado aos ânions da mesma densidade de carga elétrica porque ânions são mais polarizáveis e se hidratam mais fortemente (Boström, Williams e Ninham, 2004).

O conceito de polarizabilidade se refere às forças que um íon apresenta próximo a uma interface onde não somente um potencial eletrostático é experimentado, mas também um potencial de dispersão iônico altamente específico (Boström *et al.*, 2003). A altas concentrações do sal o potencial de dispersão iônica vem a dominar (Boström, Williams e Ninham, 2004).

O ânion caotrópico não tem somente uma baixa afinidade pela água mas também tem uma alta polarizabilidade, portanto vai preferir se ligar à interface proteína-água e assim causará a desestabilização da proteína (Boström, Williams e Ninham, 2004).

Na Tabela 1 se resumem as características dos íons segundo seu caráter cosmotrópico ou caotrópico.

Tabela 1. Classificação dos íons entre cosmotrópicos e caotrópicos. Modificado de Yang (2009).

	Íons cosmotrópicos	Íons caotrópicos
Tamanho	Pequeno	Grande
Densidade de carga superficial	Alta	Baixa
Hidratação	Forte	Fraca
Efeito na estrutura da água	Formador da estrutura	Quebrador da estrutura

A partir destas observações os líquidos iônicos escolhidos para esta tese de doutorado foram do grupo dos próticos, por ser esta uma área inédita por explorar e por se apresentarem promissores na melhora da transferência de elétrons nos bioeletrodos.

Para a primeira etapa de imobilização da enzima catalase, utilizando as técnicas combinadas LBL e ECD, foi escolhido o líquido iônico acetato de pentaetilenohexamônio ([PEHA][Ac]) por possuir seis grupamentos amônio, interessantes de serem explorados e de conhecer seus efeitos na eletroquímica e cinética da catalase.

Já para a segunda etapa de imobilização, utilizando o método CLEA foram escolhidos quatro líquidos da série do ânion [m-2HEA⁺] por serem os que segundo observações de Santos (2018) apresentaram o melhor resultado de condutividade. Com estes líquidos foi possível construir uma série de Hofmeister e assim, estes foram classificados entre caotrópicos e cosmotrópicos, conhecendo seu efeito frente a estabilidade da enzima catalase. Adicionalmente, o [PEHA][Ac] também foi testado usando esta metodologia de imobilização.

METODOLOGIA

REAGENTES

A catalase (EC 1.11.1.6) de fígado bovino foi fornecida pela Sigma-Aldrich e usada sem purificações adicionais. Para a síntese dos líquidos iônicos, foram usados os ácidos, acético (100%) e pentanoico (98%) da Merck, propanoico (99,5%) e butanoico (99%) da Sigma-Aldrich. As bases foram pentaetilenohexamina da Sigma-Aldrich e N-metil-2-hidroxi-etilamina (2-(metilamino)etanol) da Riedel de Haen (99%). O peróxido de hidrogênio (30%) da marca Merck, o fosfato de sódio monobásico e dibásico foram fornecidos pelas empresas Fmaia e Química Moderna, respectivamente. Para a síntese dos CLEAs foram usados, o glutaraldeído (25%), grafite da marca Merck e dyglime ($\geq 99,5\%$) da Sigma-Aldrich. Todos os reagentes foram usados sem purificações adicionais.

SÍNTESE DOS LÍQUIDOS IÔNICOS

Para a síntese dos líquidos iônicos utilizados neste trabalho, seguiu-se o mesmo procedimento descrito por Álvarez et al. (2010). Proporções equimolares de ácido e de base puros foram usados. A reação de neutralização ácido-base de Brønsted foi conduzida da maneira descrita a seguir. O ácido foi adicionado gota a gota sobre a base, sob agitação constante em um reator de vidro a temperatura controlada de 10 °C, e em atmosfera inerte de nitrogênio. Após a síntese, borbulhou-se nitrogênio no líquido iônico para eliminar quantidades de reagentes não consumidos. Posteriormente o líquido iônico foi levado ao rotaevaporador por 24 horas a no máximo 60 °C, a fim de eliminar ainda mais os reagentes residuais que pudessem não ter reagido e resíduos de água que pudessem estar presentes. Na Figura 11 a seguir se apresenta o sistema de síntese utilizado para os líquidos iônicos utilizados nesta tese.



Figura 11. Sistema reacional dos líquidos iônicos sintetizados nesse trabalho

Os líquidos iônicos práticos sintetizados e seus códigos encontram-se na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Líquidos iônicos sintetizados nesta tese e suas respectivas nomenclaturas.

CÓDIGOS	Líquido iônico
[m-2HEA][Ac]	acetato de N-metil-2-hidroxi-etil-amônio
[m-2HEA][Bu]	butanoato de N-metil-2-hidroxi-etil-amônio
[m-2HEA][Pr]	propanoato de N-metil-2-hidroxi-etil-amônio
[m-2HEA][Pe]	pentanoato de N-metil-2-hidroxi-etil-amônio
[PEHA][Ac]	Acetato de pentaetilenohexamônio

CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DOS LÍQUIDOS IÔNICOS SINTETIZADOS

O [PEHA][Ac] e seus precursores foram caracterizados por FTIR com o auxílio do equipamento da Shimadzu Prestige modelo 21. Também foi realizada a medida de FTIR do [m-2HEA][Ac]. Espectros infravermelho dos outros líquidos desta série não foram realizados, pois já foram publicados em outros trabalhos do grupo de pesquisa ATLAB, na seção de resultados serão cuidadosamente citados.

Medidas de termogravimetria (TG) foram realizadas com o equipamento Shimadzu TGA-50 em atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 mL min⁻¹). As medidas foram realizadas em uma panela aberta de alumina, aquecida desde temperatura ambiente até 850 °C, à taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹. A temperatura de decomposição térmica (Td) foi medida quando uma perda de 5% em massa foi observada.

Medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos precursores do líquido iônico foram realizadas com o equipamento da Marca Seiko, Modelo Exstar DSC-6220, entre 25 a 590 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob fluxo de 50 mL min⁻¹ de nitrogênio. A medida de DSC para o [PEHA][Ac] foi realizada usando o equipamento da marca Shimadzu DSC-50 em um sistema de atmosfera de nitrogênio na faixa de temperaturas de 25 a 200 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹. Esta taxa foi menor com o objetivo de obter mais detalhes dos fenômenos que poderiam estar ocorrendo no líquido iônico. Esta medida foi realizada em uma panela selada usando um ciclo de temperatura de aquecimento e posterior resfriamento.

A quantidade de água nos líquidos iônicos foi controlada com o titulador volumétrico de Karl-Fischer da Mettler Toledo Modelo V20. A viscosidade de todos os líquidos iônicos e suas misturas binárias com água foram realizadas com um viscosímetro da Anton Paar modelo SVM3000 (incerteza relativa de 3%). A condutividade elétrica foi medida com um condutivímetro da TecnoPON modelo AC200 na faixa de temperatura de 10 a 60 °C. A água utilizada para todas as composições de líquido iônico foi purificada em sistema ultrapuro MilliQ (condutividade de 0,05 µS cm⁻¹, 31 °C); todas as misturas foram preparadas gravimetricamente.

CONSTRUÇÃO DOS BIOELETRODOS

Desenvolvimento do bioeletrodo pelas técnicas layer by layer (LBL) e deposição eletroquímica

Todos os procedimentos eletroquímicos foram realizados no potenciostato/galvanostato Autolab da Metrohm, modelo PGSTAT-128N, com os softwares NOVA e GPES. A célula eletroquímica utilizada em todos os experimentos foi constituída de um copo de vidro Pyrex®, de capacidade volumétrica de 50 mL (Figura 12). A célula possui uma tampa com orifícios para três eletrodos e para a entrada e saída de gás. Como eletrodos de trabalho (E_w) foram utilizados os substratos metálicos que serão modificados para a construção dos bioeletrodos. Utilizou-se como eletrodo auxiliar (E_a) uma espiral de platina embutida em vidro e como eletrodo de referência (E_R) Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl – Metrohm).

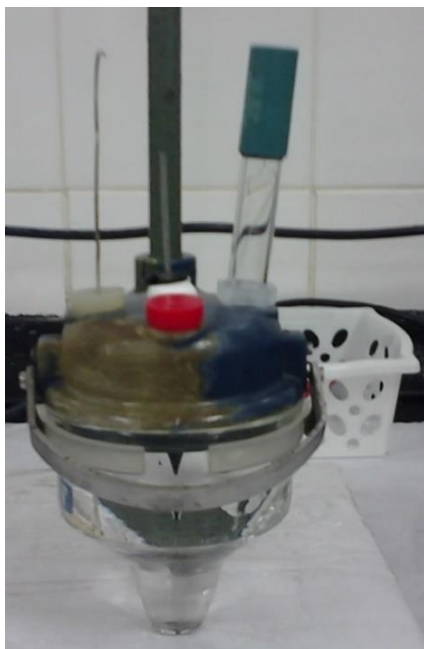


Figura 12. Célula eletroquímica utilizada.

Preparação dos materiais eletródicos

- Eletrodo de titânio

Para a construção do bioeletrodo, uma placa de titânio com área geométrica de 1 cm^2 foi inicialmente lixada com o auxílio de lixas de diferentes granulometrias. Após este procedimento a placa foi tratada durante 15 min em solução de ácido oxálico (10% em massa) previamente aquecida. A placa foi então secada e pesada. Sobre esta superfície foi realizado o processo de deposição eletroquímica e layer by layer da catalase e o [PEHA][Ac].

- Eletrodo de titânio modificado

Uma placa de titânio com área geométrica de 1 cm^2 foi inicialmente pré-tratada tal como descrito no item anterior e modificada com uma tinta carbonácea. Esta tinta foi preparada a partir da mistura de 5 mg de carbono Vulcan, 150 μL de Nafion® e 50 μL de álcool isopropílico. Esta composição foi misturada até evaporar todo, observado visualmente, o solvente, e após adições subsequentes de algumas gotas de álcool isopropílico (2 a 3 por vez, a depender da quantidade de sólido), foi depositado por *casting* sob o substrato de titânio. O eletrodo resultante (Figura 13) foi deixado em secagem por um dia e posteriormente submetido ao processo de deposição eletroquímica e layer by layer de catalase e o [PEHA][Ac].



Figura 13. Eletrodo de titânio modificado

- Eletrodo de carbono vítreo

O eletrodo de carbono vítreo (CV) ($\varnothing = 2$ mm), antes de cada eletrodeposição, foi polido com pasta de alumina de 0,3 e 0,05 μm em tecido específico para polimento. Após esta etapa, o eletrodo foi submetido a um processo de limpeza eletroquímica. Neste processo o eletrodo foi ciclado em solução de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹ em uma janela de potenciais de -0,5 a 1,3 V e uma velocidade de varredura de 3 V s⁻¹. Quando necessário, o eletrodo também foi submerso em uma solução sulfonítrica durante 10 min no máximo. Para finalizar o processo de limpeza, o eletrodo foi sonicado em acetona e depois em água ultrapura para remover partículas absorvidas.

Desenvolvimento do bioeletrodo

O método usado neste trabalho, encontra-se ilustrado na Figura 14 e consiste nos seguintes passos: 1) eletro-oxidação do líquido iônico a partir de 15 ciclos de varredura no eletrodo de trabalho, imerso em uma solução diluída de [PEHA][Ac] (concentração de 5 mmol L⁻¹), em meio de tampão fosfato. A faixa de potencial utilizada foi de 0 a 2,0 V com uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. 2) Imersão do eletrodo, previamente modificado no passo 1, em uma solução de catalase de concentração de 8 mg mL⁻¹ em meio de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0), ciclando entre os potenciais -0,7 a 0,7 V durante 15 ciclos, em uma velocidade de 50 mV s⁻¹ para a deposição eletroquímica da enzima. 3) Imersão do eletrodo modificado em uma solução aquosa de líquido iônico (73% m/m) por 10 minutos, visando promover as interações eletrostáticas entre a carga positiva do [PEHA][Ac] e a carga negativa da enzima (pI 5,4). Posteriormente, o eletrodo resultante foi lavado em tampão fosfato para remover o excesso de líquido iônico e novamente submerso na solução de catalase. Os passos 2 e 3 foram sequencialmente repetidos até a obtenção de respostas estáveis das correntes de picos. Finalmente, o bioeletrodo resultante CV/([PEHA][Ac]/CAT)_n foi armazenado a 4 °C em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0) quando não estava em uso. Este processo de preparação foi uma modificação do trabalho proposto por Saadati *et al.* (2012).

Todas as caracterizações eletroquímicas foram realizadas em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. A atividade eletrocatalítica do eletrodo modificado para a redução de peróxido de hidrogênio foi avaliada usando a técnica de voltametria cíclica nas concentrações de

0,22, 0,44, 0,99 e 1,1 mmol L⁻¹ em meio de tampão fosfato, na janela de potencial de -0,7 a 0,7 V e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, baseado no trabalho de Saadati *et al.*, (2012).

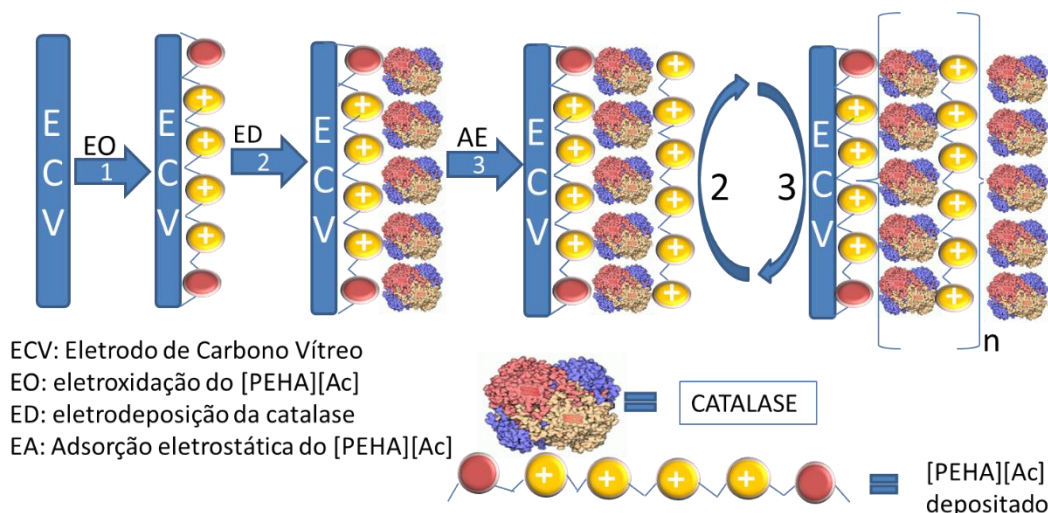


Figura 14. Esquema do processo de construção do bioeletrodo depositando catalase e [PEHA][Ac] na superfície de carbono vítreo pelas técnicas layer by layer e deposição eletroquímica. Baseada em Saadati *et al.* (2012).

Desenvolvimento do bioeletrodo pela técnica de entrecruzamento de enzimas agregadas (CLEA)

Esta seção está dividida em três partes: A primeira, referente à determinação da atividade e solubilidade da enzima nos líquidos iônicos. A segunda, refere à síntese dos CLEAs e sua caracterização morfológica. E a terceira, corresponde a sua caracterização eletroquímica. A seguir serão detalhados estes procedimentos.

Atividade e solubilidade da catalase nos líquidos iônicos

O objetivo desta etapa foi determinar o efeito dos líquidos iônicos sob a atividade e a solubilidade da catalase. Os procedimentos que serão descritos a seguir foram realizados somente para os líquidos da série do [m-2HEA⁺]. Para o líquido [PEHA][Ac] não foi possível realizá-los, pois o mesmo apresentou alta absorvância no comprimento de onda

estudado, mesmo em soluções muito diluídas. Essa característica do [PEHA][Ac] muito dificulta as medidas de atividade da enzima pelo método espectrofotométrico.

A série do [m-2HEA⁺] foi escolhida a partir de resultados obtidos por (SANTOS, 2018) no qual encontrou-se que esta foi uma das séries de líquidos iônicos próticos, que apresentou maior condutividade.

Assim, para conhecer o efeito dos líquidos iônicos foi necessário inicialmente determinar a atividade da enzima na ausência deles. O procedimento será detalhado a seguir.

Determinação de atividade da enzima catalase em ausência de líquidos iônicos

A Sigma-Aldrich define uma unidade de atividade como segue. Uma unidade de catalase decompõe 1,0 μ mole de H₂O₂ por minuto, a pH 7,0 e 25 ° C, enquanto a concentração de H₂O₂ cai de 10,3 para 9,2 mmol L⁻¹. A taxa de desaparecimento de H₂O₂ é seguida observando-se a taxa de diminuição da absorvância a 240 nm (simplificado para A₂₄₀).

Para realizar a medida são necessárias duas soluções, uma de peróxido de hidrogênio 0,036% (m/m) e uma de catalase de 100 UI mL⁻¹. Para preparar a solução de peróxido de hidrogênio, toma-se uma alíquota de 29 μ L de H₂O₂ concentrado (30%) e leva-se a um balão volumétrico de 25 mL; o volume é completado com tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. Esta solução frente ao branco de tampão fosfato deve apresentar uma absorvância entre 0,550 e 0,520 unidades no comprimento de onda de 240 nm. Caso a absorvância seja menor, deverá ser adicionado mais peróxido de hidrogênio; caso a absorvância seja maior, deverá adicionar-se mais tampão, até atingir o valor na faixa desejada.

Para a preparação da solução de catalase a partir do pó liofilizado, deve-se inicialmente preparar uma solução de 10 mg mL⁻¹ em tampão fosfato frio, aproximadamente 4 °C (esta solução fica ligeiramente turva). Imediatamente antes de usar, esta solução deve ser diluída a aproximadamente 100 UI mL⁻¹ em tampão fosfato frio.

Para realizar a medida foi usado um espectrofotômetro UV-VIS de dois feixes de luz, CARY 1E marca VARIAN, com cubeta de quartzo, usando como branco o tampão fosfato. Pipetou-se 2,90 mL de solução de H₂O₂ dentro da cubeta, no momento em que ia ser iniciada a medida; não deve ser colocado o H₂O₂ antes do início da medida, pois o

mesmo é fotossensível. Quando a A_{240} ficou constante adicionou-se 0,10 mL da solução diluída da catalase, imediatamente a mistura foi homogeneizada por inversão da cubeta e se registrou o tempo que a A_{240} caiu de 0,45 a 0,40 unidades. As medidas foram feitas por triplicata para determinar a atividade da enzima.

Com o uso da Eq 3 determinou-se a atividade da enzima:

(Equação 3)

$$\frac{UI}{mL\ enzima} = \frac{3,45 * df}{t * 0,1}$$

Onde 3,45 equivale à decomposição de 3,45 μmol de H_2O_2 em uma mistura de 3,0 mL, que causa um decrescimento na A_{240} de 0,45 a 0,40; df é o fator de diluição; t são os minutos consumidos para a A_{240} decrescer desde 0,45 a 0,40; 0,1 equivale ao volume de solução da catalase adicionado na cubeta.

Com a Eq 4 obtém-se a atividade da enzima em unidades por miligrama de sólido:

$$\frac{UI}{mg\ sólido} = \frac{UI/mL\ enzima}{mg\ sólido/mL\ enzima} \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo que os $mL\ enzima$ fazem referência aos mililitros de solução da enzima e $mg\ sólido$ aos miligramas de sólido nela dissolvidos.

Com a Eq 5 obtém-se a atividade da enzima em unidades por miligrama de proteína:

$$\frac{UI}{mg\ proteína} = \frac{UI/mL\ enzima}{mg\ proteína/mL\ enzima} \quad (\text{Equação 5})$$

O resultado de atividade da catalase foi considerada como branco e usou-se como referência para comparar com os resultados das medidas de atividade da enzima na presença dos líquidos iônicos.

Determinação de atividade e solubilidade da enzima catalase na presença dos líquidos iônicos da série [m-2HEA⁺].

Para realizar as medidas de atividade na presença de líquidos iônicos foi necessário inicialmente conhecer a absorvância dos mesmos no comprimento de onda definido (240 nm). Assim, foram registrados os espectros de UV-Vis para os quatro líquidos iônicos testados da série do [m-2HEA⁺]. Estas medidas foram realizadas para soluções diluídas de 1:29 de líquido iônico: para tampão fosfato, 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, (v/v). Para a medida de absorvância foi utilizado um espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UV-1800.

Adicionalmente, foram realizadas medidas de solubilidade da enzima em misturas binárias dos líquidos iônicos em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹. Estas misturas foram realizadas gravimetricamente nas proporções de 10, 20, 30, 40, 50 e 60% de líquido iônico por água, em massa; para cada uma destas misturas foram adicionados 10 mg mL⁻¹ de catalase sólida em solução. A solubilização total da enzima foi confirmada após o desaparecimento de sólidos suspensos na solução.

O pH das soluções de líquido iônico foi também determinado, para isto foi utilizado o pHmetro marca Quimis modelo Q400AS. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

Finalmente, para realizar as medidas de atividade da catalase na presença de líquidos iônicos foram necessárias algumas modificações no procedimento previamente descrito. Para isto, foram preparadas as seguintes soluções: Duas soluções de líquido iônico em tampão fosfato para cada concentração determinada. Em uma delas foi dissolvida a catalase na concentração de 10 mg mL⁻¹ e a outra foi deixada sem alteração. As soluções com e sem catalase foram diluídas até 100 UI mL⁻¹ de enzima. A solução de líquido iônico sem catalase foi utilizada como branco na medida posterior. Também foi preparada uma solução diluída de peróxido de hidrogênio tal como foi descrito anteriormente em tampão fosfato, mas sem a presença de líquido iônico.

Assim, foram realizadas duas linhas bases, a primeira somente com tampão fosfato para verificar e ajustar a concentração da solução de peróxido de hidrogênio; a segunda utilizada no momento da medida de atividade. Esta segunda linha base foi definida com a solução diluída de líquido iônico em tampão.

Por fim, para realizar a medida após definir a segunda linha base, foram colocados 2,9 mL da solução diluída de peróxido de hidrogênio (0,036%) em tampão, em uma cubeta e adicionou-se 0,1 mL da solução diluída de catalase com líquido iônico. A decomposição do H_2O_2 foi acompanhada medindo o tempo que demorou em diminuir a absorvância entre 0,45 e 0,40 unidades no comprimento de onda de 240 nm. Estas medidas foram realizadas em triplicata; as equações 3 até 5 foram aplicadas para calcular a atividade da catalase na presença de líquido iônico em diferentes composições.

Com os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, foi possível determinar o efeito do líquido iônico na atividade da enzima e na solubilidade da mesma. A partir desses resultados, foram escolhidos os líquidos e composições mais apropriados para a síntese dos CLEAs de catalase.

Síntese dos materiais catalíticos CLEAs

Foram sintetizados quatro tipos de materiais catalíticos a partir da metodologia CLEA. O primeiro, unicamente com catalase, foi denominado de CAT-I; o segundo CAT-G, contendo na sua mistura grafite e catalase; o terceiro CAT-[PEHA][Ac], contendo catalase e o líquido iônico [PEHA][Ac]; e por último o CAT-mA, contendo catalase e o líquido iônico [m-2HEA][Ac].

Para a síntese dos materiais CAT-I e CAT-G o procedimento foi o seguinte. Inicialmente foi solubilizada a catalase em tampão na concentração de $80634 \text{ unidades mL}^{-1}$, o que equivale a aproximadamente 300 mg de catalase solubilizados em 5 mL de tampão fosfato. Quando sintetizado o CAT-G, foi adicionado 30% em massa de grafite com relação à massa de catalase. Quando sintetizados o CAT-[PEHA][Ac] e o CAT-mA, 300 mg de catalase foram dissolvidos em uma solução 30% de líquido iônico em tampão fosfato.

Cada solução foi colocada em um reator encamisado de vidro e com capacidade de 50 mL, mantendo-se a temperatura do sistema em 4°C . Depois, foram adicionados lentamente 15 mL de diglyme, que atua como agente precipitante. Esta mistura de reação ficou em agitação lenta por 30 minutos. Após este tempo e mantendo-se a agitação, foi adicionado lentamente 1 mL de glutaraldeído (25%) que atuou como agente de entrecruzamento, deixou-se reagir por uma hora. O volume total de reação foi de 21 mL.

Ao término da reação, a mistura foi centrifugada para separar o CLEA sintetizado. Sucessivas lavagens foram realizadas com tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; após cada lavagem o material foi centrifugado a 5000 rpm. Quando não estavam em uso os materiais catalíticos eram armazenados em tampão fosfato a 4 °C.

Estes CLEAs foram caracterizados por FTIR e por MEV. Os espectros de infravermelho foram registrados no equipamento de marca Shimadzu modelo IRAffinity-1; as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr. As medidas foram realizadas no grupo de pesquisa Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular (GPSQ). As microscopias foram realizadas no equipamento JEOL modelo JSM-6390 LV da Thermo Scientific no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LAMUME) localizado no Instituto de Física da Universidade Federal da Bahia. Para estas medidas os materiais catalíticos foram recobertos com um banho de ouro.

Caracterização eletroquímica dos CLEAs sintetizados

Todos os procedimentos eletroquímicos foram realizados no potenciostato /galvanostato Autolab da Metrohm, modelo PGSTAT-128N, com o software GPES. A célula eletroquímica utilizada em todos os experimentos foi constituída de um copo de vidro Pyrex®, de capacidade volumétrica de 80 mL (Figura 15). A célula possui uma tampa com orifícios para três eletrodos e para a entrada e saída de gás. Utilizou-se como eletrodo auxiliar (E_a) uma placa de platina embutida em vidro e como eletrodo de referência (E_R) um fio de Ag polido contendo uma camada de óxido de prata e referenciado como Ag/Ag₂O. Finalmente o eletrodo de trabalho consistiu de cada bioeletrodo construído da seguinte forma: o material catalítico CLEA foi compactado dentro do orifício do eletrodo oco (RDE.BLANK) da marca Metrohm com diâmetro interno de 5 mm. Este eletrodo mostra-se na Figura 16 onde é possível observar que o mesmo é vazio e neste espaço é colocada a amostra que se deseja analisar.

Para assegurar que todo o material catalítico fica dentro do orifício, realizou-se uma mistura de aproximadamente 100 mg do CLEA em estudo com 40 µL de tampão fosfato e 10 µL de Nafion®. Essa combinação foi homogeneizada, colocada dentro do orifício do eletrodo oco e deixado para secar por no mínimo uma hora.



Figura 15. Sistema eletroquímico usado na caracterização dos bioeletrodos CLEA. Eletrodo de trabalho (material catalítico introduzido no eletrodo oco), eletrodo de referência (fio de prata) e contra eletrodo (placa de platina).

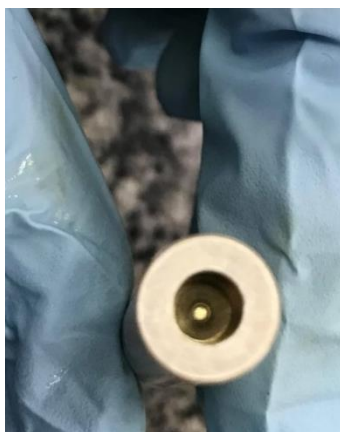


Figura 16. Eletrodo oco da Metrohm com diâmetro interno de 5 mm. Referência: RDE.BLANK 80415.

Inicialmente, foram realizadas medidas de voltametria cíclica para conhecer o sistema, onde a janela de potenciais foi ampliada de forma discreta até encontrar a faixa ótima de trabalho. Todas estas medidas foram realizadas em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. Estudos de velocidade de varredura também foram realizados por voltametria cíclica, onde foi possível determinar a etapa limitante no processo eletroquímico para cada bioeletrodo.

Finalmente, para a caracterização eletrocatalítica de cada bioeletrodo, o mesmo foi colocado em solução do substrato peróxido de hidrogênio; sua resposta foi observada por voltametria de onda quadrada. Para estas medidas, foram determinados previamente os melhores parâmetros de medida: frequência (f , Hz), amplitude (A , V) e incremento de potencial (ΔE , mV). Para isto foram realizadas medidas de forma univariada, assim foram mantidos dois parâmetros, enquanto só um foi variado.

Após definir as melhores condições para o primeiro sistema CAT-I, com objetivo de comparar os resultados nos quatro sistemas, as mesmas condições de medidas foram mantidas iguais para todos os outros bioeletrodos. As medidas foram realizadas no intervalo da janela de potencial igual à escolhida na voltametria cíclica e um volume total de 50 mL de meio reacional.

Prévio às medidas, o sistema foi purgado com argônio por 15 min. Após este tempo, continuou-se com a adição de argônio em um menor fluxo, mas mantendo-o borbulhando dentro da solução. Desta forma assegurava-se que a cada adição de H_2O_2 a solução iria ficar homogênea em relativamente pouco tempo; nestas mesmas condições foram realizadas as medidas de dez brancos na ausência de H_2O_2 .

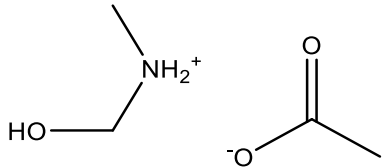
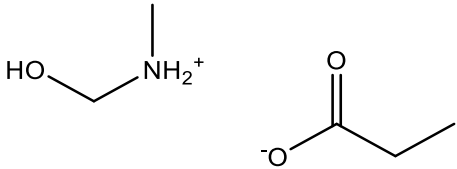
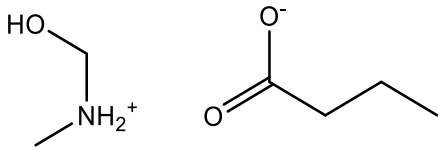
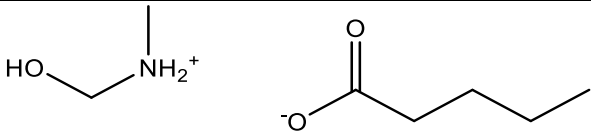
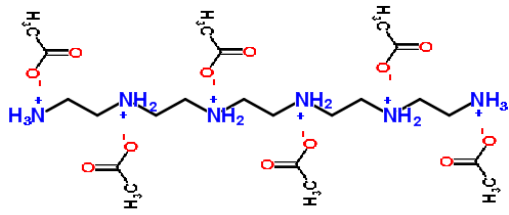
Para a realização da curva eletrocatalítica foram adicionadas de forma sucessiva alíquotas de 5 μL de H_2O_2 . Após cada adição de H_2O_2 eram obtidos voltamogramas de onda quadrada até observar-se que o sistema tinha chegado à estabilização da corrente, chamada também de corrente de estado estacionário (I_{ss} do inglês *steady stationary current*). Após atingir o estado estacionário, uma nova alíquota de 5 μL de H_2O_2 era adicionada e assim sucessivamente até alcançar uma condição assintótica, ou de *plateau*. Nesta condição a enzima estava provavelmente saturada e nenhuma adição de H_2O_2 levava a um aumento na corrente resultante; quando o sistema atingia este estado a medida podia ser finalizada. Para tratamento de dados, eram obtidas curvas de I_{ss} em função da concentração de peróxido de hidrogênio. Com esta curva, foram determinados os parâmetros cinéticos K_M e I_{max} , os quais foram comparados e avaliados para os sistemas estudados.

RESULTADOS

Síntese e caracterização dos líquidos iônicos próticos estudados

Pela metodologia previamente descrita foram sintetizados os líquidos iônicos próticos indicados na Tabela 3.

Tabela 3. Estrutura molecular dos líquidos iônicos utilizados nos procedimentos de imobilização

ESTRUTURA DO LÍQUIDO IÔNICO	CÓDIGO
	[m-2HEA][Ac]
	[m-2HEA][Pr]
	[m-2HEA][Bu]
	[m-2HEA][Pe]
	[PEHA][Ac]

A Figura 17 apresenta um esquema de reação equimolar do [PEHA][Ac]; a Figura 18, por sua vez, mostra um esquema geral da síntese dos líquidos iônicos da série do [m-2HEA⁺].

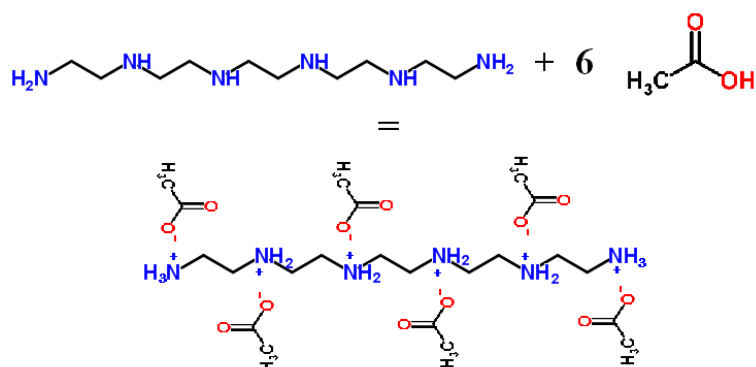


Figura 17. Esquema da reação do acetato de pentaetilenohexamônio, [PEHA][Ac]



Figura 18. Esquema da reação dos líquidos iônicos da série do [m-2HEA⁺].

Inicialmente, a síntese dos líquidos iônicos foi confirmada a partir dos espectros de infravermelho. Posteriormente, foram preparadas misturas de líquido iônico/água a várias composições e os efeitos da temperatura e da quantidade de água foram avaliados sobre a condutividade e a viscosidade. Finalmente, com este estudo, foram obtidas as curvas de Walden, também chamadas de Walden plot, a partir das quais foi possível determinar o grau de ionicidade dos líquidos iônicos quando comparados com uma solução diluída de KCl.

ACETATO DE PENTAETILENOHEXAMÔNIO

A partir da obtenção do espectro de infravermelho, Figura 19, foi possível realizar a análise estrutural do líquido [PEHA][Ac]. Nesta, podem ser observados os espectros do

[PEHA][Ac] e dos seus precursores. Como será analisado a seguir, a formação do líquido iônico é confirmada a partir do desaparecimento de alguns grupamentos próprios dos precursores.

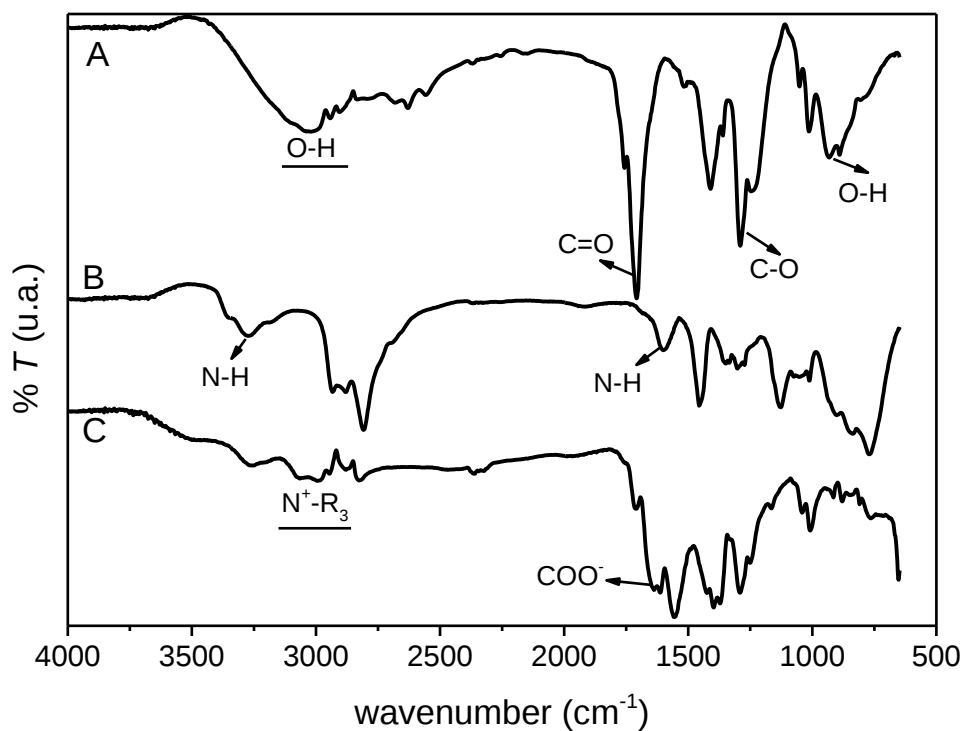


Figura 19. FTIR do acetato de pentaetilenohexamônio e seus precursores. A) espectro do ácido acético, B) espectro da pentaetilenohexamina e C) espectro do [PEHA][Ac].

Na curva “A” correspondente ao espectro do ácido acético, aparecem as seguintes bandas de absorção:

- Ampla banda de estiramento de O-H ($3400 - 2500 \text{ cm}^{-1}$),
- Banda de estiramento do C=O a 1712 cm^{-1} ,
- Vibração de estiramento do C-O do ácido em 1286 cm^{-1} ,
- Uma banda ampla atribuída à vibração de deformação fora do plano da ligação O-H em 900 cm^{-1} .

Todas estas bandas desaparecem depois da síntese do líquido iônico (curva C). As bandas de absorção na curva B (pentaetilenohexamina) devem ser apresentadas no [PEHA][Ac]

(curva C); pois seus grupos funcionais principais são mantidos no novo composto. Para o [PEHA][Ac], novas bandas aparecem no espectro: uma ampla banda correspondente ao estiramento N-H do cátion amônio, o qual absorve a 3000 cm^{-1} , e uma banda de estiramento assimétrica/simétrica do ânion COO⁻ em 1608 cm^{-1} .

As análises térmicas, TG e DSC, foram realizadas para o líquido iônico [PEHA][Ac]. A curva termogravimétrica apresentada na Figura 20 indica uma temperatura de onset em $256,4\text{ °C}$ e uma perda máxima de massa em 372 °C . Para as aplicações propostas neste trabalho, essa temperatura de decomposição do líquido iônico dificilmente será atingida em atmosfera inerte. Isto assegura que termicamente a estrutura do líquido iônico será conservada.

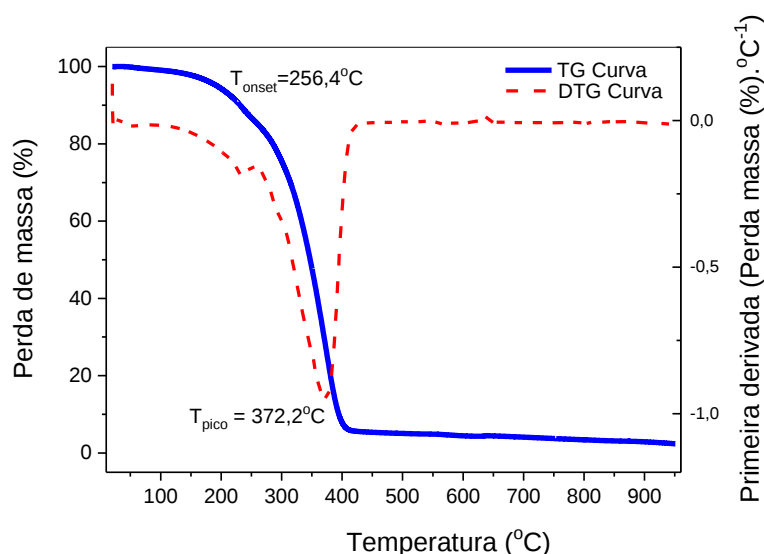


Figura 20. Curva de análise termogravimétrica do [PEHA][Ac] em atmosfera inerte.

Em geral, a estabilidade térmica dos líquidos iônicos depende muito do tamanho dos íons e portanto do seu impedimento estérico; assim como da afinidade entre os cátions e os ânions (Losetty, Chennuri e Gardas, 2015), (Huang *et al.*, 2006) e (Vitorino *et al.*, 2014).

As Figuras 21 e Figura 22 correspondem às curvas de calorimetria exploratória diferencial para o [PEHA][Ac] e seus precursores respectivamente. Esta análise comparativa das curvas de DSC permite confirmar a síntese de um novo composto, com perfil diferente ao ácido acético e à amina utilizados. A Figura 21 apresenta um pico endotérmico a 120 °C , atribuído à vaporização do ácido acético residual da reação (ponto de ebulição, 119 °C ,

°C, Figura 22). Outros picos menores aparecem acima de 120 °C os quais podem ser devidos a subprodutos residuais ou presença de amina sem reagir. O pico em aproximadamente 70 °C na Figura 22 pode ser atribuído a resíduo de água presente no ácido acético.

Observa-se também, que a curva de resfriamento de DSC (Figura 21) não demonstra nenhum evento térmico. Assim, pode se concluir que a fusão do líquido iônico não se encontra na faixa de temperatura estudada (25 até 200 °C).

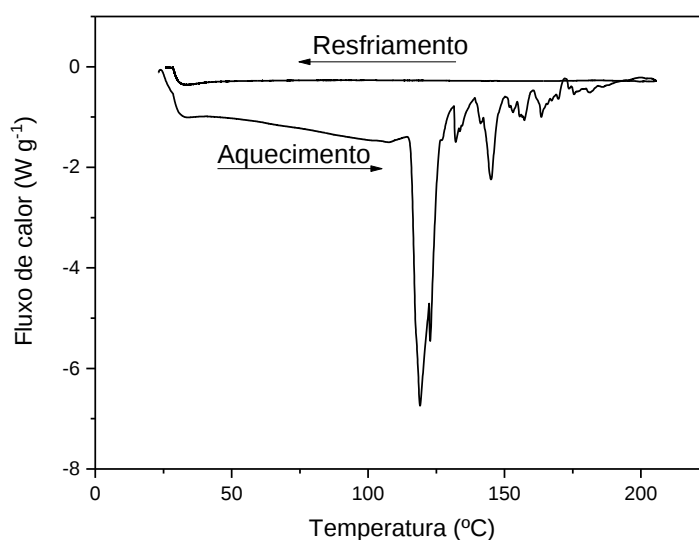


Figura 21. Curva de DSC para [PEHA][Ac] com aquecimento seguida de resfriamento

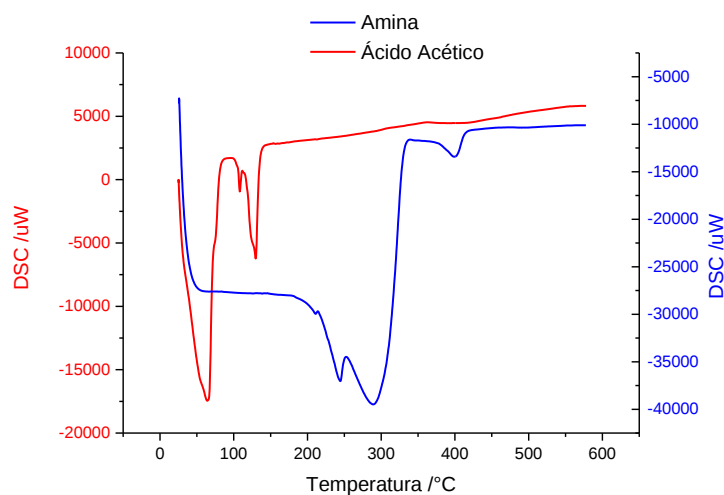


Figura 22. DSC dos precursores do [PEHA][Ac] (Curva azul: pentaetilenohexamina; Curva vermelha: ácido acético)

Na caracterização físico-química foram estudadas a condutividade, viscosidade e principalmente grau de ionicidade dos líquidos iônicos. Propriedades estas, relevantes para a aplicação dos líquidos iônicos em sistemas híbridos, onde foi avaliada a transferência eletrônica em bioeletrodos.

Para tal objetivo, foram realizadas medidas de viscosidade e condutividade em sistemas binários líquido iônico/água, variando a temperatura e a quantidade de água presente nestas misturas. Com estas medidas, foram construídas curvas de Walden com as quais foi possível classificar os líquidos iônicos pelo seu grau de ionicidade; em outras palavras conhecer a disponibilidade dos íons no sistema.

Na Figura 23 observa-se o comportamento da condutividade das misturas de [PEHA][Ac] em função da variação da temperatura e da quantidade de água presente.

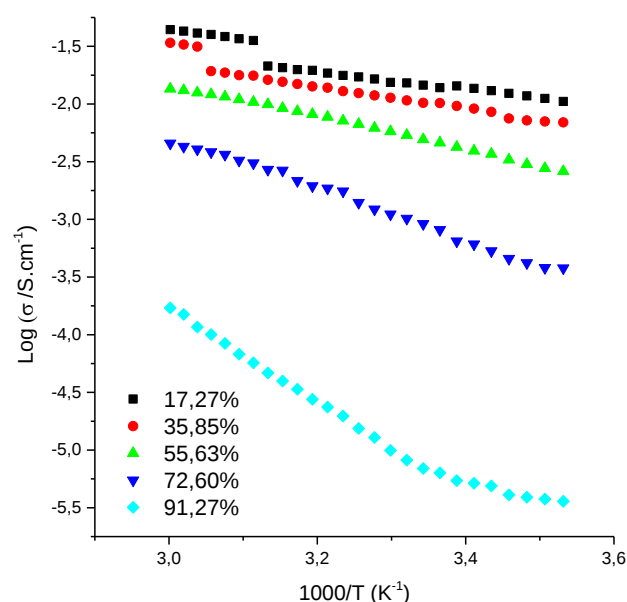


Figura 23. Efeito da temperatura na condutividade de misturas binárias [PEHA][Ac]/água (% em massa de LI)

Pode ser observado, que à medida que a quantidade de água aumenta no líquido, a condutividade também aumenta. Isto é um comportamento esperado pois na presença de água as interações íon-íon diminuem, fato que favorece a mobilidade iônica resultante (Robinson e Stokes, 2002). Igualmente, o mecanismo de transporte de prótons e a dissociação do sal também são favorecidos pelo aumento da quantidade de água na

mistura (Atkins, 2003). Estes mesmos fenômenos são favorecidos com o aumento da temperatura, fato que consequentemente leva a um aumento na condutividade.

O perfil de condutividade observado nas composições de 17,27 e 35,85%, apresenta um salto positivo de condutividade nas temperaturas de aproximadamente 321 e 329 K, respectivamente. Esta inesperada mudança pode estar relacionada a uma mudança de fase, como por exemplo, o rompimento de uma estrutura micelar. Esta ruptura levaria à liberação de mais íons disponíveis na solução e, como consequência, um significativo aumento da condutividade. Este comportamento foi estudado recentemente, onde a formação de estruturas micelares foi atribuída à capacidade inerente de auto-agregação de alguns líquidos iônicos (próticos e apróticos) em sistemas aquosos a baixas concentrações (Miskolczy *et al.*, 2004), (Blesic *et al.*, 2007), (Kusano *et al.*, 2014).

No entanto, a mobilidade dos íons não depende unicamente da natureza condutiva do líquido iônico; a viscosidade é também uma propriedade importante nesse transporte de íons. Assim, o efeito da temperatura e da quantidade de água na viscosidade foram também avaliados e seus resultados podem ser observados na Figura 24 a seguir.

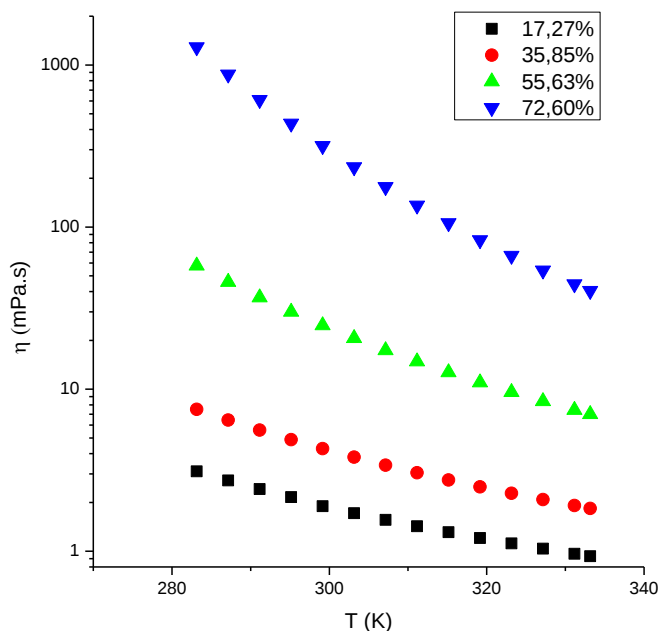


Figura 24. Efeito da temperatura na viscosidade de misturas binárias [PEHA][Ac]/água (% em massa de LI)

Como esperado, o incremento na temperatura e no conteúdo de água leva ao decréscimo na viscosidade do [PEHA][Ac]. Baseado nestes resultados de viscosidade e

condutividade, uma Walden plot foi construída a fim de classificar o líquido iônico por seu grau de ionicidade, usando-se uma solução diluída de KCl como padrão de referência. Para construir esta curva, foi calculada a condutividade molar a partir da condutividade medida experimentalmente e a concentração da mistura utilizada. O logaritmo da condutividade molar coloca-se na abscissa e é plotada em função do logaritmo da fluidez, onde esta última corresponde ao inverso da viscosidade, também determinada experimentalmente. A Figura 25 apresenta a Walden plot construída para as diferentes composições de [PEHA][Ac] utilizadas neste trabalho.

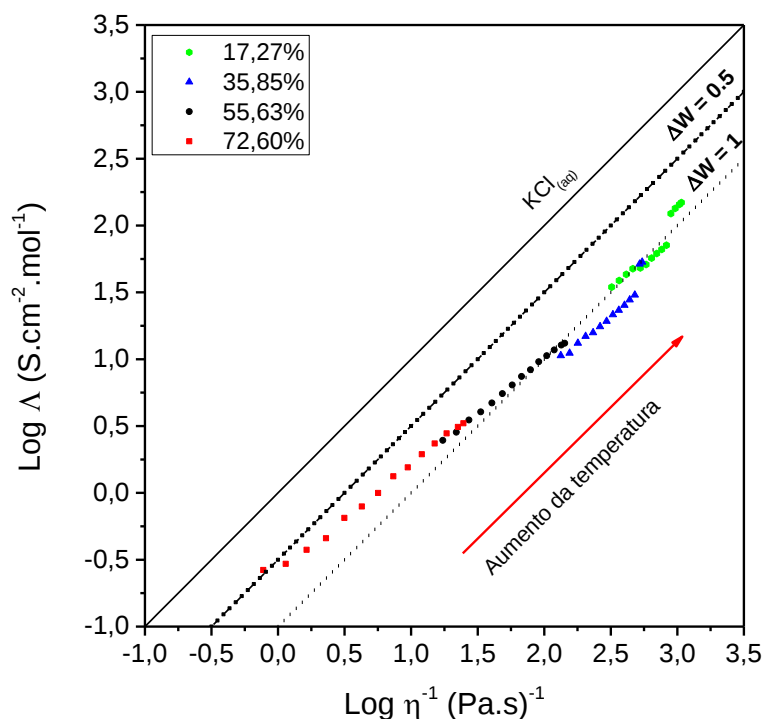


Figura 25. Walden plot para as diferentes composições de [PEHA][Ac] em água (% em massa de LI).

Como descrito por Pinkert et al. (2011), a proximidade à linha de referência do KCl indica líquidos com alta tendência a formar íons. As linhas marcadas como ΔW definem a extensão na qual um fluido é iônico: $\Delta W = 0,5$ corresponde a 31,6% da ionicidade em relação à solução de KCl, e $\Delta W = 1$ corresponde a 10% da mesma. Para todas as composições analisadas, um comportamento geral é observado, quase todas as misturas encontram-se na região de 10% de ionicidade entre $\Delta W = 1$ e $\Delta W = 0,5$, mais próximo deste. A redução da quantidade de água causa uma diminuição na fluidez e na mobilidade iônica da solução. Porém, maior grau de ionicidade foi observado para estas soluções com

menor quantidade de água. Isto foi constatado com a amostra de 72,60% que apresentou uma posição mais próxima à linha de referência, em relação às outras composições.

Assim, considerando a condutividade, viscosidade e ionicidade do líquido iônico nas misturas binárias, a solução mais concentrada (~73%) escolheu-se como a mais adequada para a construção do bioeletrodo pela técnica de layer by layer combinada com a deposição eletroquímica. Nesta concentração observou-se uma maior disponibilidade iônica.

LÍQUIDOS IÔNICOS DA SÉRIE DO CÁTION N-METIL-2HIDROXIETILAMÔNIO

Serão apresentadas a seguir algumas análises representativas para a série do [m-2HEA⁺]. Na Figura 26 apresenta-se o espectro do [m-2HEA][Ac]. Neste se observam as seguintes bandas de absorção:

- Estiramento assimétrico em 1558 cm⁻¹ do grupo carboxilato,
- Estiramento simétrico em 1392 cm⁻¹ do grupo carboxilato,
- Estiramentos do íon amônio ocorrem na faixa de 3300 a 2600 cm⁻¹ na forma de uma ampla banda de absorção provavelmente sobrepostos com o estiramento do O-H na região de 3400 – 3300 cm⁻¹,
- Deformações do N-H em 1469 cm⁻¹ como uma pequena banda de absorção,
- Estiramento do C-O em 1037 cm⁻¹.

Estas bandas confirmam a formação do líquido iônico [m-2HEA][Ac]. Os espectros de FTIR dos outros líquidos iônicos podem ser consultados em Santos *et al.* (2017) e Álvarez *et al.* (2010) os quais confirmaram a síntese destes líquidos com a análise das bandas características para os mesmos. As análises termogravimétricas dos líquidos sintetizados

nesta série podem ser consultados no trabalho publicado por Talavera-Prieto *et al.* (2014) o qual estudou a estabilidade térmica dos líquidos propanoato, butanoato e pentanoato de N-metil-2-hidroxietil-amônio. Os autores encontraram que o pentanoato é extremamente mais estável que os outros dois líquidos iônicos, sugerindo que isto pode ocorrer devido ao tamanho do ânion.

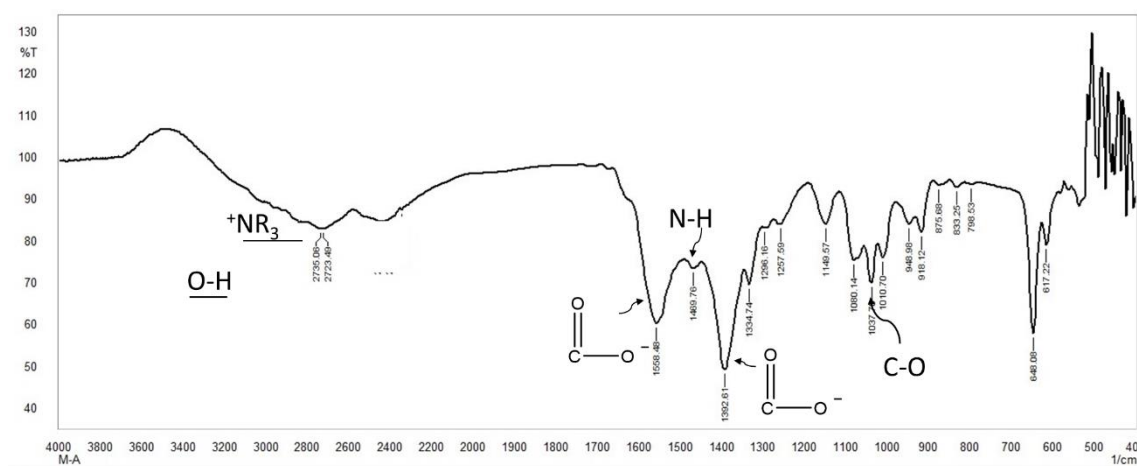
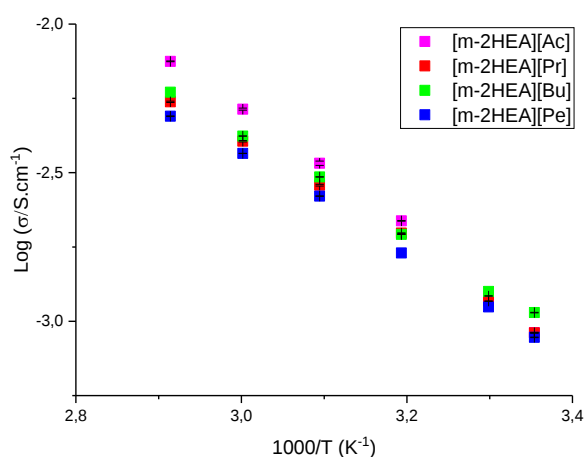


Figura 26. Espectro FTIR para o [m-2HEA][Ac]

Em termos de condutividade o efeito da temperatura foi avaliado nos líquidos iônicos na composição de 95% de líquido e o resultado comparativo está apresentado na Figura 27.

A



B

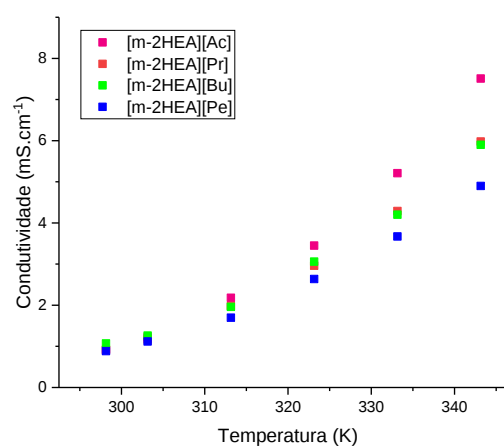


Figura 27. Influência do ânion na condutividade dos líquidos iônicos da série [m-2HEA⁺] (~95% em massa de LI) **A)** Condutividade representada seguindo um modelo de Arrhenius, $\log \sigma$ vs. $1000/T$; **B)** condutividade vs. T .

No gráfico da Figura 27, observa-se que em geral, e como esperado para estes sistemas, com o aumento da temperatura a condutividade também aumenta. Observando o efeito do ânion (ver Tabela 3), encontra-se que o acetato apresenta maior condutividade, principalmente a mais altas temperaturas, sendo que o propanoato e o butanoato têm valores de condutividade praticamente iguais. No entanto, o pentanoato apresenta o menor valor de condutividade. Estes comportamentos são mais notoriamente observados na Figura 27 **B**, onde o efeito da temperatura se mostra mais significativo. Em geral, estes fenômenos podem ser explicados considerando que quanto maior a cadeia do ânion, menor é a mobilidade dos íons devido a impedimentos estéricos. Assim, menor mobilidade iônica terá como consequência menor condutividade da substância analisada.

As medidas de viscosidade foram realizadas para os quatro líquidos iônicos da série estudada, avaliando o efeito da temperatura e da quantidade de água nas misturas binárias. Considerando que todos os outros líquidos apresentaram um comportamento semelhante entre si, serão apresentados somente os gráficos para o líquido [m-2HEA][Pr]. Para os outros líquidos iônicos pode ser consultado o trabalho de tese de SANTOS (2018) no qual o autor estuda extensamente as propriedades termodinâmicas da série do [m-2HEA⁺].

Nas Figura 28 e Figura 29, são apresentados os perfis de viscosidade em função da temperatura e da composição das misturas avaliadas, respectivamente.

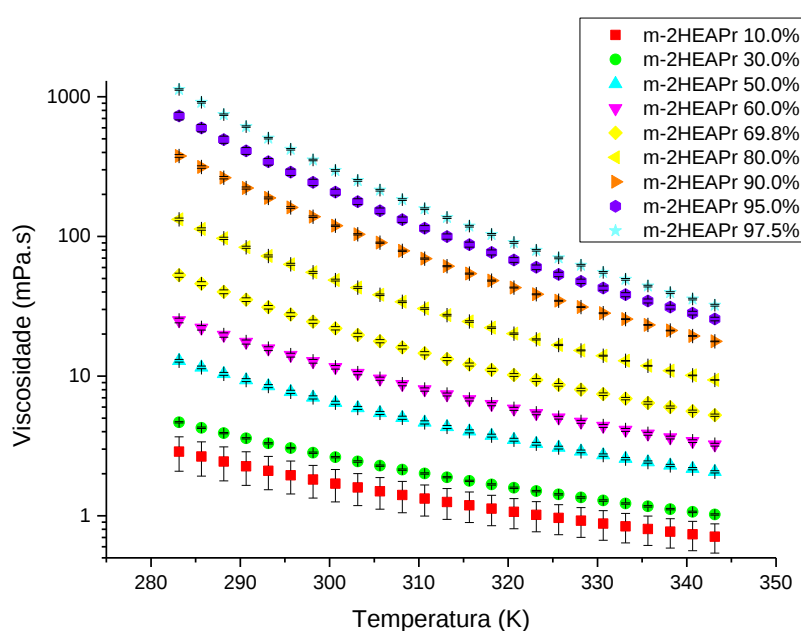


Figura 28. Efeito da temperatura na viscosidade de misturas binárias [m-2HEA][Pr] / água (% em massa de LI)

De forma semelhante como observado anteriormente para o [PEHA][Pr], à medida que a temperatura aumenta a viscosidade diminui para todas as composições avaliadas. Igualmente, à medida em que a quantidade de água aumenta a viscosidade também diminui. Isto pode ser observado melhor na Figura 29 onde se relaciona a viscosidade em função da fração mássica das soluções do LI.

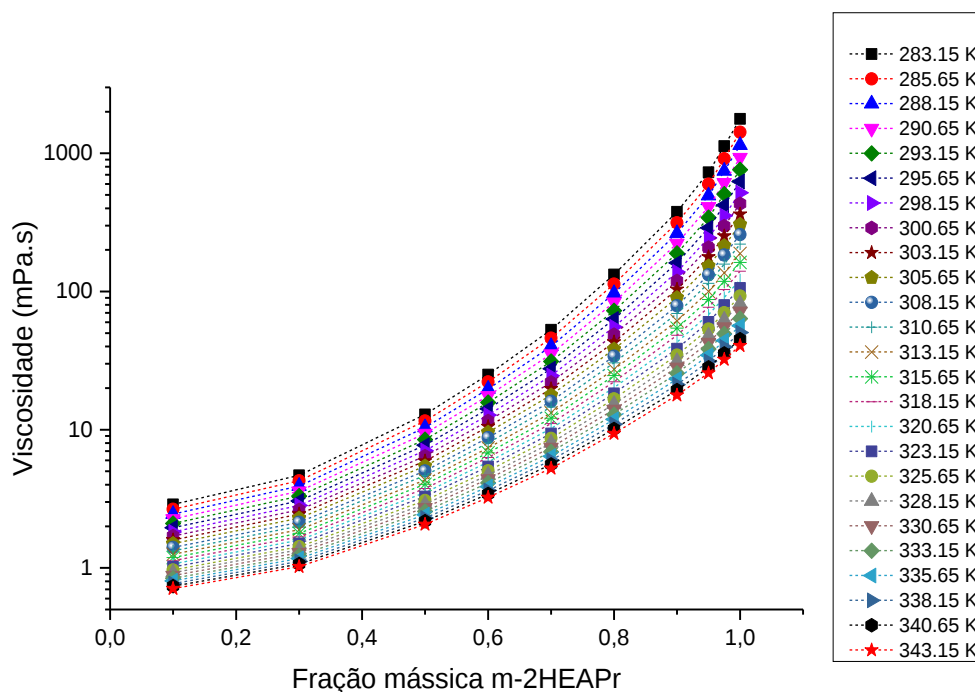


Figura 29. Efeito da composição mássica na viscosidade das misturas binárias [m-2HEA][Pr]/água (% em massa de LI).

Como observado na Figura 29, à medida que o teor de LI aumenta na solução, a viscosidade aumenta; enquanto, com o aumento da temperatura a viscosidade diminui. Para uma análise mais detalhada pode ser consultada a tese de SANTOS (2018).

Na Figura 30 é avaliada a viscosidade segundo o efeito do ânion para misturas da série do [m-2HEA⁺] com composição de ~95%.

Na Figura 30 observa-se que o líquido iônico com o ânion acetato apresenta maior viscosidade em toda a faixa de temperaturas avaliada. Todos os outros líquidos apresentam valores de viscosidade muito próximos; entretanto, até aproximadamente 300 K, a viscosidade dos líquidos iônicos apresenta uma discreta diferença. Pode-se observar que a viscosidade decresce na seguinte ordem de ânion: propanoato > butanoato > pentanoato.

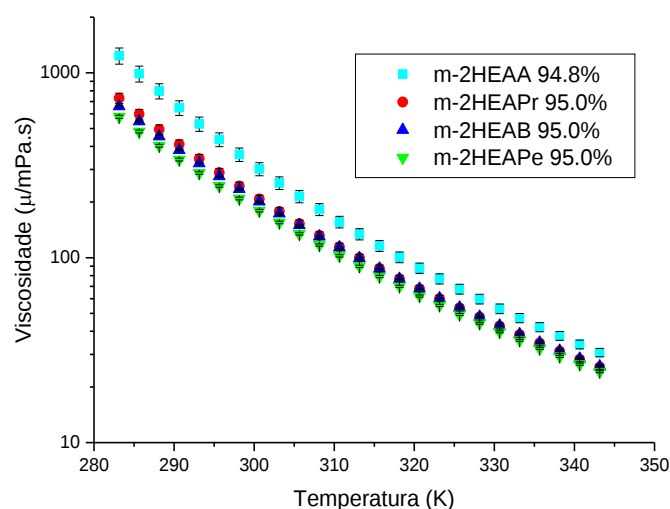


Figura 30. Influência do ânion na viscosidade para os líquidos com o cátion [m-2HEA⁺] (% em massa de LI)

Provavelmente, a propensão a formar ligações de hidrogênio faz com que o líquido [m-2HEA][Ac] seja mais viscoso com relação aos outros líquidos iônicos da série (Ma *et al.*, 2018). Por outro lado, à medida que a cadeia do ânion aumenta, seria esperado que a viscosidade diminuísse pois quanto maior a molécula, menor será o grau de empacotamento, reduzindo assim as forças de atração entre os íons e consequentemente diminuindo a viscosidade.

Assim como foi feito para o [PEHA][Ac], a partir das medidas de condutividade e viscosidade, foi realizada a Walden plot para definir qual é o líquido iônico da série do cátion [m-2HEA⁺] que apresentava um maior grau de ionicidade e com isto maior disponibilidade dos prótons. O resultado é apresentado na Figura 31.

Observa-se na Walden plot, que os líquidos iônicos estudados apresentam em geral baixo grau de ionicidade; pois encontraram-se muito abaixo do ΔW igual a 1,0. Nesta região encontram-se os líquidos que possuem um pobre grau de ionicidade quando comparado ao KCl.

Em geral, todos os líquidos estudados desta série apresentam perfis de ionicidade muito próximos. Mas, se observa que o [m-2HEA][Ac] é o que apresenta grau de ionicidade ligeiramente maior, apesar deste líquido possuir também um valor de viscosidade maior.

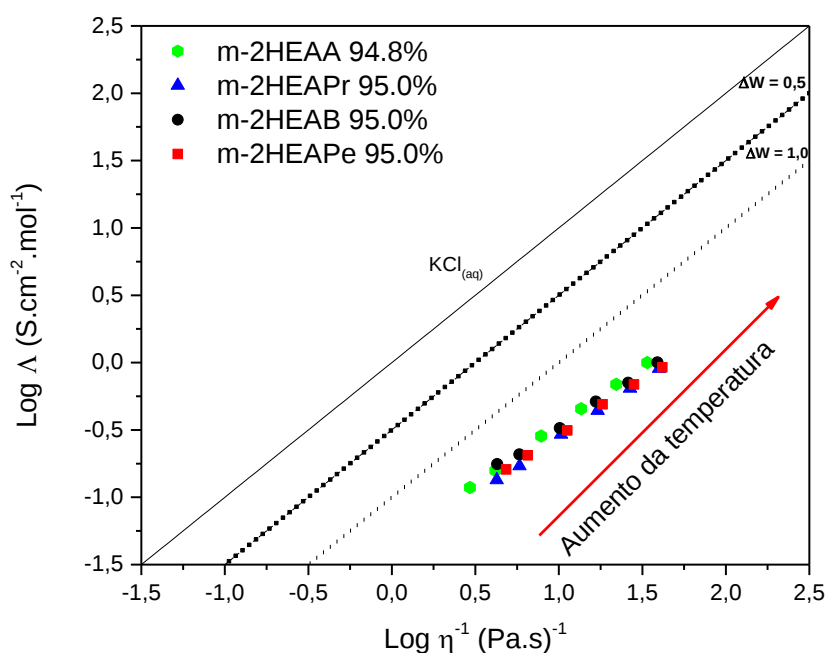


Figura 31. Walden plot para os líquidos iônicos da série do cátion [m-2HEA⁺]

Todos os líquidos desta série foram utilizados para avaliar seu efeito na atividade enzimática e na solubilidade da catalase como será mostrado posteriormente, a fim de contribuir na escolha do melhor líquido para a imobilização da enzima pelo método CLEA.

Construção do bioeletrodo

Neste capítulo serão apresentando os resultados para as duas metodologias propostas de imobilização. Inicialmente, será detalhada a construção do bioeletrodo pelas técnicas de layer by layer e eletrodeposição usando como substrato um eletrodo de carbono vítreo; assim como sua caracterização eletroquímica. A atividade deste eletrodo foi testada nos substratos de peróxido de hidrogênio.

Posteriormente, a partir da aplicação da técnica de imobilização por CLEA, quatro materiais eletródicos foram obtidos, com os quais foram construídos quatro bioeletrodos,

testados nos substratos de peróxido de hidrogênio e caracterizados eletroquímica e físico-quimicamente.

DESENVOLVIMENTO DO BIOELETRODO PELAS TÉCNICAS LAYER BY LAYER (LBL) E DEPOSIÇÃO ELETROQUÍMICA

Para a montagem do bioeletrodo, foram feitos inicialmente alguns testes nos eletrodos de titânio e titânio modificado com carbono Vulcan; porém os resultados não foram satisfatórios, pois não se observou nenhuma resposta eletroquímica referente aos processos redox da catalase. Estes resultados são apresentados no Apêndice 1.

Quando usado o eletrodo de carbono vítreo (ECV) como substrato, a superfície foi satisfatoriamente modificada e uma série de bioeletrodos foi construída como descrita na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Substrato de carbono vítreo e bioeletrodos construídos pelas técnicas de layer by layer e deposição eletroquímica

NOMENCLATURA ELETRODO	DESCRIÇÃO
ECV	Substrato de Eletrodo de Carbono Vítreo
ECV/CAT	Substrato de Eletrodo de Carbono Vítreo com catalase
ECV/[PEHA][Ac]	Substrato de Eletrodo de Carbono Vítreo com o LI acetato de pentaetileno hexamônio
ECV/[PEHA][Ac]/CAT	Substrato de Eletrodo de Carbono Vítreo com o LI acetato de pentaetileno hexamônio e catalase

Estes bioeletrodos construídos foram analisados eletroquimicamente e os resultados serão apresentados a seguir.

Inicialmente, o primeiro passo foi a eletro-oxidação do [PEHA][Ac] na superfície do carbono vítreo como mostrado na Figura 32. O substrato foi mergulhado em uma solução

de [PEHA][Ac] (concentração de 5 mmol L⁻¹) dissolvido em tampão fosfato. A partir da primeira varredura no sentido anódico observa-se a formação de dois picos pouco definidos os quais vão diminuindo de intensidade com as varreduras subsequentes. Isto devido a uma provável saturação da superfície do carbono vítreo com o líquido iônico.

No sentido catódico não é observado nenhum processo eletroquímico. Com este resultado pressupõe-se que está ocorrendo um processo oxidativo no líquido iônico. Alguns autores propõem mecanismos de reação para a oxidação de carboxilatos e grupamentos amônio os quais serão analisados a seguir. Estas propostas podem ser adaptadas ao resultado obtido na Figura 32 para a oxidação do [PEHA][Ac].

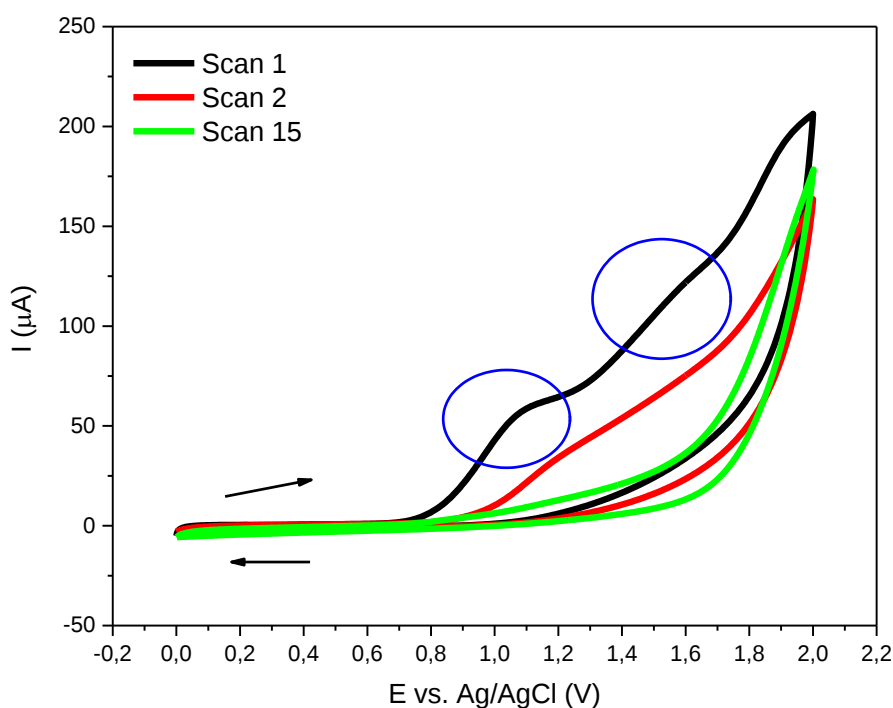


Figura 32. Voltamogramas cíclicos da eletro-oxidação do [PEHA][Ac] na superfície de carbono vítreo, em tampão fosfato (pH = 7,0). $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Os círculos azuis mostram a localização dos picos pouco definidos.

Como proposto por Fry, um processo oxidativo para o carboxilato leva à formação de etano e liberação de CO₂ (reação de Kolbe) (Fry, 1972). Com isto o íon acetato estaria se oxidando e liberando gás carbônico. Adicionalmente, baseado na proposta de Smith e Mann, os extremos dos grupos amônio do líquido iônico poderiam estar se transformando em amina primária, ou mesmo em amina secundária com liberação de aldeídos na presença de água (Smith e Mann, 1969), (Adenier *et al.*, 2004). Assim, este derivado

estaria se ligando à superfície do carbono vítreo por meio dos grupos amina como descrito por vários grupos de pesquisa (Barbier, 1990), (Antoniadou *et al.*, 1992), (Deinhammer *et al.*, 1994), (Anne *et al.*, 1998), (Liu e Dong, 2000), (Adenier *et al.*, 2004), (Downard, Garrett e Tan, 2006), (Barrière e Downard, 2008), (Ghilane *et al.*, 2010).

Tal como observado por Antoniadou *et al.* (1992), quando oxidada uma diamina na superfície do carbono vítreo, dois ombros são obtidos na varredura anódica, atribuindo este comportamento à oxidação de cada grupamento amina presente na molécula estudada. Adicionalmente, o autor sugere que estas moléculas (diaminas oxidadas) podem ser ligadas à superfície do eletrodo em configuração de ponte ou mesmo de cadeia.

Devido o grande tamanho do cátion do [PEHA][Ac], é mais provável que as extremidades da molécula estejam sendo oxidadas, o que justificaria a presença dos dois picos na Figura 32. Neste sentido, nem todos os grupos amônio se oxidariam e deixariam disponível uma carga líquida positiva sobre a superfície modificada do eletrodo; a qual seria responsável pela interação com a catalase.

A enzima catalase possui uma carga líquida negativa no pH estudado (7,0), pois seu ponto isoelétrico (pI) é igual a 5,4 (Samejima, Kamata e Shibata, 1962), (Liu *et al.*, 2013). Portanto, a enzima poderia interagir eletrostaticamente com a carga líquida positiva do [PEHA][Ac].

No passo 2, a enzima catalase foi eletrodepositada neste eletrodo previamente modificado com [PEHA][Ac]. Para isto, o eletrodo foi mergulhado em uma solução contendo catalase em tampão fosfato (8 mg mL^{-1}) e o comportamento eletroquímico do eletrodo durante esta etapa de ciclagem pode ser observado na Figura 33. Depois do primeiro ciclo de catalase, a presença de dois pares de picos foi observada; o primeiro par a potenciais mais negativos, com $E_{p,c} = -0.46 \text{ V}$ e $E_{p,a} = -0.41 \text{ V}$, e o segundo par mais próximo do zero com $E_{p,c} = 0.01 \text{ V}$ e $E_{p,a} = 0.13 \text{ V}$.

Após o primeiro ciclo de deposição da catalase, o eletrodo resultante foi exposto a uma solução de [PEHA][Ac] tal como descrito no Passo 3 na metodologia. Subsequentemente, os Passos 2 e 3 foram repetidos até atingir a saturação da superfície, a qual foi associada com a estabilização e até diminuição da corrente resultante nos picos da Figura 33. Assim, na Figura 33 se observam os ciclos de deposição da catalase após cada repetição do Passo 2. O incremento no número de bicamadas (catalase e [PEHA][Ac]) gerou um incremento

na corrente dos picos do processo redox até o quinto ciclo de deposição. Depois deste, não foram observados incrementos significativos na corrente resultante. Desta forma, o procedimento foi realizado até o quinto ciclo, pois após a saturação da superfície não houve mais incremento de corrente nem mais formação de bicamadas.

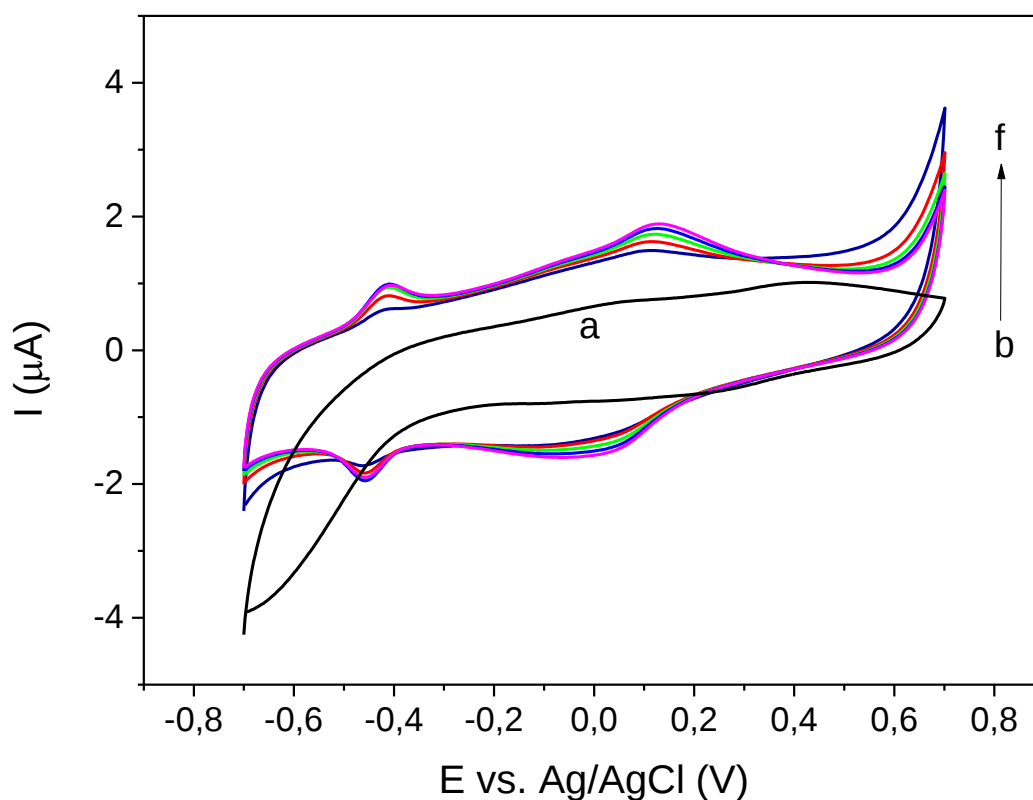


Figura 33. Curvas de crescimento das camadas de catalase na superfície do substrato. (a) Resposta voltamétrica do eletrodo de carbono vítreo (CV) e (b-f) 1º a 5º ciclos de deposição de catalase em CV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Com as 5 bicamadas depositadas, foi construído o bioeletrodo chamado de CV/([PEHA][Ac]/CAT)₅ e a resposta eletroquímica do substrato de carbono vítreo foi comparada antes e após a modificação, em meio de tampão fosfato. O resultado está ilustrado a seguir na Figura 34. Como observado, o substrato de carbono vítreo sem modificação (curva vermelha) não apresentou nenhum pico redox na janela de potencial avaliada (0,7 a -0,7 V); sendo que picos redox bem definidos foram observados para o bioeletrodo construído (curva preta). Esta diferença significativa dos dois voltamogramas, confirma que o procedimento de deposição das espécies de interesse na superfície do eletrodo foi plausível de ter acontecido.

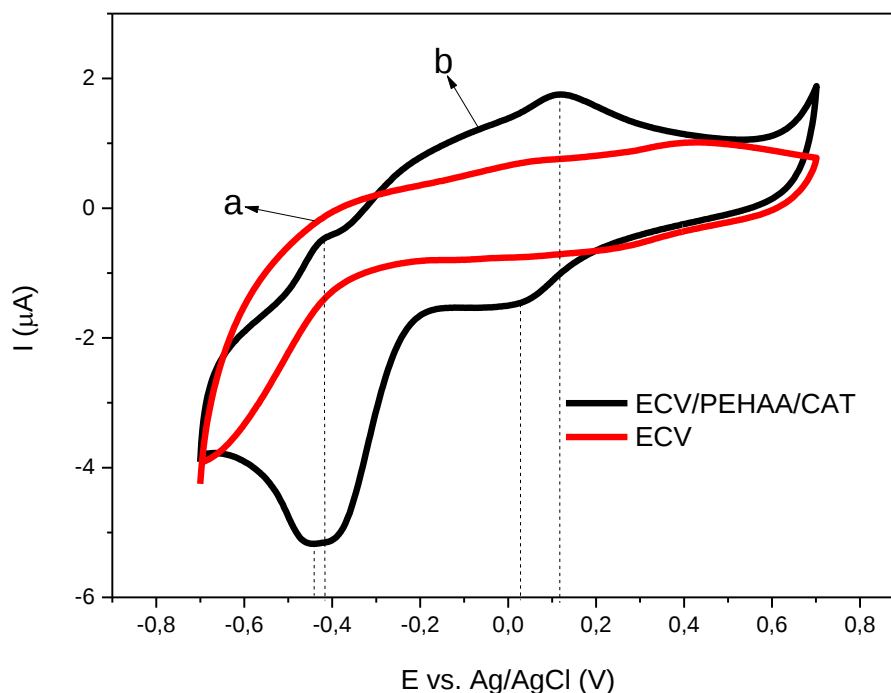


Figura 34. Comparação dos voltamogramas cíclicos (VC) do (a) eletrodo CV e (b) do eletrodo modificado CV/([PEHA][Ac]c/CAT)₅, ambos em tampão fosfato (pH = 7,0). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A presença dos dois pares de picos na curva b, Figura 34, se estima estar relacionada com a resposta eletroquímica da catalase na presença do líquido iônico. O par de picos na região de potenciais mais positivos tem sido observado por outros autores os quais atribuem esta resposta à reação redox no sítio ativo da catalase (oxidação da dupla $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$) (Wang *et al.*, 2014), (Saadati *et al.*, 2012), (Salimi, Noorbakhsh e Ghadermarz, 2005), (Salimi *et al.*, 2007), (Shamsipur, Asgari, Mousavi, *et al.*, 2012), (Shamsipur, Asgari, Maragheh, *et al.*, 2012), (Periasamy, Ho e Chen, 2011). Já o par de picos localizado na região de potenciais mais negativos pode estar associado com a presença dos dois, o [PEHA][Ac] e a catalase. Entretanto, esses autores não observaram este par de picos.

Assim, a fim de se ter uma ideia mais clara da contribuição de cada um dos elementos no eletrodo CV/[PEHA][Ac]/CAT, foram construídos separadamente eletrodos com [PEHA][Ac] (CV/[PEHA][Ac]) e com catalase (CV/CAT) e comparados com a resposta do bioeletrodo e do CV.

Como pode ser observado na Figura 35, o eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac] apresentou dois pares de picos em aproximadamente -0,37 e -0,1 V e em 0,36 e 0,57 V. Estes picos podem estar associados a processos redox do [PEHA][Ac]. Por outro lado, o eletrodo modificado CV/CAT não apresentou nenhum pico redox na janela estudada.

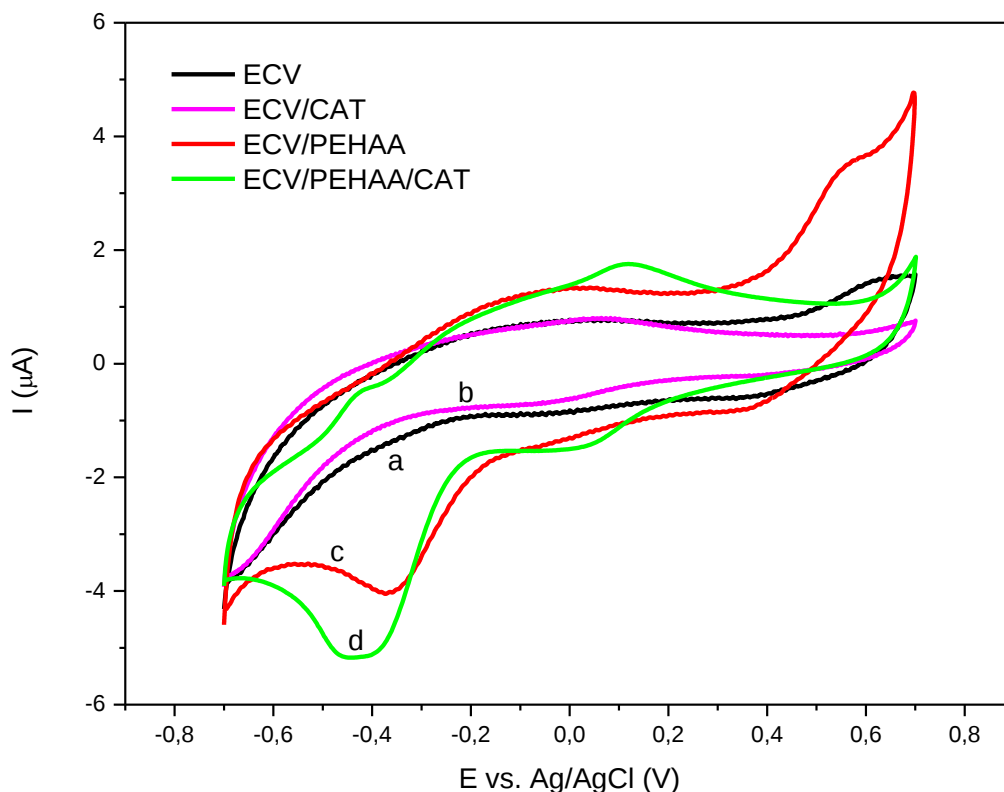


Figura 35. VC comparativos de a) ECV, b) eletrodo modificado CV/CAT, c) eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac] e d) eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT, todos os VCs conduzidos em tampão fosfato (pH 7) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Assim, pode-se inferir que a camada do líquido iônico tem um papel essencial na imobilização da catalase, consequentemente na construção do bioeletrodo. A impossibilidade da catalase ser imobilizada na superfície de carbono vítreo na ausência do LI, ou outras pequenas moléculas mediadoras, foi também constatada por outros grupos de pesquisa (Salimi, Noorbakhsh e Ghadermarz, 2005), (Gholivand e Khodadadian, 2014), (Wang *et al.*, 2014). A enzima estaria necessitando do líquido iônico para poder ocorrer a liga na superfície do carbono vítreo assim como a transferência eletrônica no processo redox da mesma.

Os picos localizados na região de potenciais mais negativos nas curvas c e d (CV/[PEHA][Ac] e CV/[PEHA][Ac]/CAT, respectivamente) são, em seu formato, muito semelhantes e muito próximos. Isto sugere que o pico negativo do bioeletrodo é devido a uma contribuição de ambas substâncias ([PEHA][Ac] e catalase).

O eletrodo modificado CV/([PEHA][Ac]c/CAT)₅ foi caracterizado na presença de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações; o resultado foi apresentado na Figura 36. Como pode ser observado nesta figura, o pico catódico em -0,44 V pode ser associado ao processo de redução electrocatalítica, pois neste, a corrente aumenta com o incremento da concentração de peróxido de hidrogênio. Por sua vez, o valor de corrente do pico de oxidação ($E_{p,a} = -0,42$ V) diminui até desaparecer completamente. Isto também é observado por outros autores, em que tanto o incremento como a diminuição da corrente de pico são considerados fenômenos de electrocatálise (Periasamy, Ho e Chen, 2011). Esta resposta confirma a atividade da enzima na redução de H_2O_2 , assim como a efetividade da metodologia proposta para a imobilização da catalase.

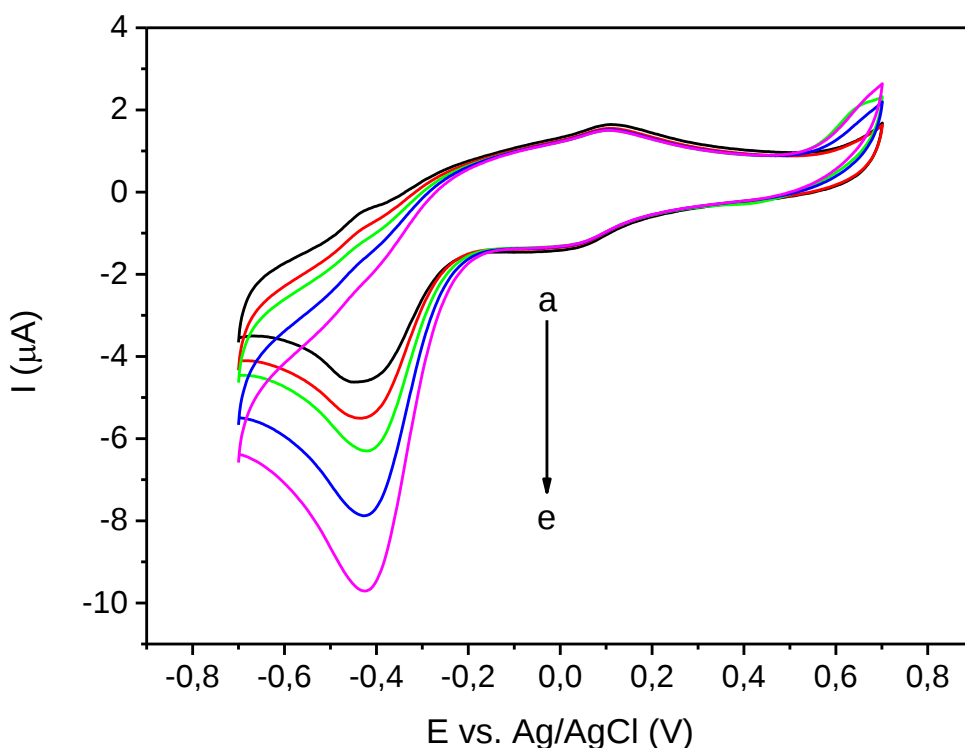


Figura 36. VCs do eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT na ausência e presença de H_2O_2 em diferentes concentrações, desde o interno ao externo: 0,0, 0,2, 0,4, 0,9 e 1,1 mmol L^{-1} em tampão fosfato (pH 7,0) $v = 50$ mV s^{-1} .

A fim de confirmar que esta resposta eletroquímica frente ao H_2O_2 foi devida efetivamente à enzima e não ao líquido iônico, o eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac] (preparado sem catalase), foi avaliado na presença de H_2O_2 ; os resultados são apresentados na Figura 37.

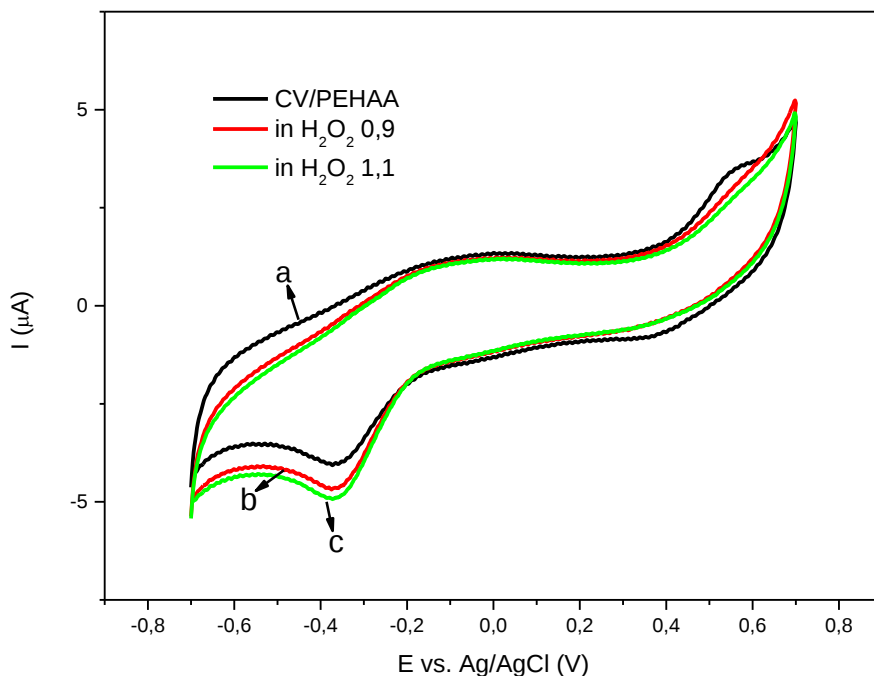


Figura 37. VCs do eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac] na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 : a) 0 b) 0,9 e c) 1,1 mmol L^{-1} (todos obtidos em tampão fosfato (pH 7,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Como pode ser observado, o eletrodo CV/[PEHA][Ac] não apresenta nenhuma resposta eletrocatalítica relacionada à redução do H_2O_2 . Assim, pode-se concluir que a atividade eletrocatalítica do bioeletrodo é devida unicamente à enzima imobilizada. Paralelamente, o sucesso da imobilização da enzima depende da presença do líquido iônico na superfície do carbono vítreo.

O efeito da velocidade de varredura no comportamento eletroquímico foi avaliado e seus resultados são apresentados na Figura 38; neste teste, a velocidade variou entre 10 e 100 mV s^{-1} . Em geral, a corrente aumenta em todos os picos com o aumento da velocidade de varredura. O pico catódico $E_p = -0,46 \text{ V}$ não se desloca significativamente com o aumento da velocidade de varredura.

Adicionalmente, o gráfico de corrente de pico em função da velocidade de varredura (inset, Figura 38) exibe um comportamento linear, com coeficiente de correlação $R^2 = 0,99846$, o que sugere que o processo de transferência eletrônica (reação no eletrodo modificado) é um processo redox confinado à superfície (Huang *et al.*, 2011), (Periasamy, Ho e Chen, 2011), (Saadati *et al.*, 2012). Isto significa que o processo global é limitado por processos adsorptivos da espécie eletroativa na superfície do bioeletrodo (Bard e Faulkner, 2001).

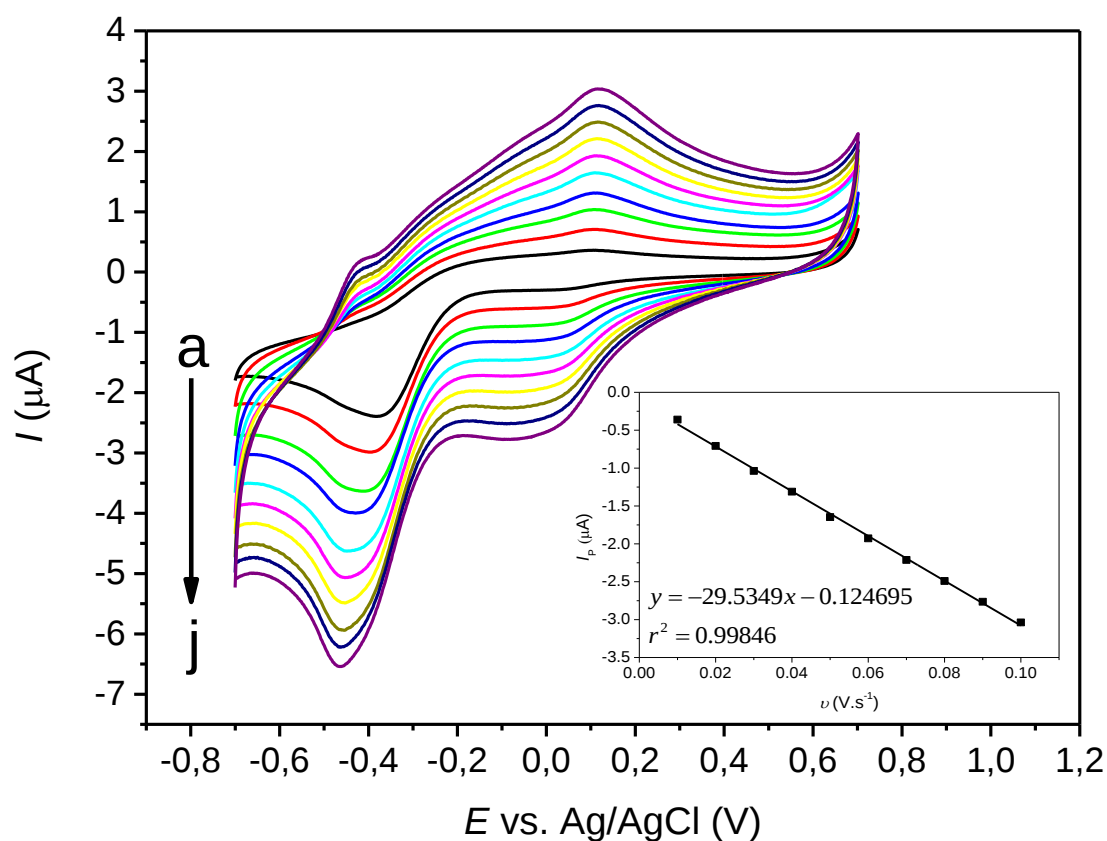


Figura 38. VCs para o eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT a diferentes velocidades de varredura, desde o interno ao externo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1} em tampão fosfato pH 7,0. Inset: gráfico da corrente de pico catódico $E_p = -0,46 \text{ V}$ vs. Velocidade de varredura.

Finalmente, a fim de investigar a possibilidade de usar este bioeletrodo de forma continua em diferentes dispositivos, como biocélulas a combustível e biossensores, foi avaliada a estabilidade do eletrodo modificado CV/([PEHA][Ac]c/CAT)₅ durante 250 ciclagens sucessivas na janela de potencial de -0,7 a 0,7 V (vs. Ag/AgCl), e uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Após os 250 ciclos contínuos, foi observada uma perda de corrente de pico ($E_p = -0,45 \text{ V}$) de apenas 13,35% em relação ao valor inicial (varredura

1). Adicionalmente, os potenciais dos picos se mantiveram no intervalo de potencial, tal como mostrado na Figura 39.

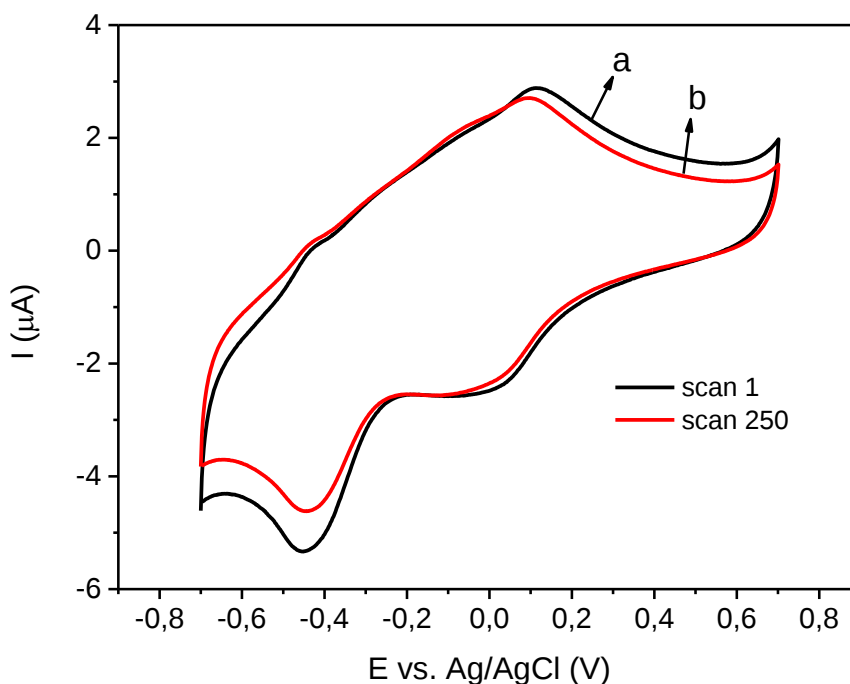


Figura 39. 1º (a) e 250º (b) voltamograma registrado para o eletrodo modificado CV/[PEHA][Ac]/CAT em tampão fosfato (pH 7,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Também foi monitorada a resposta do bioeletrodo no sistema branco, tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 7.0) e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ após seu uso em diferentes meios eletrolíticos testados (resultados não mostrados). Observou-se que a corrente dos picos, forma e potenciais foram mantidos quase inalterados, fatos que indicam alta estabilidade do bioeletrodo desenvolvido.

Pode se concluir que este bioeletrodo é promissor para ser utilizado principalmente como biossensor devido a:

- Rigidez conferida ao sistema pelo substrato metálico utilizado.
- Sua resposta linear frente ao peróxido de hidrogênio, o que permitiria aplicações a sistemas analíticos.
- Sua estabilidade frente a variações na velocidade de varredura e com o uso consecutivo, propriedades necessárias para aplicações em biossensores.

DESENVOLVIMENTO DO BIOELETRODO PELA TÉCNICA DE ENTRECruzAMENTO DE ENZIMAS AGREGADAS (CLEA)

Atividade e solubilidade da catalase nos líquidos iônicos

Para conhecer o efeito dos líquidos iônicos na enzima catalase foi realizada uma série de Hofmeister. Esta série consiste na avaliação dos efeitos caotrópicos e cosmotrópicos dos íons na estabilidade e atividade da enzima. Relembrando, caotrópico se refere àqueles íons que desestabilizam a estrutura da água e cosmotrópicos por sua vez são àqueles que a estabilizam. O sal que mais estabiliza uma enzima é aquele que possui um ânion cosmotrópico e um cátion caotrópico (Yang, 2009).

Assim, para desenvolver esta série foi necessário realizar algumas medidas na seguinte sequência:

- Determinação da atividade enzimática da catalase na ausência do líquido iônico.
- Medidas de UV-Vis para os quatro líquidos iônicos testados da série do m-2HEA⁺.
- Medidas qualitativas da solubilidade da enzima em misturas binárias dos líquidos iônicos em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹.
- Determinação do pH das misturas binárias dos líquidos iônicos em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹.
- Medidas de atividade da enzima na presença dos líquidos iônicos.

Seguindo estes procedimentos foi possível determinar o líquido iônico que mais estabilizou e favoreceu a atividade da catalase a fim de ser utilizado no processo de imobilização posterior. As misturas dos líquidos iônicos foram todas preparadas em tampão fosfato e não em água, pois era necessário tentar manter o pH constante a fim de preservar a estrutura da enzima.

Assim, inicialmente foram medidas a atividade enzimática e a quantidade de proteína da catalase da Sigma-Aldrich (Lote: SLBJ3788V). Para isto, foram utilizadas as metodologias descritas na parte experimental, onde a atividade da enzima foi determinada por espectrofotometria na região UV. A atividade da enzima in natura calculada foi 1862,10±9,5 UI/mg sólido.

Com os espectros UV-Vis dos quatro líquidos da série do $[m-2HEA^+]$ foi possível conhecer a absorvância destes, no comprimento de onda de 240 nm (comprimento de absorção do peróxido de hidrogênio) os quais são mostrados a seguir na Figura 40.

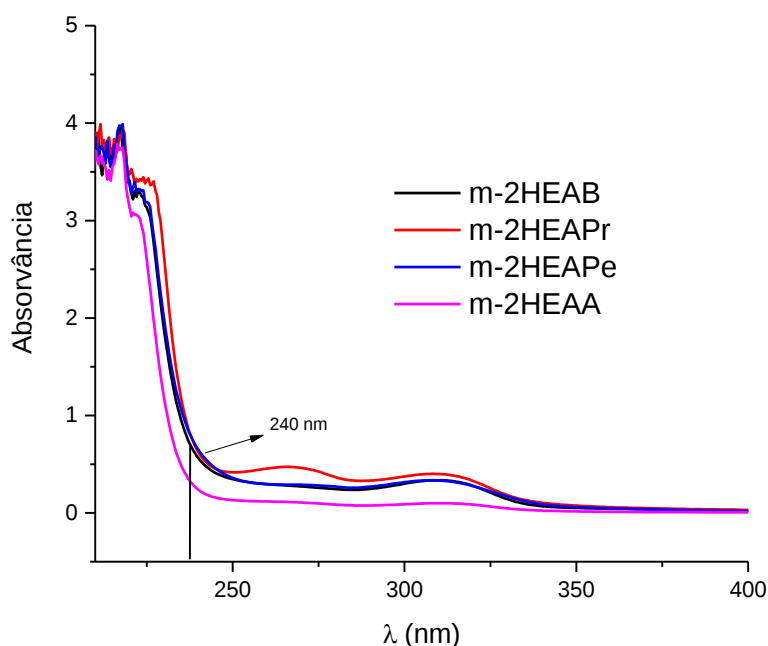


Figura 40. Espectro UV-Vis para os líquidos iônicos da série $[m-2HEA^+]$ (razão de diluição em tampão fosfato 1:29 (v/v)) (A linha preta corresponde à absorvância em 240 nm)

Como observado no espectro, todos os líquidos possuem um valor relativamente baixo de absorvância no comprimento de 240 nm. Assim é possível subtrair sem grandes desvios seu valor de absorvância na medida de atividade da enzima. O $[m-2HEA][Ac]$ apresenta o menor valor de absorvância no comprimento estudado; característica mais apropriada para a adaptação da metodologia de atividade da catalase na presença dos líquidos iônicos. O $[PEHA][Ac]$ apresentou um valor muito alto de absorvância em 240 nm, ainda a elevadas diluições, por tanto não foi possível realizar a medida de atividade enzimática com este líquido (resultado não reportado).

Para poder determinar a atividade da enzima junto com os líquidos era necessário também conhecer previamente sua solubilidade nos mesmos, para tanto foram realizadas misturas binárias de líquido iônico/tampão fosfato, nas quais foi dissolvida catalase na

concentração de 10 mg mL⁻¹. Os resultados destas solubilizações são apresentados a seguir na Tabela 5.

Tabela 5. Testes qualitativos de solubilidade da enzima catalase nos líquidos iônicos da série [m-2HEA⁺].

SOLUBILIDADE DA CATALASE							
COMPOSIÇÃO MISTURA		10	20	30	40	50	60
(%m/m de LI)							
LÍQUIDOS IÔNICOS	[m-2HEA][Ac]	S	S	S	S	S	S
	[m-2HEA][Pr]	S	S	S	S	S	S
	[m-2HEA][Bu]	S	S	S	S	I	I
	[m-2HEA][Pe]	S	S	I	I	I	I

Na Tabela 5, o S equivale às soluções na qual a catalase foi dissolvida e as células com I equivalem às composições nas quais a enzima não foi solubilizada. Para concentrações maiores a 60% nenhum líquido iônico conseguiu solubilizar a catalase. A solubilização foi acompanhada visualmente, onde a ausência ou presença de sólidos da catalase indicavam se tinha sido ou não solubilizado.

A enzima conseguiu-se dissolver em soluções de até 60% nos líquidos [m-2HEA][Ac] e [m-2HEA][Pr]. Para o [m-2HEA][Bu] e o [m-2HEA][Pe] a máxima solubilização foi em 40% e 20%, respectivamente. Isto é esperado, pois à medida que aumenta a cadeia do ânion a polaridade diminui; deixando o meio mais apolar e dificultando assim a solubilização da biomolécula. Como observado anteriormente, encontra-se carregada no meio estudado.

Outro termo importante a ser considerado para avaliar a solubilidade e estabilidade da enzima em meios iônicos é a polarizabilidade. Este conceito se refere ao potencial de dispersão iônico que ocorre na interface proteína/água onde as forças de Van der Waals, são mais relevantes que as forças de interação eletrostática. Como observado pela série de Hofmeister, ânions caotrópicos são mais polarizáveis, portanto, estes terão uma interação maior com a interface catalase/água (Boström *et al.*, 2003). Com o aumento da

cadeia do ânion presume-se que a polarizabilidade vai aumentar também e com isto as forças de Van der Waals se fazem mais relevantes. Assim, no pentanoato estas forças seriam mais proeminentes do que no acetato e, portanto, uma maior afinidade à interface da enzima seria observada. Este fato pode gerar uma maior adsorção do ânion na superfície da catalase e com isto uma forte desestabilização da mesma. Esta adsorção pode levar à diminuição significativa do pH na superfície da enzima podendo afetar inclusive seu sítio ativo, fato que implicaria na desestabilização e/ou desnaturação da mesma.

Igualmente, com o aumento da concentração dos íons, as interações eletrostáticas perdem importância frente ao potencial de dispersão iônica que se torna mais relevante (Boström, Williams e Ninham, 2004). Portanto, mesmo ânions cosmotrópicos podem afetar a estabilidade da enzima no meio, quando se encontrarem em altas concentrações. Por exemplo, o ânion acetato que a baixas concentrações estabiliza a catalase, a altas concentrações não conseguiria mais solubilizar.

Outro fator estudado foi o pH das misturas e sua variação com a concentração foi analisada em função da atividade da enzima na presença destas misturas. Valores muito afastados do pH ótimo podem desnaturar ou precipitar a enzima, assim, na Figura 41 são apresentadas as curvas de pH das misturas binárias em função da sua concentração.

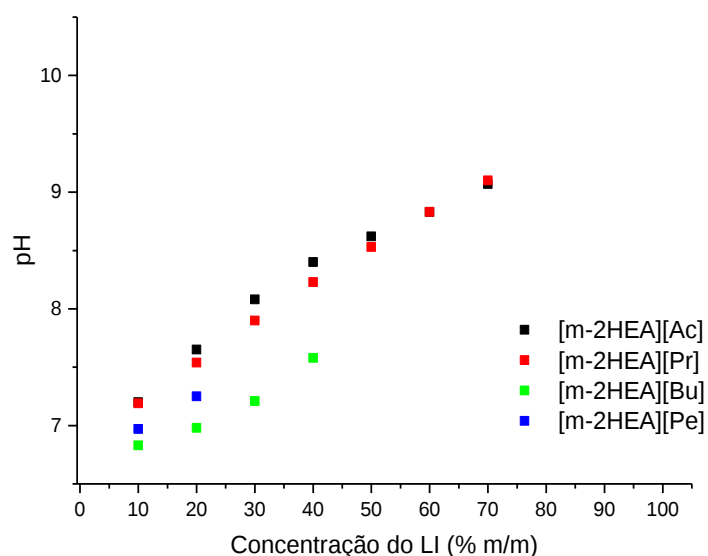


Figura 41. Variação do pH com o aumento da concentração de líquido iônico da série do $[m-2HEA^+]$ em uma mistura binária (LI/tampão).

Observa-se que em concentrações muito altas de líquido iônico, o pH das misturas aumenta muito, sendo que o tampão não consegue manter o pH do sistema no valor de 7,0. Isto leva a supor que a concentrações mais altas a 30%, a atividade da enzima deve diminuir; pois esta pode ser desnaturada ou precipitar por um efeito de salting out.

Abordados todos estes aspectos da solubilidade de catalase nos líquidos iônicos, foi calculada a atividade da enzima nas misturas de líquido iônico em tampão. Para isto, foi utilizada a metodologia modificada descrita no capítulo anterior. Assim, os resultados obtidos para os quatro líquidos iônicos são apresentados a seguir. Nas Figura 42 a Figura 45 observam-se as medidas de atividade para cada líquido nas composições em que a enzima apresentou solubilidade. Estas foram comparadas com o valor de atividade da enzima em ausência de líquido iônico o qual se encontra indicado por uma linha vermelha colocada nas figuras. Acima desta linha, o valor da atividade da enzima foi maior que a enzima pura; abaixo desta o valor da atividade foi menor.

Devido à medida experimental ser muito sensível e depender de muitos fatores, tais como temperatura e quantidade de enzima na amostra tomada, obtiveram-se valores de incerteza variáveis para cada ponto medido. Estas incertezas correspondem ao valor de desvio padrão obtido nas triplicatas medidas.

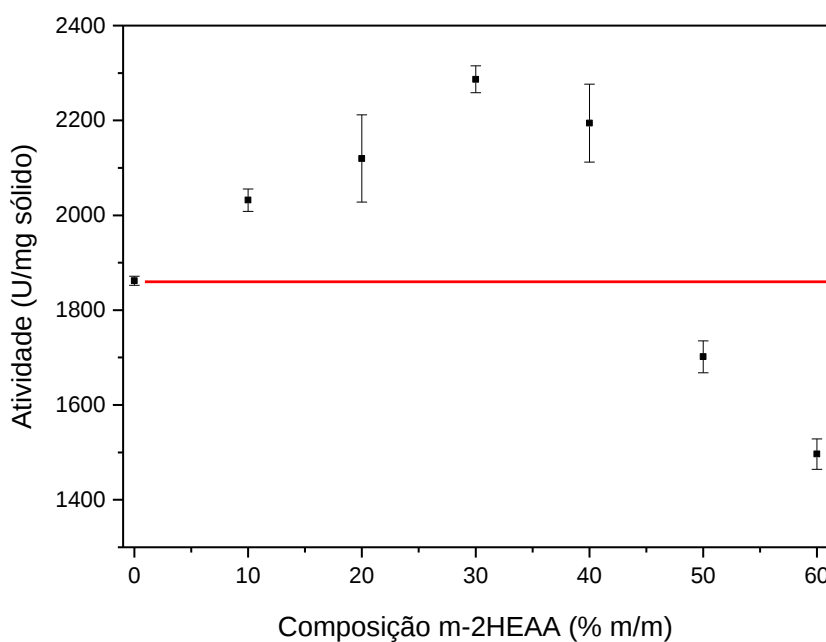


Figura 42. Efeito da concentração de [m-2HEA][Ac] na atividade da enzima catalase.

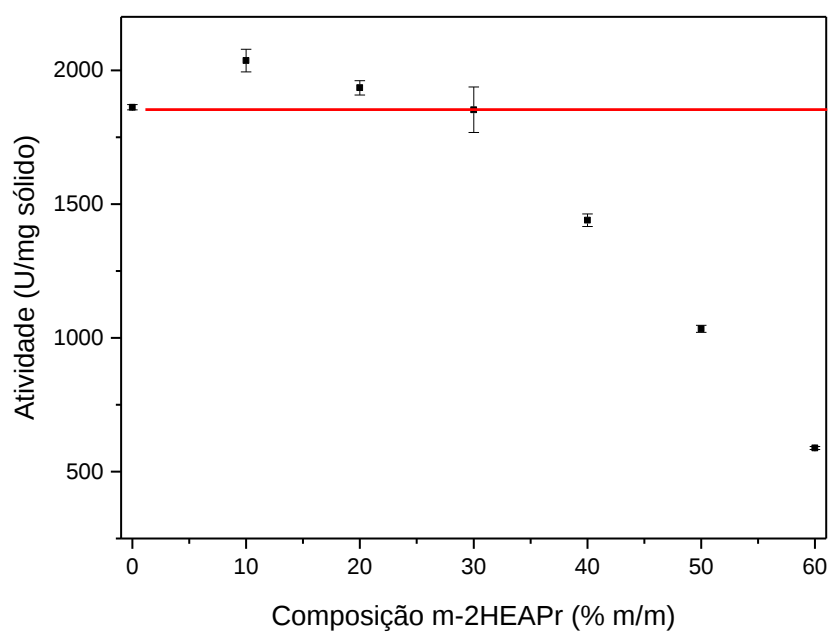


Figura 43. Efeito da concentração de [m-2HEA][Pr] na atividade da enzima catalase.

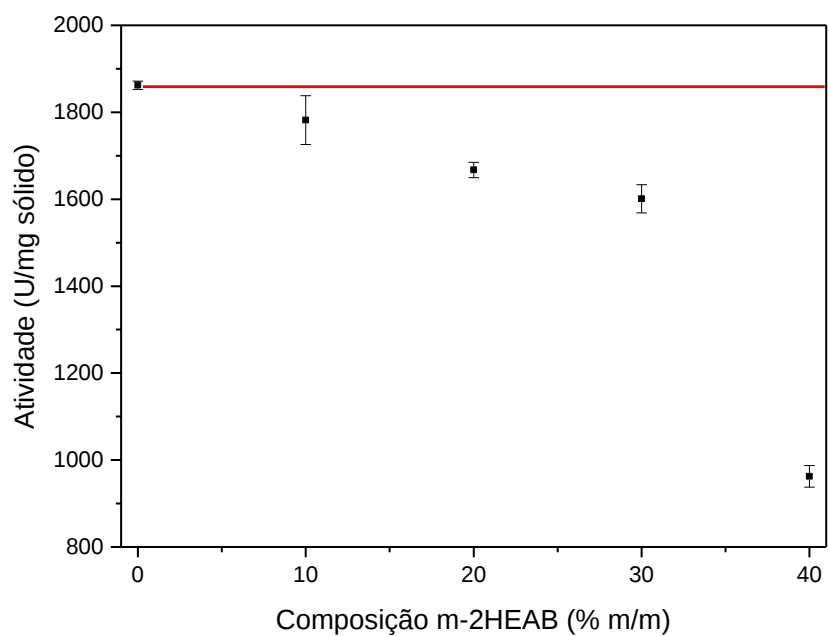


Figura 44. Efeito da concentração de [m-2HEA][Bu] na atividade da enzima catalase.

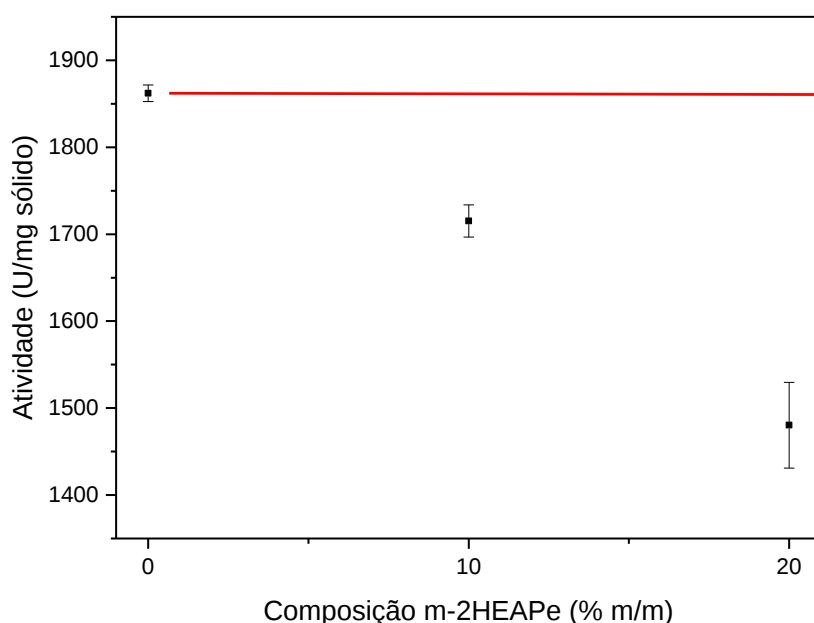


Figura 45. Efeito da concentração de [m-2HEA][Pe] na atividade da enzima catalase.

Nas proporções de 10 a 40% do [m-2HEA][Ac] houve um aumento da atividade apresentando um máximo em 30% (Figura 42). Aumento de atividade encontrou-se também para o [m-2HEA][Pr] entre as concentrações de 10 a 30% (Figura 43), mas sem apresentar um máximo na faixa estudada.

O aumento da atividade pode ser justificado pela presença de grupo OH no cátion de todos os líquidos utilizados. Lembrando que a catalase é capaz de oxidar também grupos doadores de prótons, como é o caso de alguns álcoois, então este OH poderia estar sofrendo um processo de oxidação, a qual aumentaria a atividade da enzima. Mas, devido ao acetato e o propanoato possuírem cadeias menores e serem mais cosmotrópicos, esses cátions permitiriam que a enzima preservasse mais sua estrutura. Portanto, a atividade da enzima poderia ser inclusive melhorada frente ao peróxido de hidrogênio quando este grupamento álcool estivesse presente. Adicional a isto, é sabido que o sítio ativo da catalase encontra-se profundamente alojado no interior da proteína; portanto, o substrato deve atravessar uma passagem hidrofóbica estreita, por onde só pequenas moléculas podem passar (Zamocky, Furtmüller e Obinger, 2008). Consequentemente, líquidos com ânions grandes, como o butanoato e pentanoato, dificilmente poderiam atravessar a camada hidrofóbica da enzima.

O fenômeno de aumento da atividade pode ser associado com as observações realizadas nos testes qualitativos preliminares. Na presença de [m-2HEA][Ac] em proporção aproximada de 50% e concentração de mais ou menos 15 mg mL^{-1} de catalase na mistura, foi observada a liberação de um gás na forma de aparecimento de bolhas, semelhante à reação de dismutação do peróxido de hidrogênio (mas em muita menor intensidade), na qual é liberado oxigênio.

A concentrações mais altas de líquido iônico, a enzima perde atividade. Isto é observado para valores maiores de 40% nos líquidos [m-2HEA][Ac] e [m-2HEA][Pr] e em todas as proporções utilizadas de [m-2HEA][Bu] e [m-2HEA][Pe] onde em nenhuma delas se manteve a atividade (Figura 44 e Figura 45).

Portanto, em meios mais viscosos é possível que a atividade tenda a diminuir; considerando a resistência do meio para o transporte do substrato até a superfície e, por consequência, ao sítio ativo da enzima. Desta forma, pode ser explicado o incremento e posterior decaimento da atividade no caso do [m-2HEA][Ac]. Para os outros líquidos igualmente este fenômeno pode afetar em alguma proporção.

A Figura 46 apresenta o comportamento da atividade da catalase em função da quantidade de carbono no ânion dos líquidos iônicos. Nesta, foram comparados os quatro líquidos até 40% de concentração, onde é possível observar como dito anteriormente, que até 40% e 30% a atividade é aprimorada com o [m-2HEA][Ac] e com o [m-2HEA][Pr] respectivamente, e em todas as outras proporções do [m-2HEA][Bu] e do [m-2HEA][Pe] a atividade diminuiu.

Considerando linhas de amarração que unissem os pontos da mesma concentração para cada líquido iônico veríamos que: em 10%, o valor de atividade é relativamente próximo ao branco para todos os líquidos iônicos. Em 20% a inclinação da reta de atividade apresentou um valor diferente devido a que o acetato e o pentanoato apresentaram valores significativamente mais baixos ao valor do branco. A 30% a anterior tendência se mantém exceto pelo [m-2HEA][Ac] que apresentou o maior valor de atividade. Finalmente, em 40% a inclinação novamente muda consideravelmente pois o propanoato e o butirato se afastam grandemente do valor do branco.

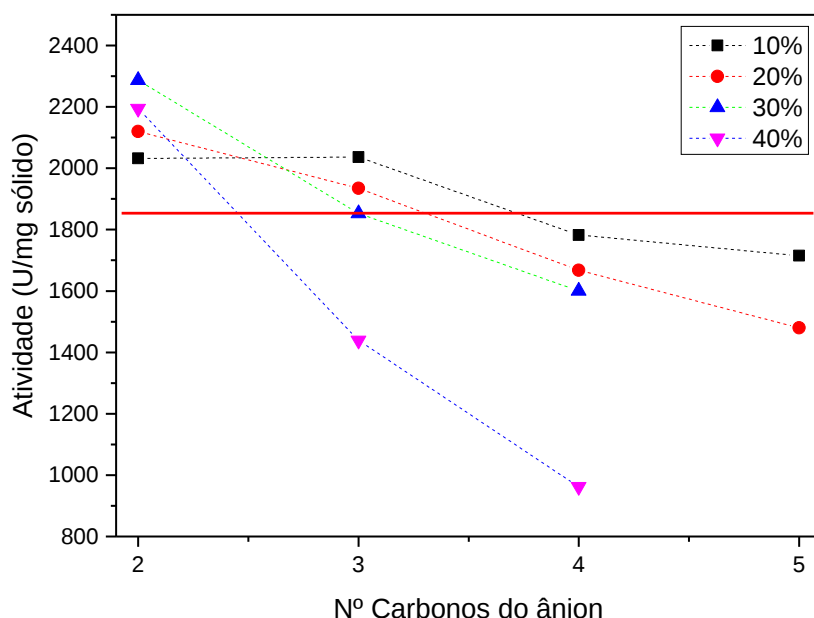


Figura 46. Variação da atividade de catalase em função do número de carbonos do ânion e da concentração dos líquidos iônicos. Tendência de atividade da enzima com o aumento da cadeia do ânion é acompanhada pelas linhas de amarração.

Resumindo, pode-se concluir que a atividade e solubilidade de uma enzima em misturas de líquidos iônicos dependem de quatro fatores: polaridade, pH, polarizabilidade e viscosidade. Desta forma esta série de Hofmeister construída para os líquidos iônicos com ânion $[m-2HEA^+]$ apresentam o seguinte comportamento:

Polaridade: $C2 > C3 > C4 > C5$ onde a redução da polaridade leva a uma redução da solubilidade.

Viscosidade: $C2 > C3 > C4 > C5$ e aumento da concentração leva ao aumento da viscosidade. Em geral, o aumento da viscosidade leva a diminuição da atividade enzimática, porém este parâmetro tem muita menos influência considerando que pelos resultados obtidos na presença do C2 a atividade é maior.

pH: não é possível indicar uma tendência para esta série pelas medidas experimentais realizadas aqui, porém pela teoria previamente descrita sabe-se que o pH na superfície da enzima vai diminuir da seguinte forma: $C2 > C3 > C4 > C5$. Igualmente, o aumento da

concentração de líquido faz com que o pH fique mais básico, fator que também afeta a estrutura e com isto a estabilidade e atividade da enzima.

Polarizabilidade: $C5 > C4 > C3 > C2$ onde o aumento deste parâmetro leva a uma desestabilização na superfície da catalase, o que se traduz numa perda de atividade e de solubilidade.

Finalmente, pode se concluir que nesta série de Hofmeister o ânion mais cosmotrópico (o que estabiliza a enzima) é o acetato e o mais caotrópico (desestabilizador da enzima) é o pentanoato. Desta forma, foi escolhido para a subsequente construção dos bioeletrodos o líquido iônico [m-2HEA][Ac] por possuir o ânion mais cosmotrópico da série. Igualmente, a concentração de 30% foi escolhida por ter encontrado nela a melhor resposta de atividade da enzima catalase na presença deste líquido iônico (vide Figura 42).

Síntese e caracterização dos CLEAs

A síntese dos CLEAs foi desenvolvida como descrito no capítulo de metodologia; foram obtidos quatro materiais eletródicos indicados na Tabela 6.

Tabela 6. Materiais eletródicos sintetizados e o código utilizado para elas.

CÓDIGO	MATERIAL ELETRÓDICO
CAT-I	Catalase imobilizada sem nenhum aditivo
CAT-G	Catalase imobilizada junto com grafite
CAT-[PEHA][Ac]	Catalase imobilizada com o líquido iônico [PEHA][Ac]
CAT-mA	Catalase imobilizada com o líquido iônico [m-2HEA][Ac]

A pesar de não ter sido possível medir o efeito do [PEHA][Ac] na atividade da catalase pelo método espectrofotométrico, os resultados no primeiro bioeletrodo construído indicaram uma relevante sinergia com a enzima e por tanto este líquido foi levado em consideração para aplicação nesta metodologia de imobilização.

Inicialmente, foram realizadas medidas de FTIR para os quatro materiais sintetizados e seus precursores. Os resultados são mostrados nas Figura 47 a Figura 52.

Na Figura 47 é apresentado o espectro de infravermelho da catalase “*in natura*”, fornecida diretamente pela Sigma-Aldrich sem nenhuma modificação.

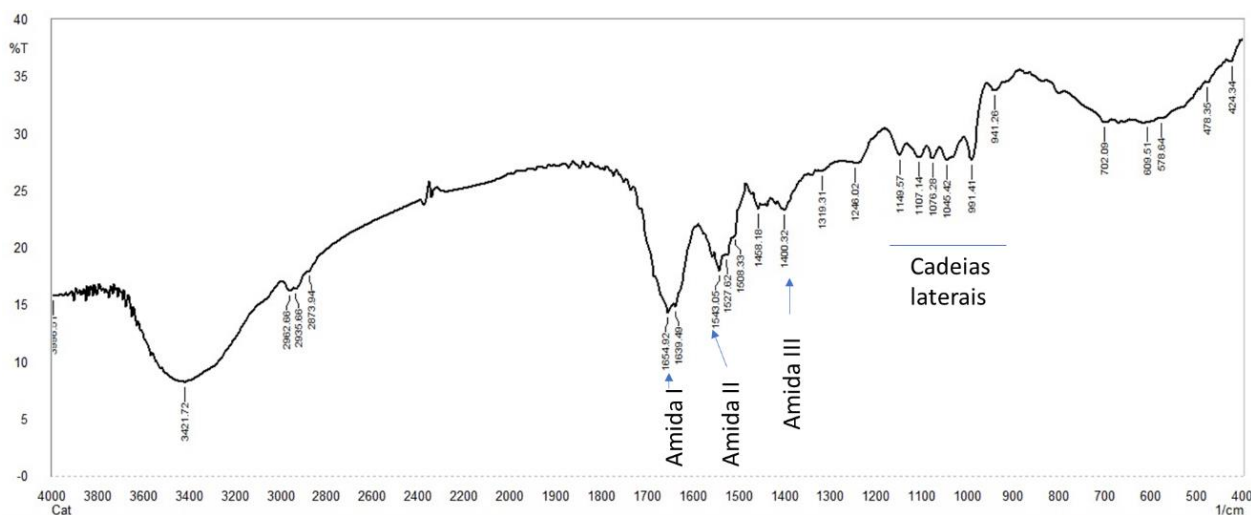


Figura 47. Espectro infravermelho da catalase “*in natura*”.

Em geral para todas as proteínas existem três bandas principais que podem ser observadas na espectroscopia de infravermelho (Barth e Zscherp, 2002). Estas bandas são chamadas de Amida I, Amida II e Amida III e correspondem a um composto modelo presente nos grupos polipeptídeos chamado de N-metilacetamida. Na Figura 48, apresenta-se esta molécula a qual é formada por uma reação de desidratação entre o NH e o COOH dos aminoácidos que compõem a enzima.

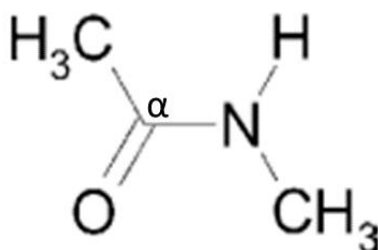


Figura 48. Estrutura do N-metilacetamida (NMA).

A amida I encontra-se no comprimento próximo a 1650 cm⁻¹, designado para a vibração de estiramento do grupo C=O, junto com menores contribuições de vibração de

estiramento fora de fase de CN, deformação CCN e flexão de NH no plano. Esta banda é principalmente atribuída à estrutura secundária das proteínas, geralmente resultante de ligações hidrogênio entre os grupos NH e CO dos resíduos de aminoácidos. Assim, a estabilidade de uma proteína, medida por espectroscopia de infravermelho pode ser avaliada em função da preservação desta banda.

A banda amida II aparece em aproximadamente 1550 cm^{-1} e corresponde à combinação fora de fase da flexão no plano do NH e a vibração de estiramento do CN, junto com pequenas contribuições de flexão no plano de CO e vibrações de estiramento de CC e NC.

Finalmente a banda amida III aparece na faixa de 1400 a 1200 cm^{-1} e corresponde à combinação em fase das vibrações de flexão de NH e de estiramento de CN, com pequenas contribuições da flexão no plano de CO e a vibração de estiramento do CC.

Adicional a estas bandas, na faixa de 1200 a 880 cm^{-1} são designadas as vibrações de estiramento do esqueleto das ligações N-C α . Este esqueleto é a cadeia de aminoácidos principal na qual o nitrogênio está ligado ao carbono alfa que aparece na Figura 48 com o símbolo α . Porém estas absorvem muito fracamente. Diferentemente, ocorre forte absorvência pelos aminoácidos das cadeias laterais as quais encontram-se ligadas à cadeia principal. Estes aminoácidos apresentam vibrações em diversas formas, como estiramentos e deformações no plano, além de vibrações de balanço e torção dos grupos adjacentes CH₂ (Barth e Zscherp, 2002).

Assim, na Figura 47 são observadas todas estas bandas nos seguintes números de onda:

- Amida I: 1654 cm^{-1} ,
- Amida II: 1543 cm^{-1} ,
- Amida III: 1400 cm^{-1} ,
- E seis bandas referentes às vibrações das cadeias laterais em: 1149, 1107, 1076, 1045, 991 e 941 cm^{-1} .

Comparando o espectro da catalase pura (Figura 47) com o espectro da catalase imobilizada (Figura 49), observa-se que as três bandas de amidas se mantêm praticamente inalteradas, porém ocorre o desaparecimento das bandas menores na faixa de 1200 - 880 cm^{-1} . Como dito anteriormente, estas bandas correspondem aos resíduos das cadeias laterais, portanto pode-se concluir que o glutaraldeído na imobilização está reagindo

principalmente com estes grupos, sem alterar sua estrutura secundária. Isto é confirmado com a preservação da banda de Amida I assim como as outras duas bandas de amidas relativas à cadeia principal do polipeptídio da enzima. Espera-se assim que a atividade da catalase seja mantida após o processo de imobilização; confirmada pelas medidas eletroquímicas quando será avaliada a atividade da enzima imobilizada.

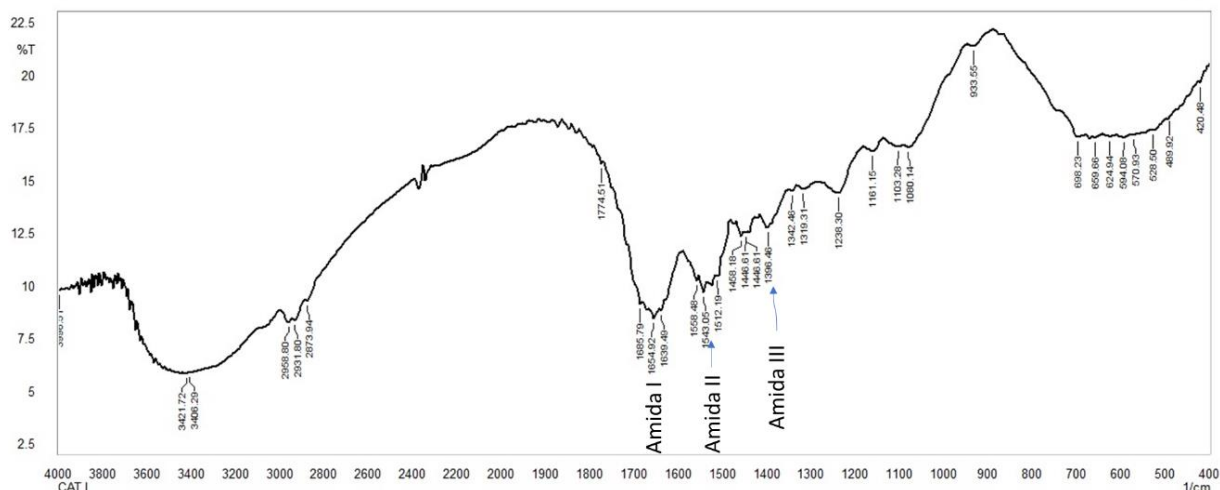


Figura 49. Espectro infravermelho da catalase imobilizada (CAT-I) pelo método CLEA.

A Figura 50 corresponde ao espectro da grafite o qual será comparado com o espectro do material CAT-G (Figura 51). Esperaria-se que neste espectro não fosse observado nenhum pico significativo (Tan *et al.*, 2013); porém na região de 3500 e 1600 cm^{-1} aparecem algumas bandas que podem ser impurezas presentes na grafite, como óxidos.

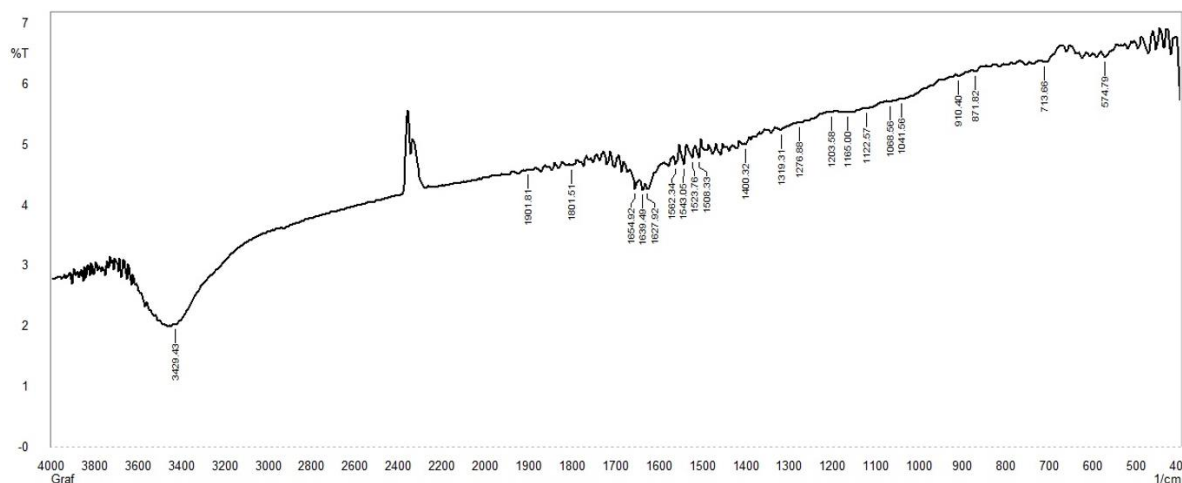


Figura 50. Espectro infravermelho do grafite cru.

Comparando o espectro da grafite (Figura 50) com o espectro da CAT-G (Figura 51), encontram-se bem discretamente as bandas já descritas, Amida I e II; porém a banda amida III não foi observada no espectro. O aparecimento destas bandas permite inferir que a catalase foi incorporada neste novo material. Considerando que a banda amida I está presente no espectro da CAT-G, pode-se concluir que sua estrutura secundária foi mantida após a imobilização sobre a grafite. Estes resultados levam a inferir que a atividade da enzima foi preservada; o que será confirmado posteriormente.

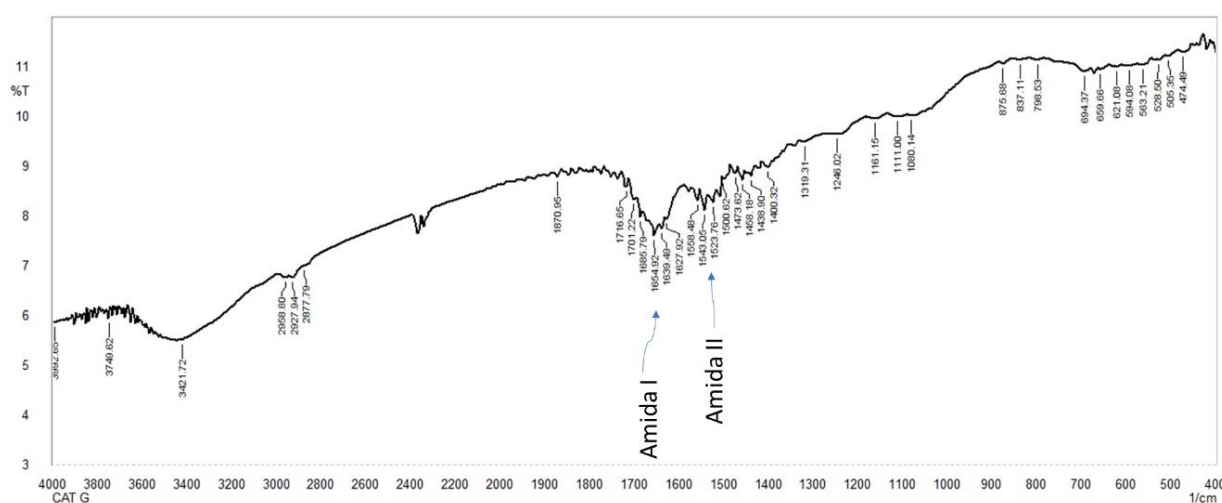


Figura 51. Espectro infravermelho da catalase imobilizada com grafite (CAT-G) pelo método CLEA.

Na Figura 52 apresenta-se o espectro de infravermelho para a catalase imobilizada com [m-2HEA][Ac] (CAT-mA). Comparando este resultado com o espectro do líquido iônico puro (Figura 26) e da catalase (Figura 47), observa-se que as bandas da catalase permanecem inalteradas, o que indica que a estrutura e atividade da enzima foram preservadas. Apesar disto, as bandas relativas ao [m-2HEA][Ac] não são observadas na Figura 52; provavelmente as mesmas encontram-se sobrepostas. Isto poderia levar a supor que o líquido iônico não foi ancorado na estrutura do CLEA. Mas será observado, a partir de dados de microscopias e voltametria, mudanças na estrutura e na atividade do CAT-I, indicativas da presença do líquido iônico.

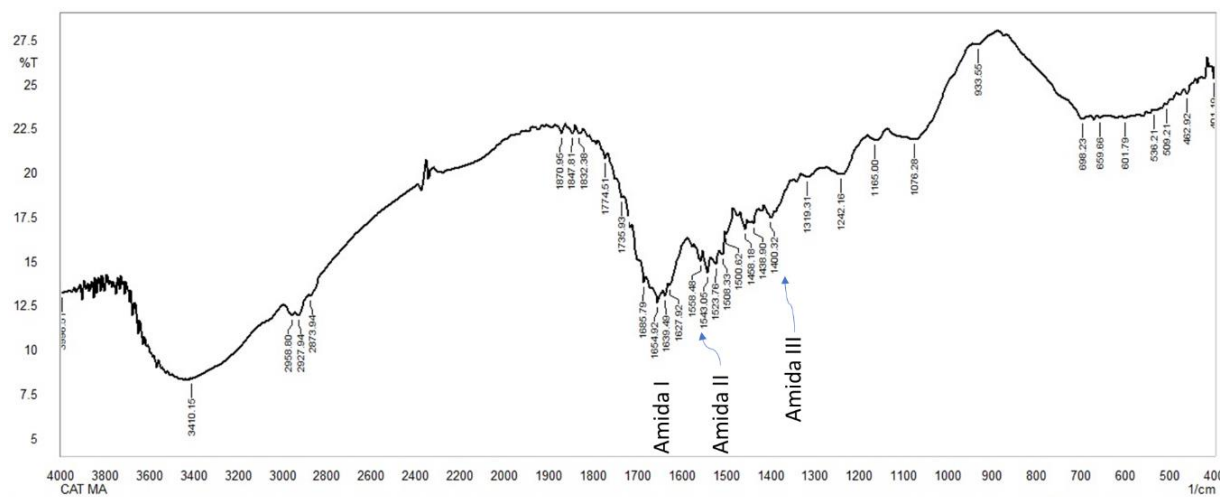


Figura 52. Espectro infravermelho da catalase imobilizada com o líquido iônico [m-2HEA][Ac] (CAT-mA).

Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os quatro materiais catalíticos são apresentadas a seguir nas Figura 53 a Figura 57.

Na Figura 53 se apresenta a micrografia do material CAT-I, nas ampliações de 500x, 1000x e 5000x vezes. É possível observar a tendência na formação de estruturas globulares de diferentes tamanhos, com aparência de estarem em processo de crescimento. Cavidades de diferentes tamanhos também são observados em 5000X de ampliação. Isto permite supor na possibilidade de o substrato penetrar áreas mais profundas do CLEA; sugerindo que este tipo de imobilização não é uma encapsulação e sim uma reticulação. Assim, o substrato pode acessar diversos níveis de profundidade do material.

Na Figura 54 tem-se a imagem do CAT-G. Nesta figura, observam-se superfícies heterogêneas onde algumas partes são lâminas planares (devido à presença do grafite) e em outras glóbulos, as vezes misturadas entre si; este fenômeno é particularmente observado na ampliação de 5000 vezes. Isto pode ser devido à mistura entre a grafite e a catalase, as quais conferem este aspecto irregular à superfície. Como no caso anterior, glóbulos de diferentes tamanhos são observados (claramente observados na ampliação de 2000 vezes), fato que sugere que o processo de imobilização ocorre em diferentes fases de crescimento durante todo o experimento. Devido à mistura se mostrar heterogênea poderia sugerir a possibilidade de o material CAT-G apresentar heterogeneidade na

atividade catalítica; este aspecto será detalhado quando a atividade da enzima for discutida.

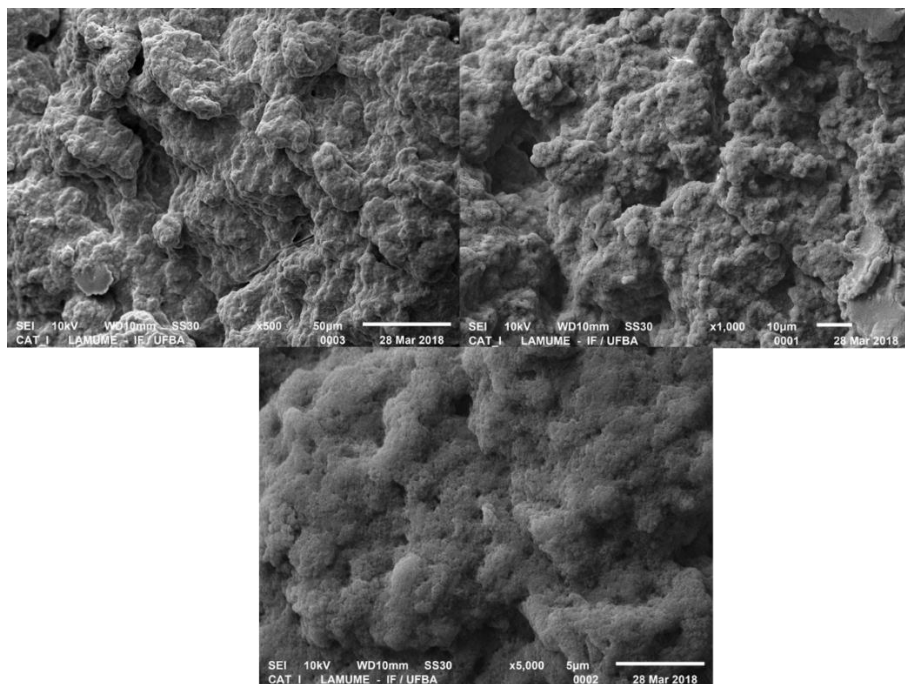


Figura 53. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-I nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.

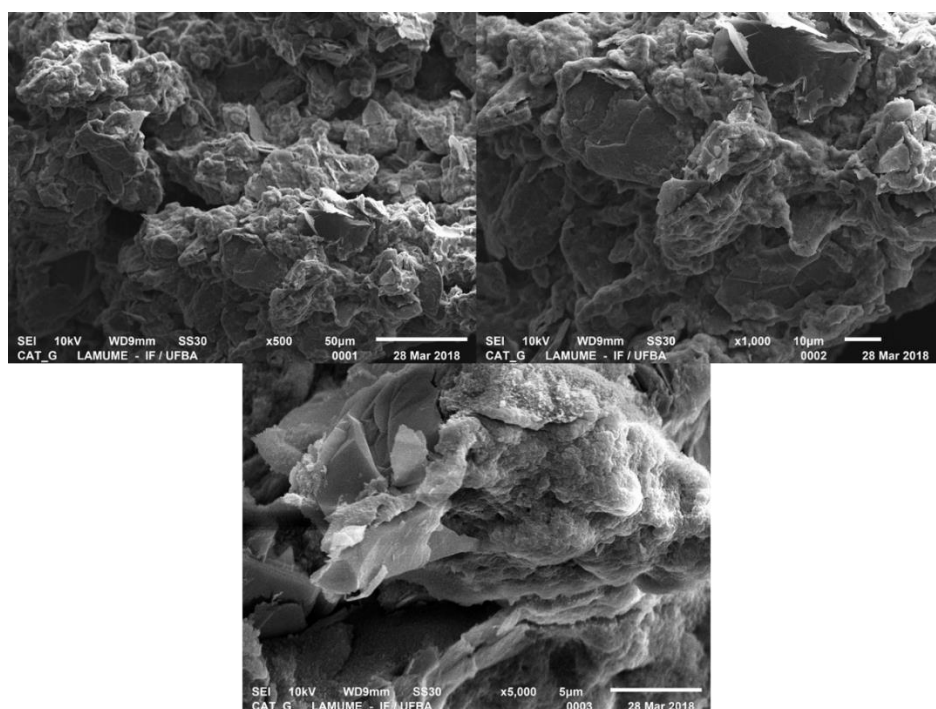


Figura 54. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-G nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.

A Figura 55 apresenta a micrografia do material CAT-[PEHA][Ac]. Nesta figura, observam-se igualmente formas globulares, menos definidas, porém de maior tamanho, junto com pequenos glóbulos isolados e com aspecto de grãos em crescimento na superfície do material. Em geral, o [PEHA][Ac] parece gerar uma estrutura superficial muito mais aglomerada e menos definida.

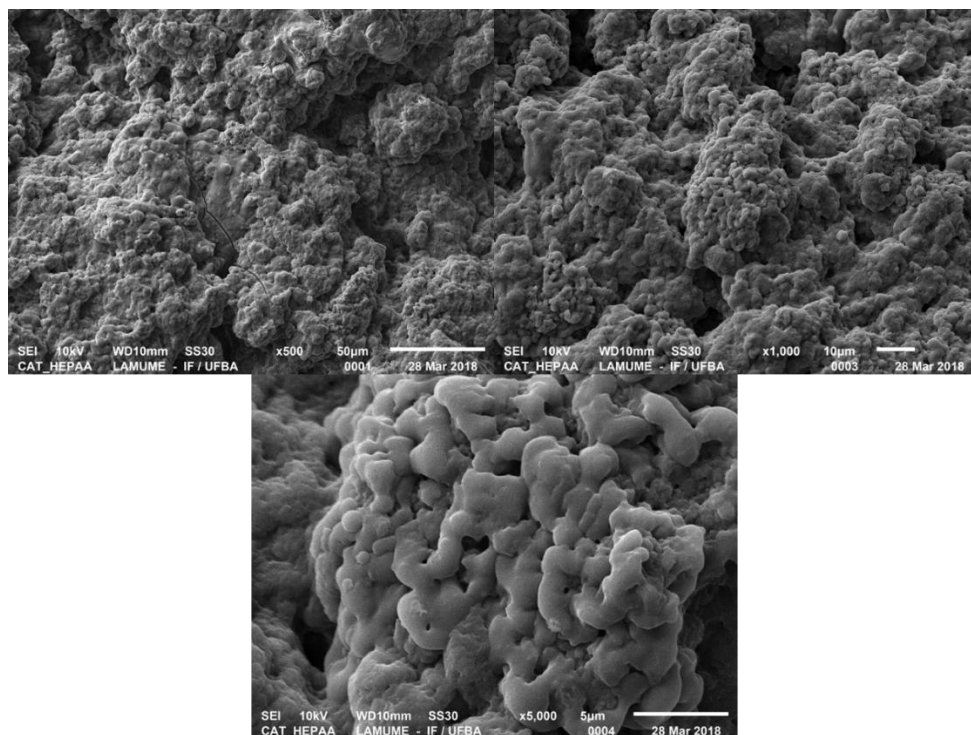


Figura 55. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-[PEHA][Ac] nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.

A Figura 56 apresenta a micrografia do material CAT-mA, no qual se observam glóbulos muito menores e mais definidos comparados com o material CAT-[PEHA][Ac] (Figura 55). Na ampliação de 1000 vezes, observam-se também muitas fendas, sugerindo maior facilidade do substrato para entrar ao interior do material catalítico. Comparando nesta mesma ampliação com o material CAT-I, Figura 53, os glóbulos se apreciam de um tamanho menor.

A diferença entre as micrografias dos dois materiais imobilizados com os líquidos iônicos, [PEHA][Ac] e [m-2HEA][Ac], sugerem que na presença do primeiro, o CLEA de catalase sofre uma polimerização muito mais intensa em relação ao segundo líquido. Isto é uma consideração plausível quando as estruturas dos dois líquidos iônicos são comparadas, pois o [PEHA][Ac] pode polimerizar.

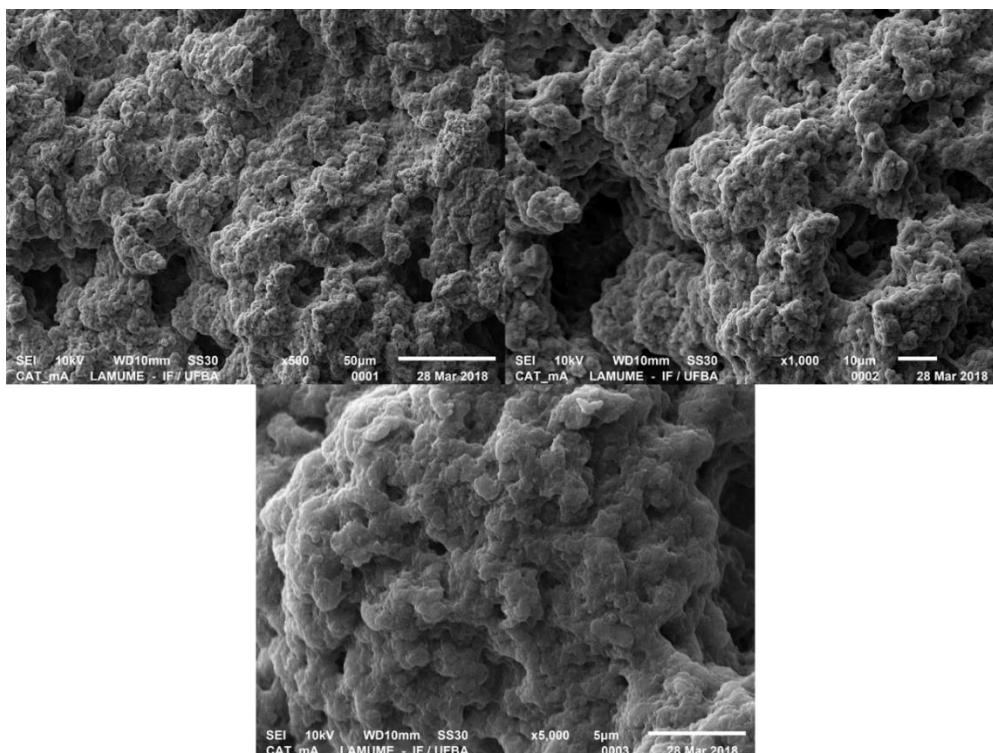


Figura 56. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-mA nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.

Finalmente, para a construção dos bioeletrodos foi necessário adicionar quantidades de Nafion[®] suficientes que mantivessem o material fixo no orifício do eletrodo e compacto entre si. A fim de confirmar se houve uma mudança na estrutura após a adição do mesmo, microscopias do material imobilizado CAT-I foram tomadas e suas imagens são apresentadas a seguir na Figura 57.

Comparando estas imagens (Figura 57) com as imagens da Figura 53 do CAT-I, observa-se que o material permanece quase inalterado, sem mudanças significativas no tamanho dos glóbulos como no aspecto dos mesmos. Portanto, espera-se que cataliticamente o material mantenha sua atividade; fato que será confirmado com as medidas eletroquímicas.

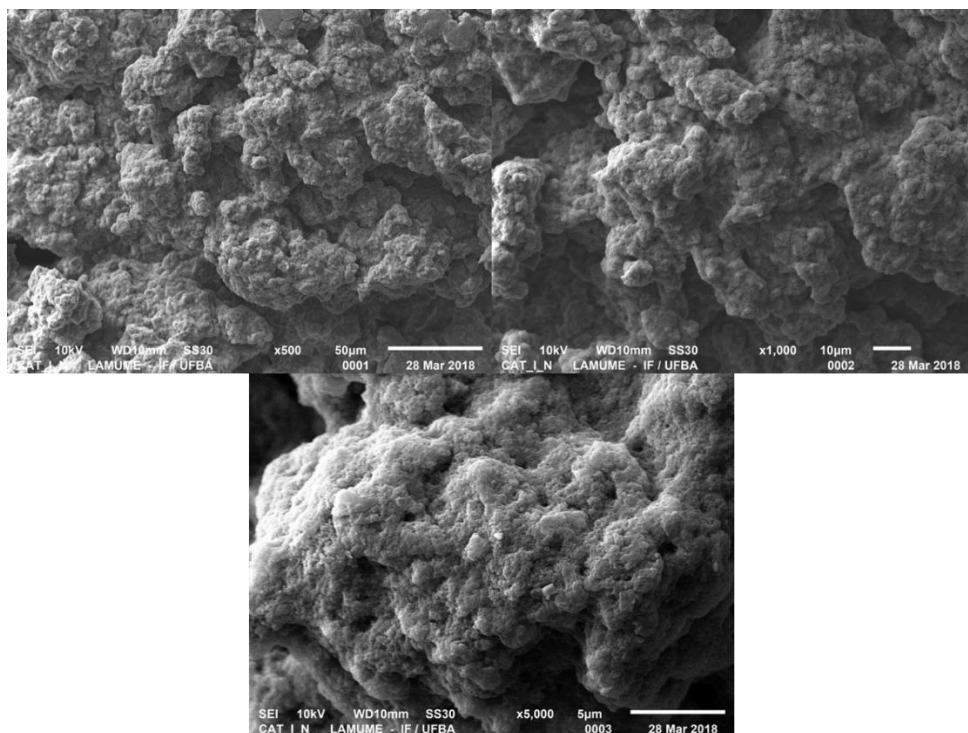


Figura 57. Microscopias Eletrônicas de Varredura do material CAT-I na presença de nafion® nas ampliações de 500, 1000 e 5000 vezes.

Caracterizações eletroquímicas

Para realizar as caracterizações eletroquímicas foram construídos quatro bioeletrodos onde o material catalítico foi colocado no orifício do eletrodo oco. A Figura 58 mostra a ilustração do bioeletrodo CAT-I; neste, o orifício foi preenchido com o material imobilizado.



Figura 58. Ilustração do eletrodo oco preenchido com material catalítico CAT-I.

Inicialmente foram realizadas medidas de voltametria cíclica para caracterizar a resposta eletroquímica e avaliar a estabilidade do bioeletrodo; bem como, estudar a etapa limitante do processo global que ocorre no bioeletrodo. Posteriormente, para avaliar a resposta dos bioeletrodos frente ao substrato peróxido de hidrogênio, foram realizadas medidas de voltametria de onda quadrada.

Devido ao desprendimento de material catalítico do orifício do eletrodo, foi necessário adicionar Nafion®, a fim de compactar o material e conferir consistência adequada ao bioeletrodo. Assim, foi necessário previamente confirmar se a presença de Nafion® afetava a resposta voltamétrica do material. Na Figura 59 observam-se as respostas voltamétricas dos bioeletrodos CAT-I construídos na presença e na ausência de Nafion® em meio de tampão fosfato, 50 mmol L⁻¹ pH 7,0. A janela de trabalho foi escolhida ampliando-se de forma gradativa a região de potenciais tanto negativos como positivos.

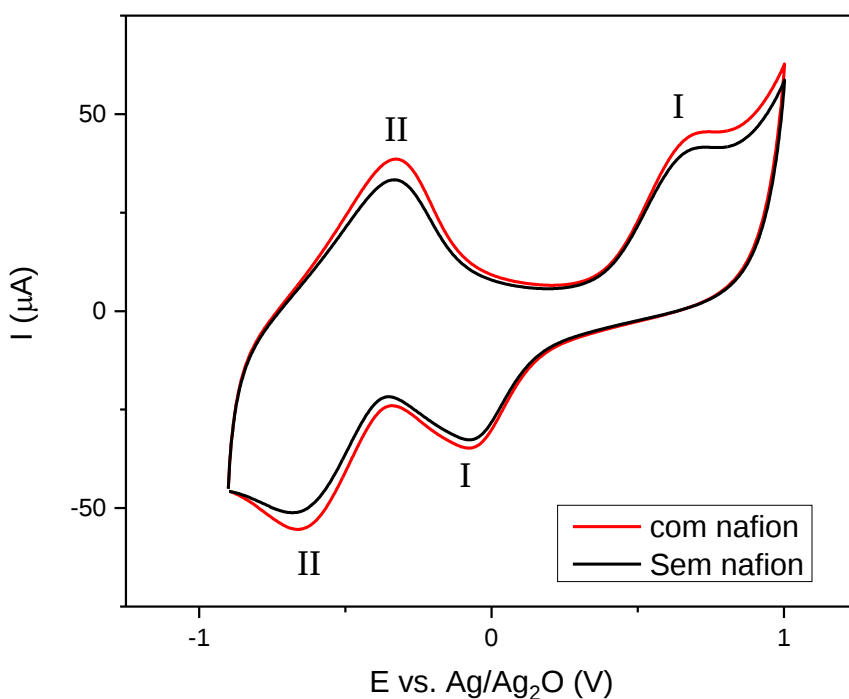


Figura 59. Resposta voltamétrica do eletrodo CAT-I na ausência (linha preta) e na presença de nafion® (linha vermelha). Tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como percebido na Figura 59, a resposta do biocatalisador na presença de Nafion® não é alterada, sem afetar nem os potenciais dos picos assim como a intensidade e formato

dos mesmos. Portanto, depois desta verificação todos os bioeletrodos foram construídos com adição de Nafion®, pois o mesmo não afetou a resposta eletroquímica do material imobilizado e permitiu a sua adesão ao eletrodo oco.

Nos voltamogramas do CAT-I (Figura 59), observam-se dois pares de picos redox nos seguintes potenciais, um par a potenciais mais positivos ($E_{pa} = 0,736$ V; $E_{pc} = -0,077$ V; referenciado como par I); e outro par a potenciais na região mais negativa ($E_{pa} = -0,316$ V; $E_{pc} = -0,641$ V; referenciado como par II); atribuídos a prováveis processos redox da catalase imobilizada. A melhor janela de potencial encontrada para este material foi de -1,0 a 1,0 V.

A avaliação dos picos permite diagnosticar que os processos redox que ocorrem são irreversíveis, pois valores como o ΔE_p são muito superiores a $59/n$ e a razão de correntes é diferente de 1 (Bard e Faulkner, 2001). Adicionalmente, se observa pouca simetria entre os picos de cada par apresentados no voltamograma.

A estabilidade do bioeletrodo foi constatada com a varredura dos voltamogramas em diferentes momentos ao longo dos experimentos e após diversas manipulações do mesmo. Na Figura 60 se observam três scans realizados em diferentes dias, em tampão fosfato, pH 7,0 e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

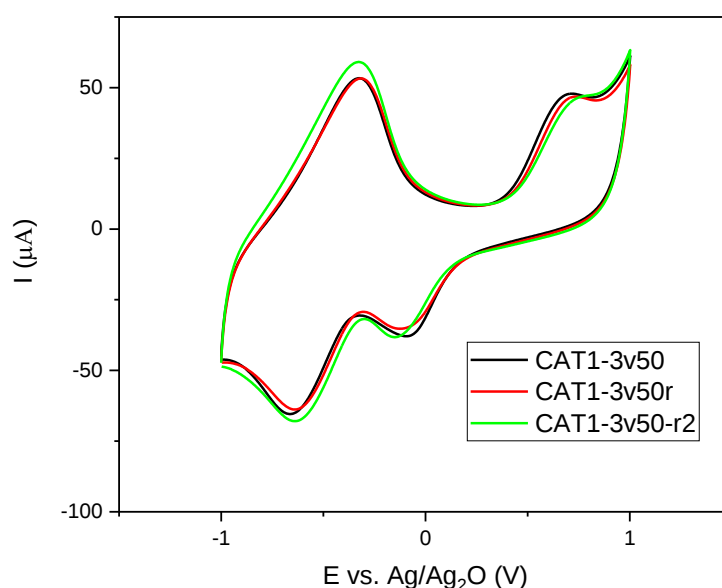


Figura 60. Comparativos de estabilidade do bioeletrodo CAT-I após diversas manipulações em diferentes dias. Tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nesta Figura 60, observa-se que os picos permanecem praticamente inalterados, mantendo aproximadamente o potencial e a corrente originais, sem o aparecimento de novos picos ou deslocamento dos picos iniciais. A estabilidade é uma propriedade importante para poder realizar um estudo comparativo e sistemático dos quatro materiais propostos.

O estudo de velocidades de varredura permite definir o fator limitante da interação do substrato com o bioeletrodo (processo global), seja este, difusão ou adsorção do substrato até ou na superfície do bioeletrodo, respectivamente. Assim, na Figura 61 observam-se os voltamogramas da variação da velocidade de varredura (do voltamograma interno ao externo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s^{-1}).

A variação de corrente com a velocidade de varredura é apresentada na Figura 61 **A**, para o par redox 1 e 2, respectivamente. Esses dois parâmetros apresentam excelente correlação linear para todos os picos estudados com a velocidade de varredura (Figura 61 **B e C**). Este comportamento linear da corrente com a velocidade de varredura indica que o processo eletroquímico é confinado à superfície. Em outras palavras, o fator limitante do processo eletroquímico é a adsorção do substrato à superfície do bioeletrodo (Bard e Faulkner, 2001).

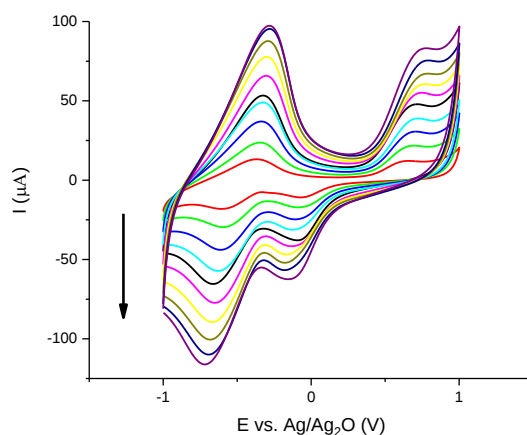
A variação do potencial de pico também foi avaliada com a variação da velocidade de varredura. Na Figura 62 observa-se que o potencial varia em mais ou menos 0,1 V, quando a velocidade de varredura varia de 10 a 100 mV s^{-1} ; isto sugere uma fácil cinética de transferência de carga nessa faixa de varreduras.

Já para velocidades de varredura superiores a 100 mV , a separação dos picos se faz muito maior como pode ser observado na Figura 63. Isto indica que a valores superiores a 100 mV o processo redox sofre limitações decorrentes da cinética de transferência de carga. Igualmente, nesta faixa de velocidades alguns picos desaparecem, sendo que somente se preserva o pico anódico de regiões mais negativas (par 2). Estes comportamentos são indicativos de processos irreversíveis.

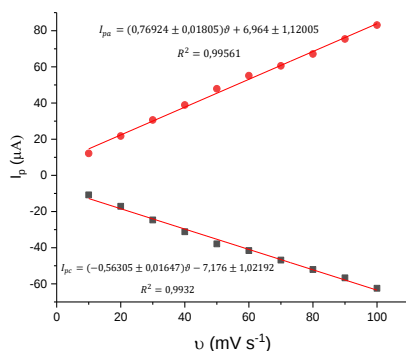
Para determinar a atividade do bioeletrodo frente ao substrato foram testadas várias técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica, voltametria de varredura linear e cronoamperometria. Mas somente por voltametria de onda quadrada, foi possível detectar sinal elétrico e quantificar a resposta do bioeletrodo. Para realizar medidas por voltametria

de onda quadrada, é necessário determinar previamente os parâmetros voltamétricos, frequência, amplitude e incrementos de potencial (ΔE).

A



B



C

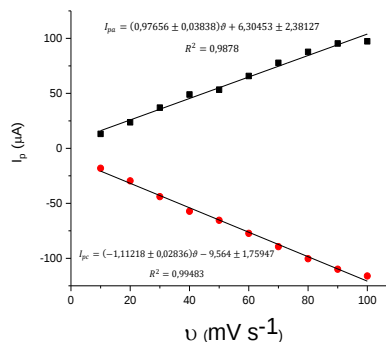


Figura 61. (A) Estudo das velocidades de varredura (voltamogramas interno ao externo: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s^{-1}) para o eletrodo CAT-I no meio de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0. Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu\text{A}$) e catódico ($I_{pc}/\mu\text{A}$) vs. velocidade de varredura v (mV s^{-1}) para: (B) o par de picos redox I e (C) o par de picos redox II.

Em geral para os quatro sistemas estudados, com a diminuição do ΔE observou-se que diminuem a corrente resultante e a velocidade de varredura; porém os picos ficam mais definidos. Com o aumento da amplitude, aumenta a corrente; a velocidade de varredura se mantém constante e os picos resultantes aparecem mais definidos. Finalmente, com o

aumento da frequência aumentam a corrente e a velocidade de varredura, mas os picos perdem definição.

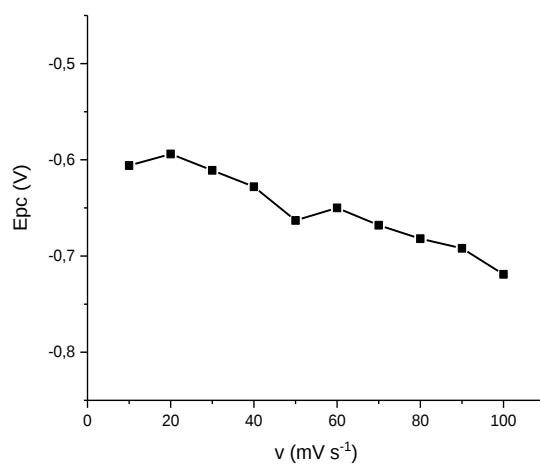


Figura 62. Variação de potencial do pico catódico para o par de picos 2.

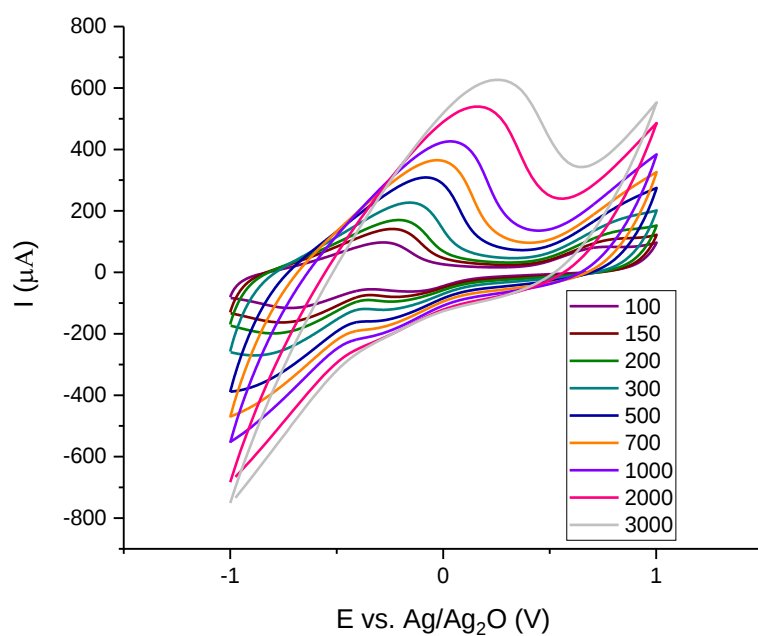


Figura 63. Estudo a altas velocidades de varredura para o bioeletrodo CAT-I em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. (voltamogramas interno ao externo: 100 a 3000 mV s⁻¹)

Os voltamogramas realizados para a determinação dos melhores parâmetros voltamétricos, não foram realizadas na presença de peróxido de hidrogênio, pois apresentaram-se muitas dificuldades para a posterior limpeza do bioeletrodo. Após cada medida era necessário usar um tempo excessivamente grande para a limpeza do bioeletrodo e o uso de potenciais muito elevados para limpeza levou à destruição do mesmo. Por estes fatos, foi inviável o desenvolvimento destas medidas de forma rigorosamente analítica.

As variações de parâmetros foram realizadas em modo univariável, onde somente um variava e os outros dois parâmetros eram mantidos constantes. Na Figura 64 observam-se os voltamogramas e sua variação em função da variação de frequência f , amplitude e incrementos de potencial ΔE ; assim como a variação de corrente no potencial de -0,17 V em função de cada um destes parâmetros.

Extraindo a corrente obtida para cada frequência no potencial previamente determinado de -0,17 V pode-se realizar uma curva de variação da corrente em função da frequência aplicada (Figura 64, **B**). Este potencial foi escolhido por medidas prévias de voltametria de onda quadrada, potencial no qual foi observado resposta eletroquímica do bioeletrodo frente ao peróxido de hidrogênio. Assim, na Figura 64, **B** se observa um aumento linear da corrente até 40 Hz, após este valor a corrente tende a uma estabilização. Este comportamento (não linear) é indicativo de um processo quase-reversível (Souza, Machado e Avaca, 2003).

Esperaria-se que a frequência escolhida para a medida fosse 40 Hz. Porém, quando foi avaliada a resposta integral a esta frequência por voltametria de onda quadrada, encontrou-se que só a frequências menores a 40 Hz aparecem outros picos. Isto é compatível com a observação onde a menor frequência a velocidade de varredura também foi menor e, portanto, mais facilmente ocorre o processo de transferência eletrônica. Assim, seguindo esta linha de raciocínio, pode-se observar que a 8 Hz os picos são bem mais definidos do que a outras frequências, portanto o valor de 8 Hz foi o mais apropriado.

Na Figura 64, **C** observam-se os voltamogramas em função da variação da amplitude e na Figura 64, **D** apresenta-se a avaliação da corrente no potencial fixado, em função da variação de amplitude. Neste estudo encontrou-se que a corrente resultante aumenta linearmente com a amplitude e para efeitos da medida, escolheu-se uma amplitude intermediária de 0,1 V.

Finalmente, foi avaliado o efeito da variação do incremento de potencial ΔE no sistema em estudo (Figura 64, E e F). Encontrou-se que até 6 mV há um significativo aumento da corrente no potencial de -0,17 V. Após este valor de ΔE a corrente não apresentou um aumento significativo.

Com o aumento de ΔE aumenta também a corrente, porém observou-se que os picos perdiam definição. Igualmente, a velocidade de varredura fazia-se maior, fato que como observado previamente não favorece a transferência de carga no bioeletrodo. Portanto, escolheu-se o ΔE de 2 mV. Assim, foram escolhidos os parâmetros de frequência de 8 Hz, ΔE de 2 mV e amplitude de 0,1 V.

Após escolhidas as melhores condições das medidas de voltametria de onda quadrada, foram realizadas as medidas cinéticas na presença do peróxido de hidrogênio. Para isto, foram adicionadas alíquotas de 0,5 μL de peróxido de hidrogênio e medidas de voltametria de onda quadrada foram realizadas sucessivamente até que a corrente atingisse um valor estacionário (I_{ss}). O intervalo em tempo entre cada medida foi quantificado a fim de poder correlacionar a corrente resultante com a variável tempo. No início, o sistema demorou mais tempo para atingir a corrente de estado estacionário e, portanto, mais tempo foi necessário para adicionar a segunda alíquota. Adições posteriores de peróxido de hidrogênio atingiram o equilíbrio rapidamente, até chegar ao ponto em que o sistema não apresentou mais aumento de corrente. Neste ponto pode-se concluir que a enzima no bioeletrodo foi saturada, ou seja, todo o sítio ativo da mesma foi preenchido pelo substrato.

Na Figura 65 observam-se as curvas de voltametria de onda quadrada em resposta às adições sucessivas de peróxido de hidrogênio. Nesta figura, a corrente de pico em aproximadamente -0,17 V aumenta em função da adição destas alíquotas. Assim, este pico pode ser atribuído à resposta eletrocatalítica do bioeletrodo frente ao peróxido de hidrogênio.

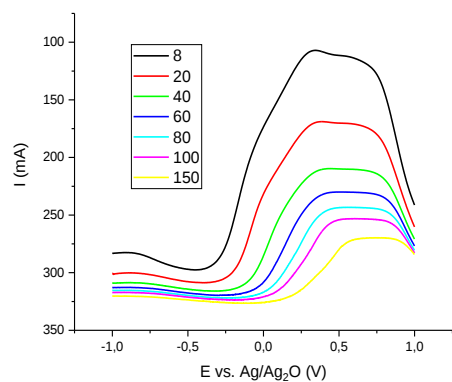
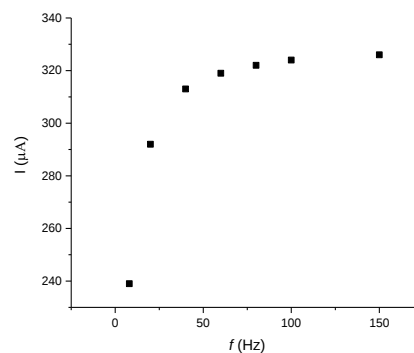
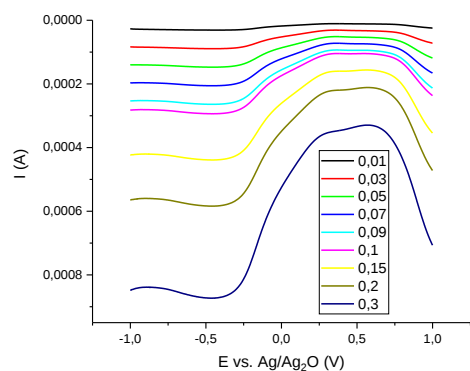
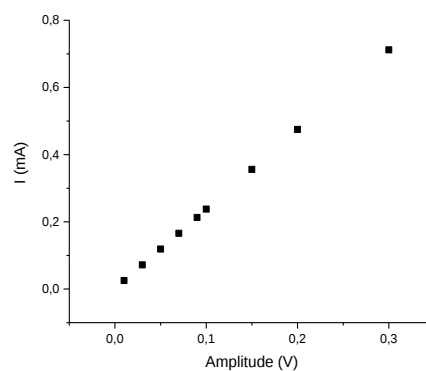
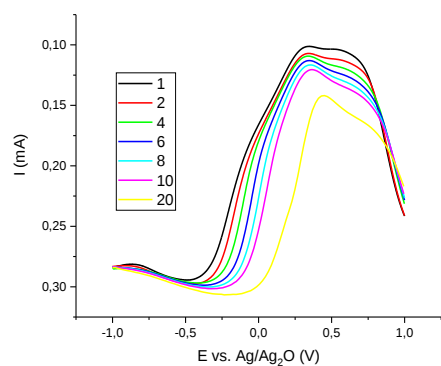
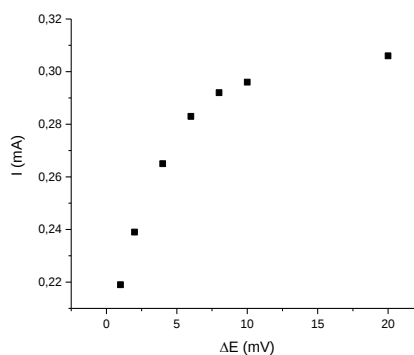
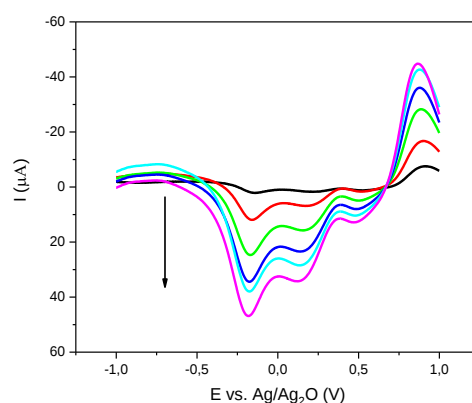
A**B****C****D****E****F**

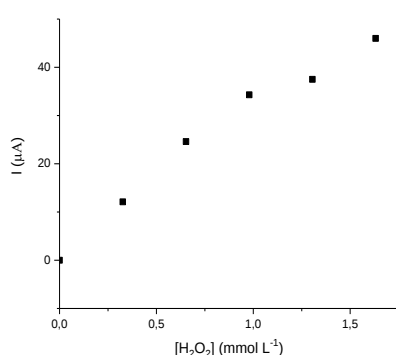
Figura 64. Resposta do bioeletrodo CAT-I por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: **A – B**) frequência (8 a 150 Hz), A = 0,1 V, ΔE = 2 mV, **C – D**) amplitude (0,01 a 0,3 V), f = 8 Hz e ΔE = 2 mV, e **E – F**) incrementos de potencial ΔE (1 a 20 mV), f = 8 Hz e A = 0,1 V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de -0,17 V.

Baseado na Figura 65 **A**, foi possível avaliar a variação de corrente em função da concentração de peróxido de hidrogênio obtendo assim a curva apresentada na Figura 65, **B**. Observa-se que inicialmente a corrente aumenta quase linearmente. Posteriormente, a corrente apresenta menor aumento, tendendo a um comportamento de estabilização, o qual indica a saturação da enzima no bioeletrodo. Este comportamento pode ser ajustado com o modelo cinético de Michaelis-Menten, o qual pode ser linearizado de acordo com a equação de Lineweaver-Burk para aplicações eletroquímicas (Periasamy, Ho e Chen, 2011).

A



B



C

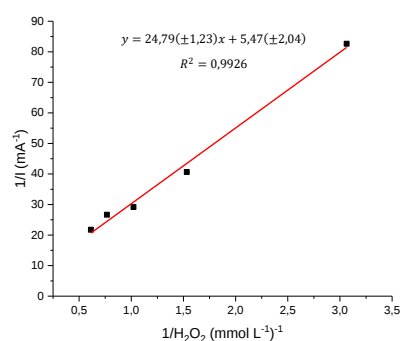


Figura 65. Tratamento cinético do bioeletrodo CAT-I em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; a partir de medidas de voltametria de onda quadrada, $f = 8$ Hz, $A = 100$ mV, $\Delta E = 2$ mV. $v = 15,6$ mV s⁻¹: **A**) na adição sucessiva de aliquotas de 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio, **B**) Variação da corrente de pico $E_{pc} = -0,17$ V, em função da concentração de peróxido de hidrogênio e **C**) Linearização da curva **B** para a determinação dos parâmetros K_M e I_{max} .

Esta linearização é feita aplicando o recíproco da equação de Michaelis-Menten no qual se obtém o inverso da corrente de estado estacionário e da concentração do peróxido de hidrogênio. Assim, obtém-se a equação 6 a seguir:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M}{I_{max}} * \frac{1}{[H_2O_2]} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde I_{ss} é a corrente de estado estacionário após cada adição de peróxido de hidrogênio, I_{max} é a corrente máxima medida em solução de substrato saturado, $[H_2O_2]$ é a concentração do substrato em molaridade e K_M é a constante de Michaelis-Menten. Esta constante dá informação do grau de afinidade do substrato à enzima, sendo que menores valores indicam uma maior afinidade (Berg, Tymoczko e Stryer, 2007). Igualmente, I_{max} está diretamente relacionado com o número de turnover que, como dito anteriormente, indica quantas moléculas de substrato a enzima pode transformar em um segundo, quando a enzima se encontra totalmente saturada. A relação entre este número de turnover e a I_{max} está dada pela seguinte expressão na equação 7:

$$I_{max} = k_2[E]_T \quad (\text{Equação 7})$$

Onde k_2 é o número de turnover e $[E]_T$ é a concentração dos sítios ativos da enzima. Este número k_2 terá uma expressão matemática diferente a depender dos passos de reação e do passo limitante na reação global (Nelson e Cox, 2005). Para efeitos de análise nesta tese será usado o valor de I_{max} como um valor proporcional ao número de turnover e dos sítios ativos da enzima para discussão e comparação entre todos os materiais catalíticos. A partir da linearização de Lineweaver Burk foi possível ajustar os dados e obter os valores de I_{max} e K_M resultantes da Figura 65, C.

Observa-se na Figura 65, C que os dados foram linearizados com um fator de correlação de $R^2 = 0,9926$, uma inclinação da curva de 24,79 e um intercepto de 5,47. Com o intercepto se obtém o valor do recíproco de I_{max} e com a inclinação da curva se obtém a relação de K_M/I_{max} . A partir destes valores da curva linearizada foram obtidos I_{max} igual a 0,183 mA e K_M igual a 4,53 mM. Ao final de todas as avaliações eletroquímicas dos quatro materiais serão comparados e discutidos estes valores cinéticos, os quais estão apresentados mais adiante na Tabela 7, página 131.

Após analisar o bioeletrodo CAT-I, foi avaliado o bioeletrodo CAT-G para o qual foram realizadas as mesmas análises e os resultados serão mostrados a seguir. Na Figura 66, se apresenta a resposta voltamétrica em modo comparativo dos bioeletrodos CAT-G e CAT-I.

Como pode ser observado, a presença do grafite permitiu ampliar a janela de potencial a valores mais negativos (-1,2 a 1,0 V). O formato dos voltamogramas é mantido em geral, se observam dois pares de picos; porém ocorre um deslocamento dos mesmos e um leve aumento na corrente dos picos a potenciais mais negativos. Para o par 1 (potenciais mais positivos) os picos se apresentam em $E_{pa} = 0,743$ V e $E_{pc} = -0,218$ V; para o par 2 (potenciais mais negativos) os picos se apresentam em $E_{pa} = -0,343$ V e $E_{pc} = -0,689$ V. Estes processos podem ser atribuídos à enzima catalase presente no bioeletrodo. Pela assimetria e valores de ΔE_p e razão de correntes calculados pode-se considerar que os processos redox podem ser irreversíveis ou quase-reversíveis.

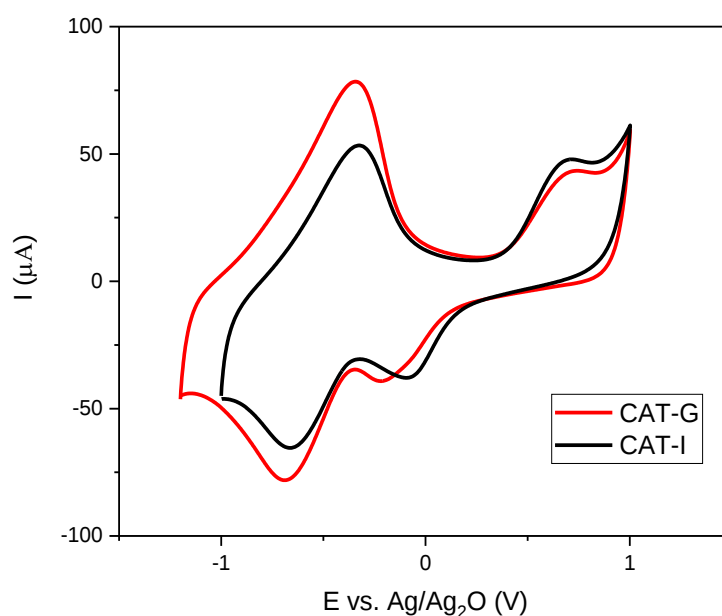


Figura 66. Voltametria cíclica comparativa dos bioeletrodos CAT-G e CAT-I. Tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , $v=50$ mV s^{-1} .

A estabilidade foi avaliada com a aplicação de varreduras sucessivas no bioeletrodo e os voltamogramas foram registrados até 50 ciclos. Os resultados são apresentados na Figura

67. Como observado, o bioeletrodo pode ser considerado estável pois em geral mantém estáveis os potenciais e corrente dos picos.

Com o estudo de velocidades de varredura (Figura 68, **A**) observa-se que todos os picos aumentam de corrente e seu ΔE_p para cada par de picos varia entre 100 a 200 mV. Como no bioeletrodo anterior, isto é indicativo de processos irreversíveis onde a transferência de carga é lenta (Bard e Faulkner, 2001). Com a análise de corrente em função da velocidade de varredura, encontrou-se que o passo limitante nos processos redox é a adsorção na superfície do bioeletrodo; ou seja, é um processo confinado à superfície (Figura 68, **B e C**).

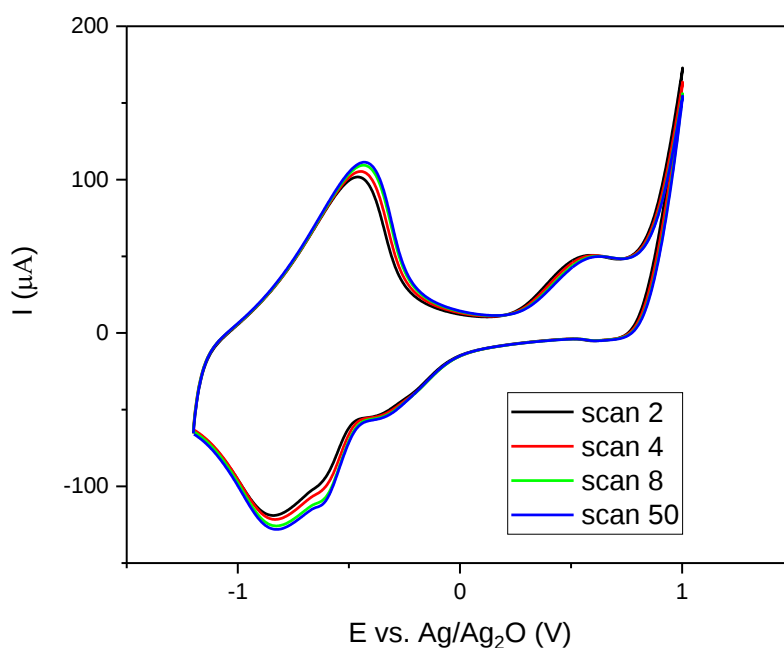


Figura 67. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo CAT-G até 50 scans. Tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

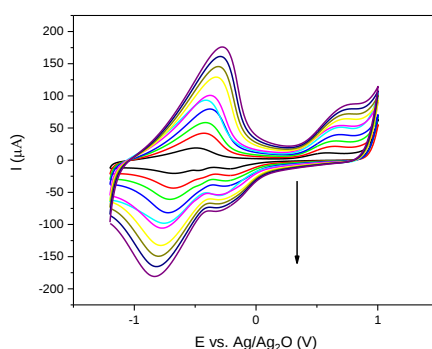
A velocidades baixas, como 10 e 20 mV s^{-1} , foi observado um pico intermediário que não foi percebido a velocidades superiores. Na Figura 69, encontra-se este pico em -0,48 V o qual aparece no sentido catódico.

Este pico foi investigado na presença de peróxido de hidrogênio em baixas velocidades de varredura, mas nenhuma resposta foi obtida por voltametria cíclica. Igualmente, a atividade frente ao etanol foi testada, mas não mostrou nenhuma resposta. Portanto, para

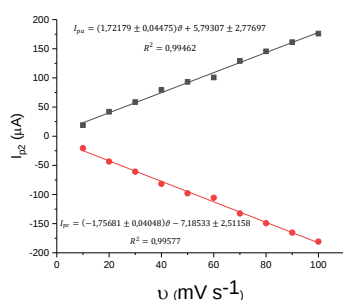
determinar a resposta do bioeletrodo frente ao peróxido de hidrogênio foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada; os resultados são apresentados nas Figura 70 e Figura 71.

Inicialmente, a variação dos parâmetros voltamétricos, frequência, amplitude e incrementos de varredura (ΔE) foi estudada frente à resposta de corrente. Foi escolhido o potencial de -0,33 V; pois, em medidas anteriores na presença de peróxido de hidrogênio, foi neste potencial que o bioeletrodo apresentou resposta eletrocatalítica.

A



B



C

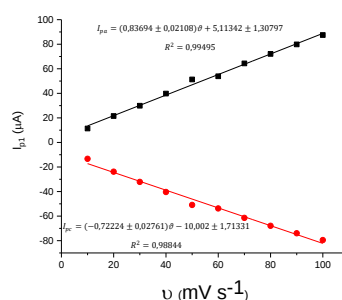


Figura 68. **A)** Estudo das velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s^{-1}) para o bioeletrodo CAT-G no meio de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0. Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu\text{A}$) e catódico ($I_{pc}/\mu\text{A}$) para: **B)** o par de picos redox II e **C)** o par de picos redox I, vs. velocidade de varredura v (mV s^{-1}).

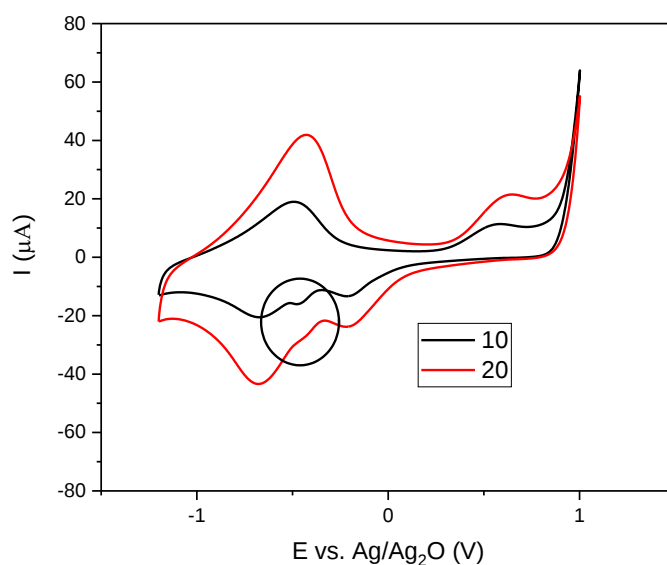


Figura 69. Voltametrias cíclicas para o bioeletrodo CAT-G a 10 mV s^{-1} (curva preta) e a 20 mV s^{-1} (curva vermelha) em tampão fosfato 50 mmol L^{-1} .

Na Figura 70 **A**, observam-se os voltamogramas obtidos a partir da variação de frequência. Assim, como no bioeletrodo anterior, o aumento da frequência gera um aumento na corrente, porém os picos se tornam menos definidos. Na Figura 70 **B** foi avaliada a corrente em função da frequência e encontrou-se que até 60 Hz há um significativo aumento da corrente; após esta frequência a corrente não apresenta grande variação, estabilizando-se em torno de $0,29 \text{ mA}$.

A Figura 70 **C** mostra a resposta por voltametria de onda quadrada, do bioeletrodo CAT-G, no estudo de variação de amplitude. A Figura 70 **D** apresenta a variação da corrente com o aumento da amplitude para o mesmo bioeletrodo. Observa-se que a corrente e a amplitude se correlacionam linearmente, do mesmo modo em que acontece com o bioeletrodo CAT-I.

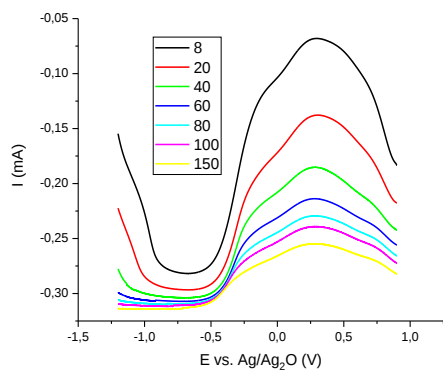
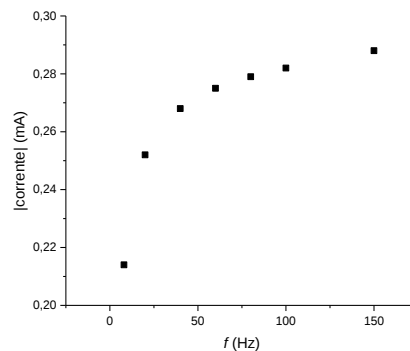
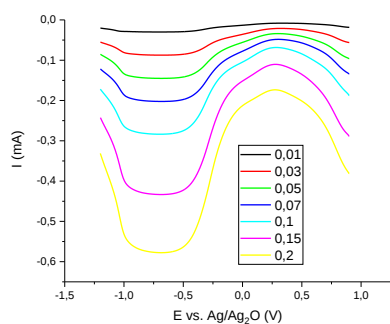
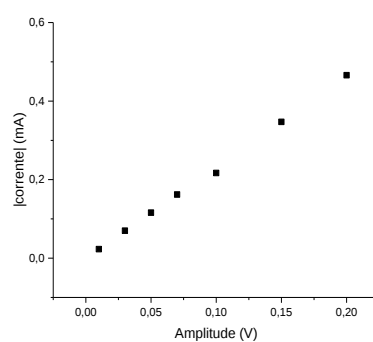
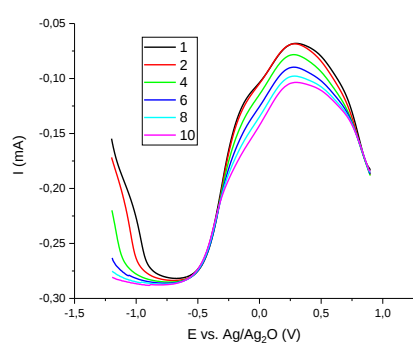
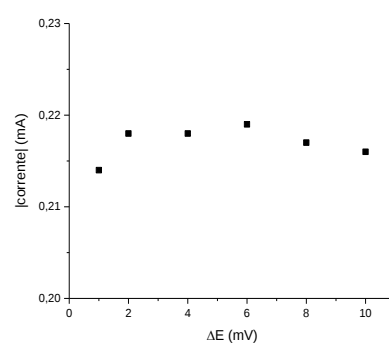
A**B****C****D****E****F**

Figura 70. Resposta do bioeletrodo CAT-G por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: **A – B**) frequência (Hz), $A = 0,1 \text{ V}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$, **C – D**) amplitude (V), $f = 8 \text{ Hz}$ e $\Delta E = 2 \text{ mV}$, e **E – F**) incrementos de potencial ΔE (mV), $f = 8 \text{ Hz}$ e $A = 0,1 \text{ V}$. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de $-0,33 \text{ V}$.

A Figura 70 **E** apresenta o efeito da variação do incremento de potencial ΔE nas voltametrias de onda quadrada. A Figura 70 **F** mostra a variação da corrente com a variação do incremento de potencial ΔE . Interessantemente, a corrente no potencial estudado (-0,33 V) praticamente não varia com o incremento de potencial; diferente do bioeletrodo CAT-I, onde a variação da corrente mostrou-se sensível à variação do incremento de potencial.

Com o fim de comparar os resultados de voltametria de onda quadrada para os quatro materiais fez-se necessário utilizar as mesmas condições de medida em todos os experimentos cinéticos. Apesar disto, achou-se importante realizar todas as medidas de variação dos parâmetros voltamétricos para ter o conhecimento do comportamento de cada bioeletrodo. Assim, as condições finais para medidas frente ao peróxido de hidrogênio por voltametria de onda quadrada, são: frequência = 8 Hz, amplitude = 0,1 mV e $\Delta E = 2$ mV.

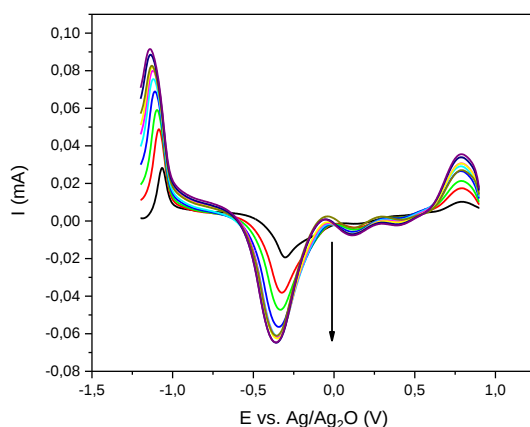
No estudo cinético realizado para o bioeletrodo CAT-G na presença de peróxido de hidrogênio foram adicionadas alíquotas de peróxido e foram realizadas as medidas de voltametria da mesma forma como no bioeletrodo anterior. Na Figura 71 **A**, observa-se a variação da corrente no potencial de aproximadamente -0,33 V, o qual aumenta com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio na solução, até atingir um valor constante indicativo da enzima ter atingido a saturação. Na Figura 71 **B** o comportamento da corrente em função da concentração pode ser observado.

Como observado, a corrente aumenta praticamente de forma linear com a concentração, até aproximadamente $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$, a partir do qual adições maiores de peróxido de hidrogênio não afetam mais a corrente produzida. Disse-se então que a enzima no bioeletrodo chegou à saturação e assim atingiu sua corrente máxima. Os valores de corrente máxima e a constante de Michaelis-Menten podem ser obtidos a partir do comportamento dos recíprocos de corrente e concentração de peróxido de hidrogênio, de acordo com a linearização de Lineweaver-Burk (Figura 71 **C**).

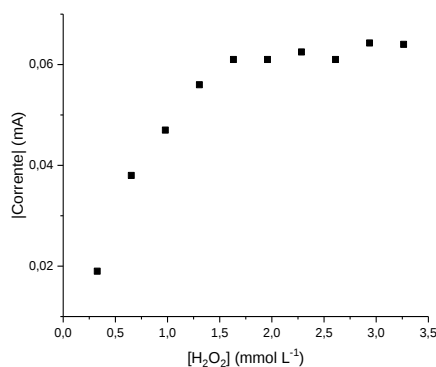
Pelo modelo linearizado de Michaelis-Menten os valores obtidos para I_{max} e K_M foram 0,1162 mA e 1,60 mM respectivamente. Estes valores, comparados com os obtidos para o bioeletrodo CAT-I (0,183 mA e 4,53 mM, para I_{max} e K_M , respectivamente), indicam que o substrato tem uma maior afinidade pelo material CAT-G (lembrando que menor K_M está associado com maior afinidade entre o substrato e a enzima). Assim, isto poderia

indicar que a presença de grafite conferiu à enzima imobilizada mais biodisponibilidade para a catálise. A corrente máxima para os dois bioeletrodos resultou em valores relativamente próximos; fato que pode indicar que os sítios ativos da enzima são aproximadamente iguais para os dois tipos de imobilizações; portanto o número de turnover deveria ser semelhante para os dois materiais. Na Tabela 7 serão comparados estes parâmetros para os quatro materiais imobilizados, na página 131.

A



B



C

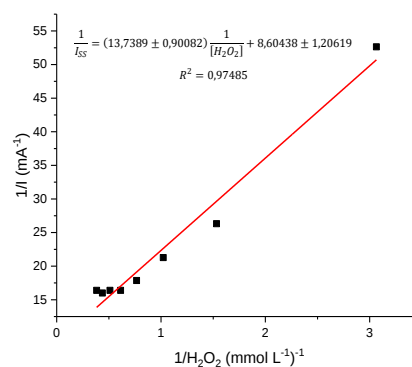


Figura 71. Estudo cinético do bioeletrodo CAT-G em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; a partir de medidas de voltametria de onda quadrada, $f = 8$ Hz, $A = 100$ mV, $\Delta E = 2$ mV. $v = 15,6$ mV s⁻¹: **A**) na adição sucessiva de aliquotas de 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio, **B**) Variação da corrente de pico $E_{pc} = -0,33$ V, em função da concentração de peróxido de hidrogênio e **C**) Linearização da curva **B** para a determinação dos parâmetros K_M e I_{max} .

O próximo bioeletrodo estudado é o CAT-[PEHA][Ac], o qual foi avaliado seguindo a mesma sequência de análise anterior. Inicialmente foram realizadas as medidas de voltametria cíclica para caracterizar o bioeletrodo e posteriormente foi avaliada sua resposta frente ao peróxido de hidrogênio por voltametria de onda quadrada. Os resultados são apresentados a seguir.

Na Figura 72 observa-se o voltamograma do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac], comparado com os demais bioeletrodos previamente analisados. No CAT-[PEHA][Ac], observa-se a presença de dois pares de picos redox, um a potenciais mais negativos (par II) $E_{pa2} = -0,378$ V, $E_{pc2} = -0,879$ V; outro a potenciais mais positivos (par I) $E_{pa1} = 0,727$ V e $E_{pc1} = -0,424$ V.

Comparando o bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] com os bioeletrodos CAT-I e CAT-G, observa-se que a corrente total é maior para o eletrodo na presença de líquido iônico, espera-se assim que sua resposta eletroanalítica seja, portanto, maior. Adicionalmente, a presença do [PEHA][Ac] desloca os picos catódicos a potenciais mais negativos. Assim, como nos dois bioeletrodos previamente estudados, o formato dos picos e os valores de ΔE_p e razão de correntes indicam que os processos que ocorrem no bioeletrodo podem ser classificados como irreversíveis ou quase-reversíveis.

Na Figura 73, apresenta-se o estudo de estabilidade do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac], o qual foi realizado por medidas sucessivas de voltametria cíclica até 120 varreduras. Observa-se que o eletrodo é estável quanto a seu formato bem como a seus potenciais de pico. Quanto à corrente observa-se um aumento significativo, desde a primeira até a última varredura.

A Figura 74 A, apresenta o estudo de velocidades de varredura. A diferença de potencial entre os picos com o aumento da velocidade de varredura, resultou entre 89 e 250 mV. Estes valores também indicam processos irreversíveis ou quase-reversíveis e sugerem transferência de carga lenta (Bard e Faulkner, 2001).

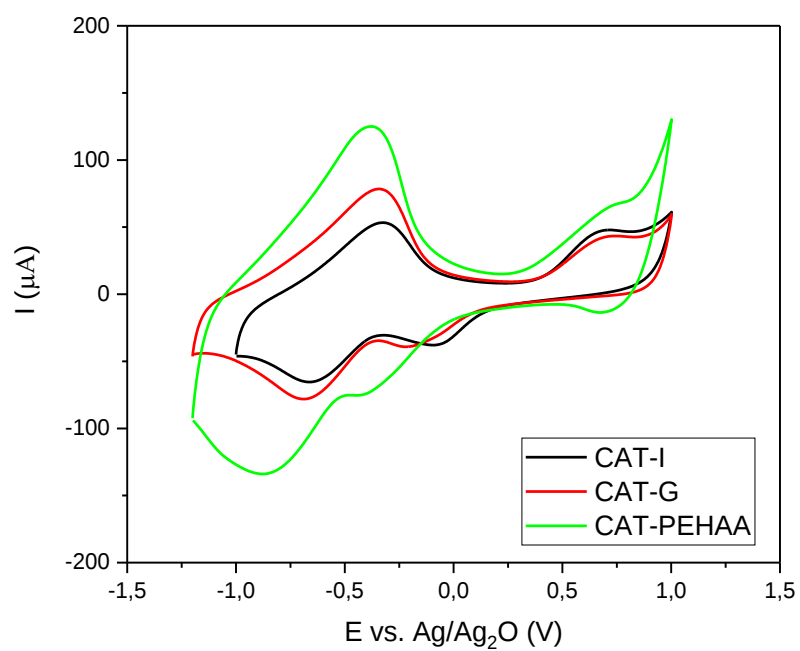


Figura 72. Voltametria cíclica comparativa dos bioeletrodos CAT-[PEHA][Ac], CAT-G e CAT-I. Tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, $v=50$ mV s⁻¹.

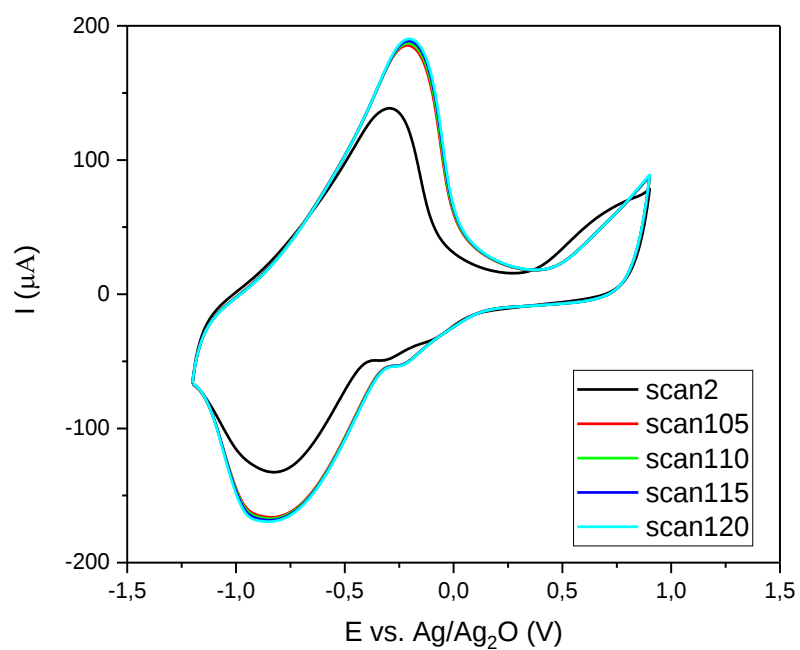
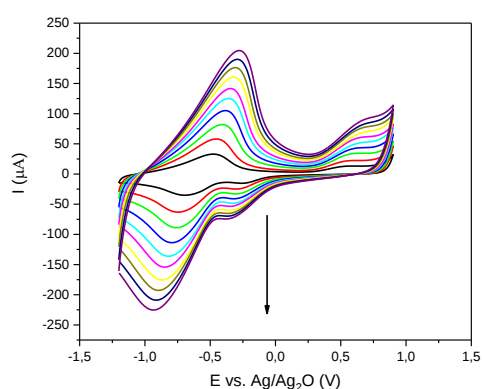


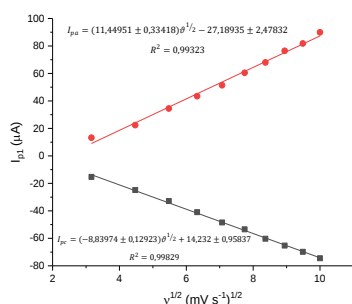
Figura 73. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] até 120 varreduras. Tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, $v = 50$ mV s⁻¹.

A partir da avaliação da corrente dos picos em função da velocidade de varredura determinou-se que o processo é controlado por difusão tal como observado nas Figura 74 **B** e **C** para os pares de picos I e II respectivamente. Já os bioeletrodos CAT-I e CAT-G mostraram que o processo limitante está confinado à superfície. O resultado de CAT-[PEHA][Ac] sugere que a reação neste eletrodo ocorre muito mais rapidamente que nos dois eletrodos anteriores. Ou seja, pode se dizer que o líquido iônico auxiliou no processo de transferência eletrônica. Esta observação é condizente com o resultado obtido no bioeletrodo CV/([PEHA][Ac]/CAT)₅ construído no capítulo anterior, onde a presença do líquido iônico foi essencial para a transferência de elétrons no bioeletrodo construído.

A



B



C

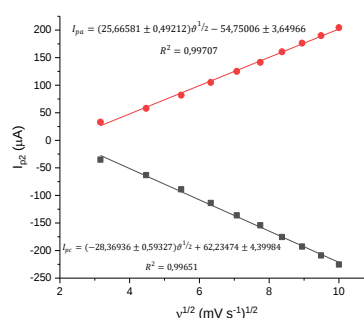


Figura 74. **A)** Estudo das velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s^{-1}) para o bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] no meio de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0. Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu\text{A}$) e catódico ($I_{pc}/\mu\text{A}$) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura $v^{1/2}$ (mV s^{-1})^{1/2} para: **B)** o par de picos redox I e **C)** o par de picos redox II.

Posteriormente, foram avaliados a partir da corrente resultante, os efeitos da mudança dos parâmetros voltamétricos nas medidas de voltametria de onda quadrada para o bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac]. Na Figura 75 **A**, observa-se o efeito na corrente com a variação da frequência. Desde 8 até 40 Hz os picos apreciam-se mais definidos do que em frequências maiores. Na Figura 75 **B** se apresenta a resposta da corrente no potencial de -0,40 V em função da frequência variada. Esta Figura apresenta um formato de curva de saturação; aproximadamente linear até 60 Hz e saturando a uma corrente de aproximadamente 240 μ A, para frequências mais elevadas. Até 60 Hz a variação da frequência tem um efeito significativo na corrente resultante, após esta frequência a corrente não varia de forma relevante.

A Figura 75 **C** apresenta a resposta do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] com a variação de amplitude (0,02 a 0,2 mV) estudado por voltametria de onda quadrada. A corrente mostra significativa variação com a amplitude a potencial de -0,4 V. Na Figura 75 **D** observa-se o efeito da variação da amplitude na corrente resultante, com uma correlação linear.

Na Figura 75 **E** apresenta-se o efeito da variação do valor de ΔE ; a corrente foi avaliada no potencial de -0,4 V onde o bioeletrodo apresentou resposta eletrocatalítica ao peróxido de hidrogênio por voltametria de onda quadrada. Interessantemente, este potencial é muito próximo do potencial obtido para o bioeletrodo CV/([PEHA][Ac]/CAT)₅. Na Figura 75 **F** observa-se que neste potencial o efeito da variação do ΔE é insignificante sobre a corrente resultante, portanto o sistema é praticamente independente do incremento de potencial na região de -0,4 V. Este resultado está de acordo com a observação que a etapa limitante para este bioeletrodo é a difusão no meio.

Assim, como explicado para o bioeletrodo CAT-G, para este bioeletrodo também foram fixados os valores de frequência, amplitude e incrementos de potencial em 8 Hz, 0,1 V e 2 mV, respectivamente, para o estudo cinético do bioeletrodo. Isto, com o objetivo de comparar os resultados entre os quatro eletrodos estudados.

Para a medida dos parâmetros cinéticos foram plotadas as curvas de voltametria de onda quadrada com a resposta do bioeletrodo frente ao peróxido de hidrogênio. O resultado é mostrado na Figura 76 **A**; após sucessivas adições do substrato no meio a resposta chegou a um patamar, momento no qual considera-se que o bioeletrodo chegou à saturação.

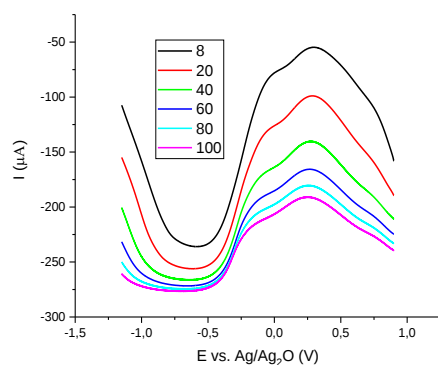
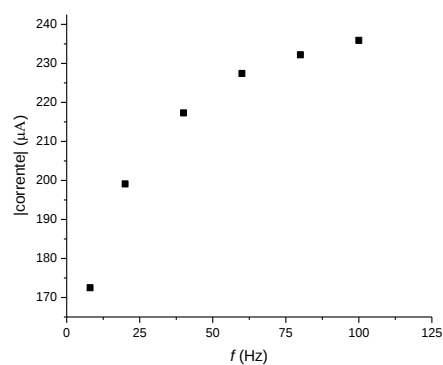
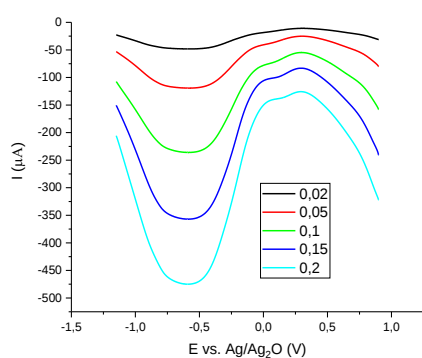
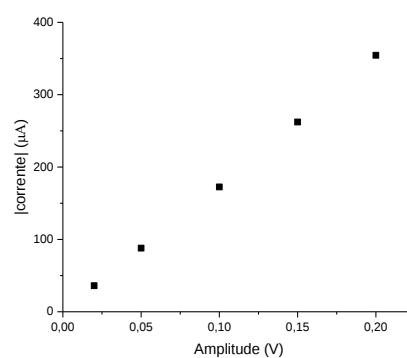
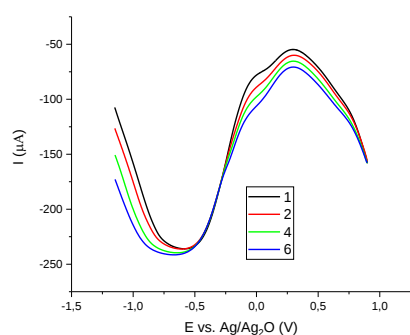
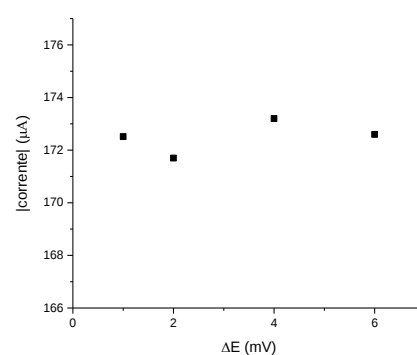
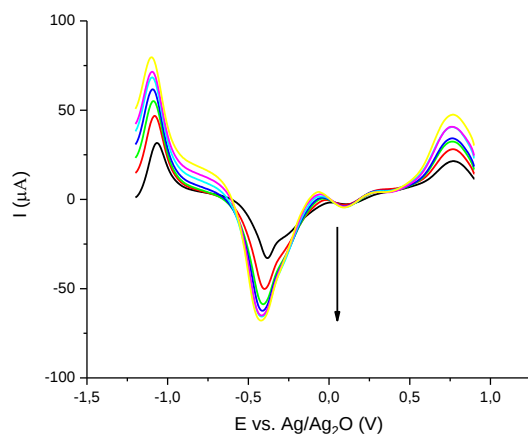
A**B****C****D****E****F**

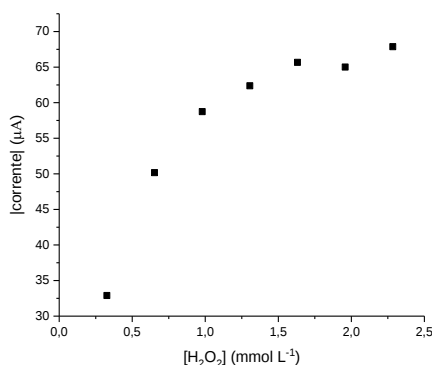
Figura 75. Resposta do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: **A – B**) frequência (8 a 100 Hz), A = 0,1 V, ΔE = 2 mV, **C – D**) amplitude (0,02 a 0,2 mV), f = 8 Hz e ΔE = 2 mV, e **E – F**) incrementos de potencial ΔE (1 a 6 mV), f = 8 Hz e A = 0,1 V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de -0,40 V.

Na Figura 76 **B** apresentam-se os resultados da relação entre a corrente e a concentração de peróxido de hidrogênio. Esta curva apresenta um perfil semelhante ao descrito pela cinética de Michaelis Menten, portanto com a linearização desta curva apresentada na Figura 76 **C**, podem ser obtidos os valores de $I_{\max}$ e K_M .

A



B



C

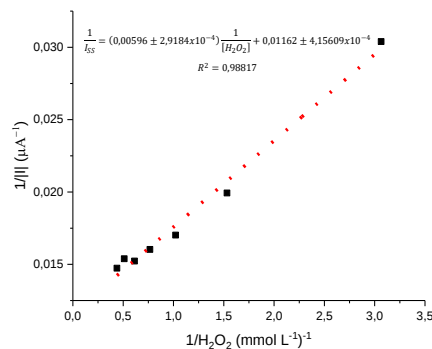


Figura 76. Estudo cinético do bioeletrodo CAT- [PEHA][Ac] em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; a partir de medidas de voltametria de onda quadrada, $f = 8$ Hz, $A = 100$ mV, $\Delta E = 2$ mV. $v = 15,6$ mV s⁻¹: **A**) na adição sucessiva de aliquotas de 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio, **B**) Variação da corrente de pico $E_{pc} = -0,40$ V, em função da concentração de peróxido de hidrogênio e **C**) Linearização da curva **B** para a determinação dos parâmetros K_M e $I_{\max}$.

A partir desta curva foram obtidos os valores de 0,0861 mA para $I_{\max}$ e de 0,5129 para o K_M . Comparando o valor de corrente máxima, observa-se que este bioeletrodo apresentou

um valor muito menor a respeito dos bioeletrodos CAT-I e CAT-G. Isto pode indicar ou que o número de turnover ou o número de sítios ativos disponíveis no material imobilizado diminuíram; também poderiam ter diminuído os dois valores.

O valor de K_M apresentou-se muito menor com relação aos outros bioeletrodos; portanto considera-se que este bioeletrodo tem muito mais afinidade pelo substrato. Igualmente, um menor valor de I_{max} indica que rapidamente o bioeletrodo atingiu sua saturação; fatos consistentes entre si. Na Tabela 7 serão apresentados os resultados de todos os bioeletrodos estudados neste trabalho, na página 131.

Finalmente, foi avaliado o bioeletrodo CAT-mA, onde foi utilizado o líquido iônico [m-2HEA][Ac] no processo de imobilização. Na Figura 77 apresenta-se o comparativo da resposta por voltametria cíclica em tampão fosfato, dos quatro bioeletrodos estudados. Observa-se que este bioeletrodo tem uma resposta semelhante ao CAT-[PEHA][Ac] principalmente no formato dos picos redox e corrente resultante. Assim como nos outros bioeletrodos, observam-se dois pares de picos redox, um em regiões mais positivas (par I) e outro em regiões mais negativas (par II). O par I apresenta os seguintes picos: $E_{pa} = 0,65$ V e $E_{pc} = -0,13$ V; o par II tem os seguintes picos: $E_{pa} = -0,337$ V e $E_{pc} = -0,811$ V.

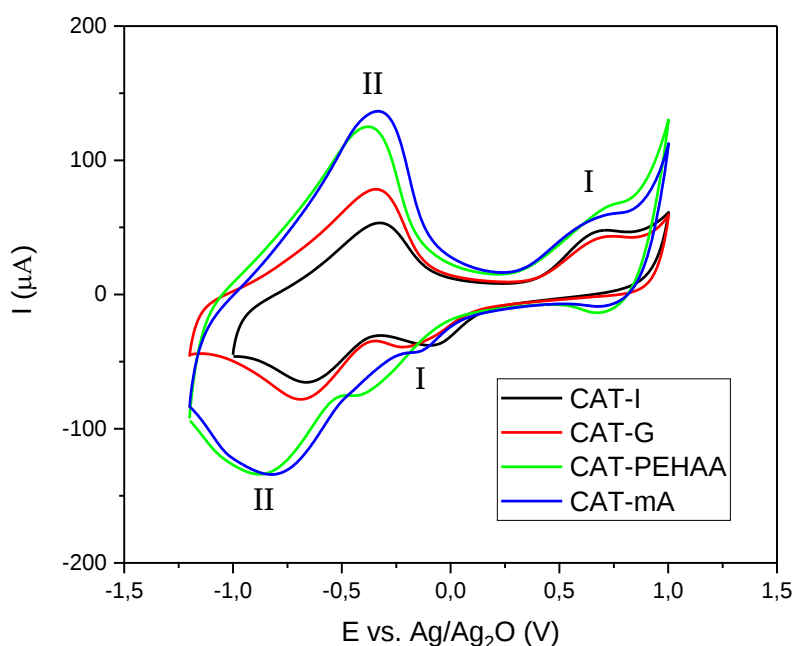


Figura 77. Voltametria cíclica comparativa dos bioeletrodos CAT-mA, CAT-[PEHA][Ac], CAT-G e CAT-I. Tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, $v=50$ mV s⁻¹.

Na Figura 78 avalia-se a estabilidade da resposta do bioeletrodo; observa-se que em geral o formato dos picos, corrente e potenciais se mantêm praticamente inalterados; comportamento este observado também para os outros bioeletrodos estudados.

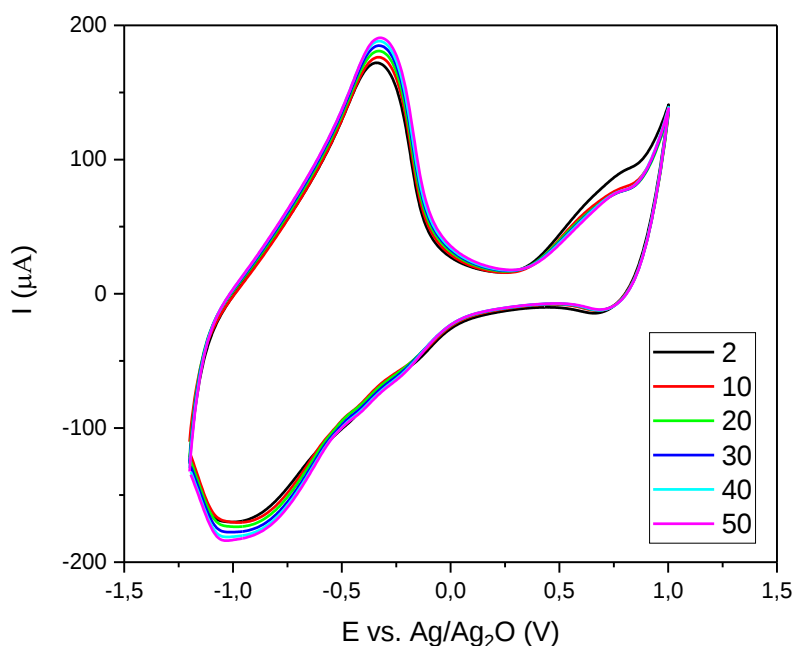


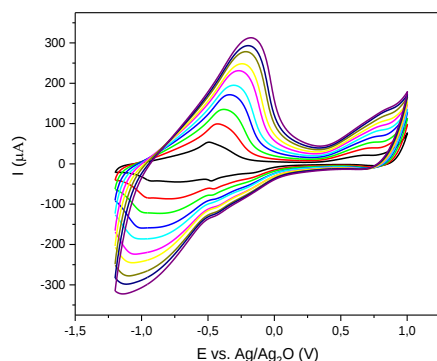
Figura 78. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo CAT-mA até 50 varreduras. Tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O estudo de velocidades de varredura mostrou que o par de picos 1 perdeu totalmente sua resposta, sendo impossível medir um máximo de corrente para o mesmo. A partir de 30 mV s^{-1} os processos correspondentes a este par de picos não são observados. Por outro lado, o par de picos 2 aumenta com o aumento da velocidade de varredura (Figura 79 A). Para este par de picos, a corrente é linearmente correlacionada com a raiz quadrada da velocidade de varredura; fortemente sugerindo que o processo eletroquímico que ocorre neste bioeletrodo é controlado por difusão. Este comportamento é observado na Figura 79 B.

Assim como o CAT-[PEHA][Ac], o CAT-mA apresentou a etapa de difusão como limitante do processo eletroquímico. Isto indica que o processo de adsorção do substrato na enzima ocorre de forma mais rápida, sugerindo que os dois líquidos iônicos próticos

auxiliam no processo de transferência eletrônica entre a enzima e o substrato; assim o processo redox ocorre mais rapidamente nestes eletrodos.

A



B

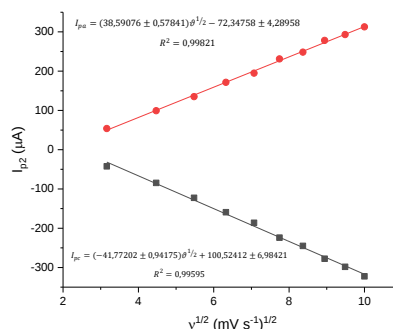


Figura 79. **A)** Estudo das velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV s^{-1}) para o eletrodo CAT-mA no meio de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , pH 7,0. **B)** Correntes de picos anódico ($I_{pa}/\mu\text{A}$) e catódico ($I_{pc}/\mu\text{A}$) para o par de picos redox 2 vs. velocidade de varredura $v^{1/2}$ (mV s^{-1}) $^{1/2}$.

A Figura 80 **A** apresenta a resposta da corrente com a variação da frequência (8 a 150 Hz) para o bioeletrodo CAT-mA; no potencial de $-0,40$ V, observa-se uma variação significativa da corrente quando a frequência é alterada de 8 para 20 Hz; a partir de 30 Hz, a corrente mantém-se praticamente inalterada. A Figura 80 **B** mostra o gráfico de corrente versus frequência; o formato da curva é muito semelhante ao obtido para o bioeletrodo CAT-G (Figura 70 **B**), mas com parâmetros muito diferentes: significativa variação até 30 Hz e estabilização a 0,287 mA.

Nas Figura 80 **C** e **D** apresenta-se o comportamento do bioeletrodo CAT-mA para a variação de amplitude por voltametria de onda quadrada. Observa-se que a corrente aumenta com a amplitude, na faixa de 0,02 até 0,3 mV no potencial de $-0,4$ V determinado previamente na presença de peróxido de hidrogênio.

As Figura 80 **E** e **F** apresentam a corrente em função do incremento do potencial para o bioeletrodo CAT-mA. A variação de potencial não afetou a resposta do bioeletrodo no potencial estudado ($-0,4$ V), confirmado pelo gráfico de variação do potencial (ΔE) versus corrente (Figura 80 **F**).

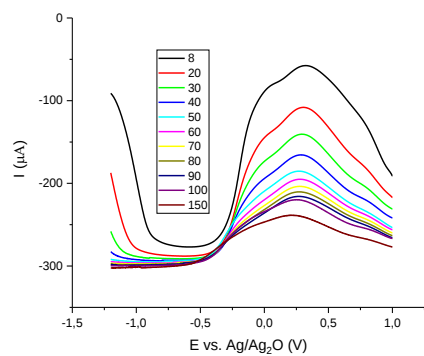
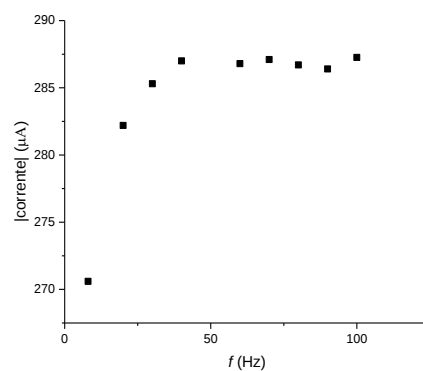
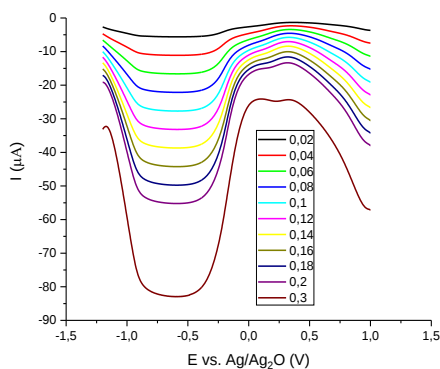
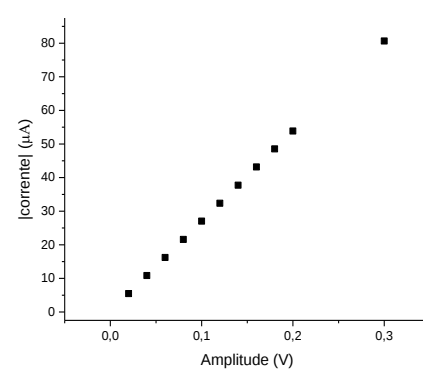
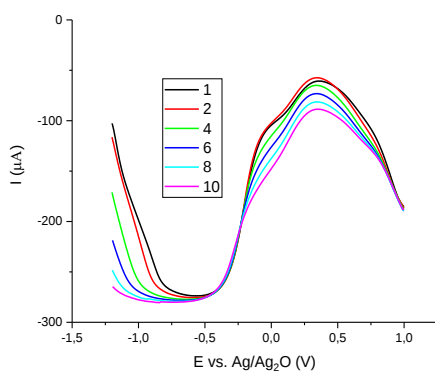
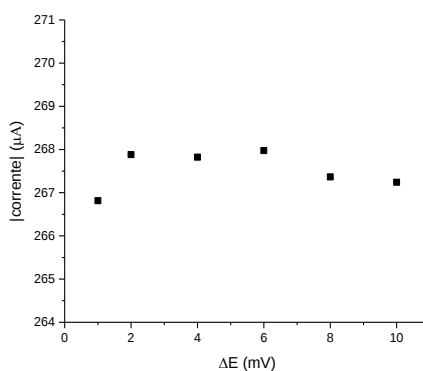
A**B****C****D****E****F**

Figura 80. Resposta do bioeletrodo CAT-mA por voltametria de onda quadrada no meio de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0; no estudo de variação dos parâmetros: **A – B**) frequência (8 a 150 Hz), A = 0,1 V, ΔE = 2 mV, **C – D**) amplitude (0,02 a 0,3 mV), f = 8 Hz e ΔE = 2 mV, e **E – F**) incrementos de potencial ΔE (1 a 10 mV), f = 8 Hz e A = 0,1 V. Corrente medida para cada parâmetro no potencial de - 0,40 V.

As medidas de atividade do bioeletrodo CAT-mA, frente ao peróxido de hidrogênio, foram realizadas de forma diferente ao método utilizado para os outros bioeletrodos. Neste caso não foram realizadas adições sucessivas de peróxido; foi colocada uma alíquota e realizadas as medidas de voltametria de onda quadrada repetidas vezes até atingir uma corrente de estado estacionário. Este procedimento foi repetido para quatro concentrações de peróxido de hidrogênio: 0,33, 0,46, 0,59 e 0,72 mmol L⁻¹ em diferentes soluções. Após cada medida finalizada, o bioeletrodo foi cuidadosamente limpo até obter novamente a resposta do branco no tampão fosfato.

Na Figura 81 **A** observasse o aumento da corrente devido ao aumento da concentração do peróxido de hidrogênio. Esta medida foi realizada por voltametria de onda quadrada.

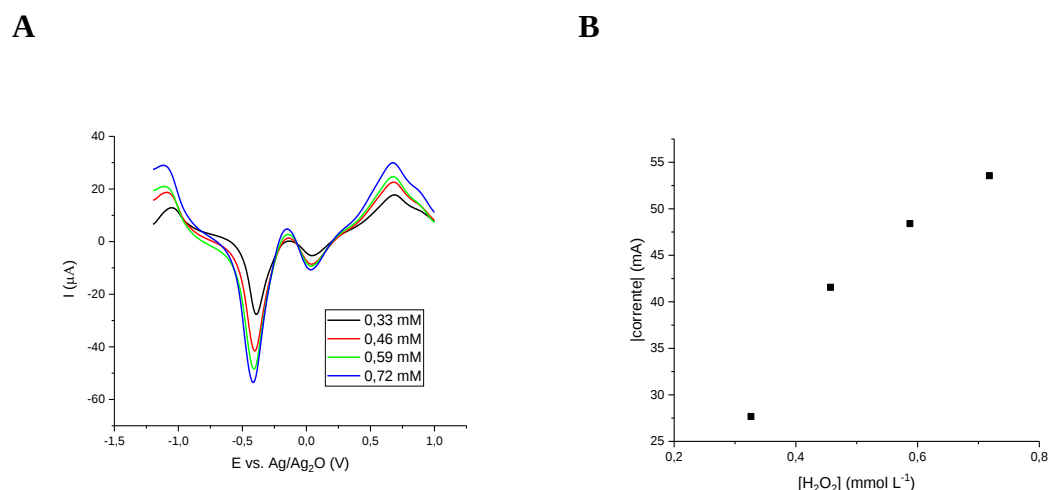


Figura 81. Resposta voltamétrica para o bioeletrodo CAT-mA: **A)** na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Método: voltametria de onda quadrada em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. A = 0,1 V, $\Delta E = 1$ mV e $f = 8$ Hz. **B)** Resposta da corrente em valor absoluto versus concentração de peróxido de hidrogênio.

Devido a problemas no laboratório não foi possível realizar a mesma medida de adições sucessivas, realizada para os outros três bioeletrodos. Assim, não foi possível determinar os valores de $I_{\max}$ e K_M ; portanto este bioeletrodo não pode ser comparado com os outros a partir destes parâmetros. Porém, foi possível observar que a relação entre a corrente e a concentração apresenta uma tendência assintótica nessa faixa de concentrações, como ilustrado na Figura 81 **B**; semelhante ao comportamento do modelo de Michaelis-Menten, mas o limite de concentração não permitiu atingir a corrente de *plateau*.

Assim, os quatro eletrodos foram avaliados e caracterizados eletroquimicamente e com o propósito de serem comparados seus resultados serão apresentados a seguir na Tabela 7.

Tabela 7. Principais parâmetros eletroquímicos e cinéticos obtidos para os quatro bioeletrodos construídos pelo método CLEA.

		CAT-I	CAT-G	CAT- [PEHA][Ac]	CAT-mA
Característica do bioeletrodo		<i>In natura</i>	+ grafite	+ [PEHA][Ac]	+ [m-2HEA][Ac]
E_{p1}	E_a	0,736 V	0,743 V	0,727 V	0,65 V
	E_c	-0,077 V	-0,218 V	-0,424 V	-0,128 V
E_{p2}	E_a	-0,316 V	-0,343 V	-0,378 V	-0,337 V
	E_c	-0,641 V	-0,689 V	-0,879 V	-0,811 V
Janela eletroquímica		-1 a 1 V	-1,2 a 1 V	-1,2 a 1 V	-1,2 a 1 V
Estabilidade		Boa	Boa	Boa	Boa
Etapas limitante		Confinado à superfície	Confinado à superfície	Difusão	Difusão
E_{pH2O2}		-0,17 V	-0,33 V	-0,40 V	-0,40 V
K_M		4,53 mM	1,60 mM	0,5129 mM	-----
I_{max}		0,183 mA	0,1162 mA	0,0861 mA	-----

Nesta tabela é possível observar em forma global o comportamento de cada bioeletrodo. Constata-se inicialmente que os potenciais dos picos anódicos (**E_a**) para todos os sistemas se mantêm praticamente inalterados. Isto indica que possivelmente estes picos são próprios da enzima ou do agente de entrecruzamento, pois somente essas espécies estão presentes em todos os bioeletrodos. Entretanto, os picos catódicos (**E_c**) são afetados, tanto

no par 1 como no 2, quando estudado por voltametria cíclica; sugerindo assim que estes sinais eletroquímicos são característicos de cada bioeletrodo.

O potencial do processo eletrocatalítico ($E_{pH_2O_2}$), obtido a partir da voltametria de onda quadrada, foi também consideravelmente afetado pelo material adicionado no processo de imobilização. O potencial menos negativo foi observado para a catalase pura imobilizada. O potencial ficou significativamente mais negativo com a adição de grafite, seguindo essa tendência quando foi adicionado líquido iônico.

À exceção do bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac], observa-se que o potencial de pico obtido pela voltametria de onda quadrada encontra-se entre os dois picos catódicos observados pela voltametria cíclica. Como relatado para alguns bioeletrodos, observou-se a presença de um pico catódico intermediário a baixas velocidades de varredura em voltametria cíclica. Este pico poderia ser o mesmo pico observado na voltametria de onda quadrada ($E_{pH_2O_2}$).

Os quatro bioeletrodos apresentaram boa estabilidade; a resposta eletroquímica permaneceu praticamente inalterada quando testados para várias varreduras, em voltametria cíclica.

Quanto a etapa limitante da reação, observou-se que para CAT-I e CAT-G o que limita a reação é a adsorção do substrato na superfície. Para os bioeletrodos com líquido iônico prótico encontrou-se que a etapa limitante foi a difusão do substrato no meio reacional. Portanto, provavelmente pode-se dizer que o líquido iônico conferiu à catalase um microambiente propício para o aumento da velocidade de transferência de carga.

Este comportamento pode estar relacionado com os resultados obtidos para o CAT-[PEHA][Ac] referentes aos parâmetros cinéticos K_M e I_{max} . Com a adição deste líquido iônico, a afinidade do substrato com a enzima aumentou e a velocidade de saturação da enzima diminuiu. Estes fatos sugerem que a adição deste líquido melhora significativamente a resposta eletrocatalítica de um bioeletrodo a base de catalase.

Para o bioeletrodo CAT-mA observou-se que o mesmo tem uma resposta eletrocatalítica típica frente ao peróxido de hidrogênio, o qual apresenta um comportamento assintótico na faixa de concentrações estudada.

Finalmente, também é possível comparar estes parâmetros cinéticos com alguns trabalhos encontrados na literatura, apresentados na Tabela 8.

Os resultados obtidos neste trabalho estão sombreados em cinza pálido. Entre os trabalhos de outros autores, os que se encontram sombreados em cinza utilizaram líquidos iônicos apróticos para a construção dos bioeletrodos baseados em catalase. O trabalho de Wang *et al.*, (2005) utilizou uma técnica de aprisionamento da enzima com agarose e líquido iônico aprótico; este trabalho apresentou o valor mais alto de K_M . Isto faz lembrar que a biodisponibilidade da enzima não depende somente das moléculas coadjuvantes a ela, mas também do tipo de imobilização. Assim, o aprisionamento não é a técnica mais adequada quando se deseja aumentar a transferência de elétrons em um bioeletrodo.

No trabalho de Saadati *et al.*, (2012) foi construído um bioeletrodo a partir das técnicas combinadas LBL e ECD de catalase com um líquido aprótico e nanopartículas de nitrato de titânio. O valor deles obtido da K_M é comparável com o nosso valor para o CAT-G. Adicionalmente, nosso resultado é muito melhor (na ordem de 0,5 vezes menor) com o uso do líquido iônico prótico [PEHA][Ac] a partir da metodologia CLEA. No trabalho de Gholivand e Khodadadian, (2014) usaram líquido iônico aprótico e grafeno e depositaram estes junto com a catalase por gotejamento na superfície de um eletrodo de carbono vítreo; os mesmos obtiveram um valor 4,5 vezes maior ao obtido no presente trabalho com o CAT-[PEHA][Ac]. Em geral todos os K_M para os bioeletrodos utilizando líquidos iônicos apróticos apresentaram valores maiores (menor afinidade ao substrato) do que os obtidos para os bioeletrodos preparados neste trabalho.

Estes comparativos induzem fortemente a considerar que tanto a técnica de imobilização utilizada assim como o uso de líquidos iônicos próticos favorecem consideravelmente na melhora do processo de transferência eletrônica na catalase presente nos bioeletrodos construídos.

Nos trabalhos dos outros autores foram construídos bioeletrodos a base de catalase na ausência de quaisquer líquidos iônicos; mas com o uso de nanotubos de multiparede, exceto pelo trabalho de Dimcheva. Em geral nestes trabalhos, os valores de K_M foram menores (0,2 mM) e o mais próximo a isto foi o bioeletrodo CAT-[PEHA][Ac] com 0,5 mM. Isto reforça o efeito do líquido iônico prótico no microambiente da catalase, que poderia levar a substituir materiais nanocarbonáceos, chegando até a diminuir os custos finais dos bioeletrodos. A técnica de imobilização utilizada na maioria destes trabalhos

foi por adsorção física na superfície metálica. Este é um procedimento mais simples na sua realização quando comparado com a imobilização por CLEA; porém perde características como concentração do catalisador e flexibilidade para ser utilizada em diferentes configurações físicas de eletrodo. Assim, a imobilização por CLEA se faz muito interessante para a construção de bioeletrodos com alta biodisponibilidade, preservando a estrutura da enzima e a presença dos líquidos iônicos próticos alavanca a transferência eletrônica direta no processo redox no bioeletrodo.

Tabela 8. Comparação deste trabalho com bioeletrodos de outros autores.

Autor	I_{max}	K_M (mM)
CAT-I	0,183 Ma	4,53 mM
CAT-G	0,116 mA	1,60 mM
CAT-[PEHA][Ac]	0,0861 mA	0,513 mM
Saadati <i>et al.</i> , (2012)	-----	1,1 mM
Huang <i>et al.</i> , (2011)	-----	2,81 mM
Dimcheva e Horozova, (2013)	7,78 µA	68 mM
Gholivand e Khodadadian, (2014)	0,360 mA	2,32 mM
Periasamy, Ho e Chen, (2011)	68,49 (NRU*)	0,21 mM
Salimi, Noorbakhsh e Ghademmarz, (2005)	-----	1,7 mM
Vilian, Chen e Lou, (2014)	-----	0,224 mM
Wang <i>et al.</i> , (2005)	0,13 µA	513 mM

*NRU: não reporta unidades.

CONCLUSÕES

- O líquido iônico [PEHA][Ac] e os da série [m-2HEA⁺] foram sintetizados e suas estruturas confirmadas por FTIR. Observou-se que aumentando a temperatura e a quantidade de água nos líquidos iônicos, a viscosidade diminui. Paralelamente, a condutividade aumenta com o incremento da temperatura e da quantidade de água.
- O grau de ionicidade para o [PEHA][Ac] foi aproximadamente 10% do valor relativo à solução de KCl, e a composição que apresentou um melhor resultado foi de 72% (m/m de LI). Na série do [m-2HEA⁺] avaliada a 95% (m/m de LI) encontrou-se que o líquido iônico que apresentou a maior ionicidade foi o [m-2HEA][Ac], porém todos caíram na região de pouca ionicidade em relação ao padrão de KCl.
- A enzima solubilizou nos quatro líquidos da série [m-2HEA⁺], sendo sua máxima solubilização em 60% para o Ac e o Pr, 40% para o Bu e 20% para o Pe. A mesma apresentou um aumento da atividade em m-2HEAA (até 40%) e em m-2HEAPr (até 20%). Nas demais proporções para os quatro líquidos iônicos apresentou perda da atividade.
- A partir da série de Hofmeister encontrou-se que o ânion mais cosmotrópico, é o ânion acetato. Assim, a cosmotropicidade diminui na seguinte sequência: Ac > Pr > Bu > Pe.
- A enzima catalase e o [PEHA][Ac] foram satisfatoriamente imobilizados na superfície do carbono vítreo pelas técnicas de LBL e eletrodeposição, obtendo o bioeletrodo CV/([PEHA][Ac]/CAT)₅. A enzima e o líquido iônico apresentaram uma combinação sinérgica, em que o bioeletrodo obtido mostrou dois pares de picos de corrente em tampão fosfato; o processo redox do bioeletrodo é confinado a processos adsortivos na superfície do mesmo.
- A resposta do bioeletrodo frente ao peróxido de hidrogênio foi devida à enzima catalase. A presença do [PEHA][Ac] encontrou-se fundamental para a imobilização da catalase, sugerindo que os líquidos iônicos próticos são promissores para a ancoragem de proteínas – enzimas redox e para o desenvolvimento de bioeletrodos de terceira geração, nos quais ocorrem os processos por transferência eletrônica direta.

- A catalase foi satisfatoriamente imobilizada pelo método CLEA e quatro materiais foram sintetizados, CAT-I, CAT-G, CAT-[PEHA][Ac] e CAT-mA. Com FTIR confirmou-se a preservação da estrutura secundária da catalase sugerindo com isto que o sítio ativo da mesma teria sido preservado no processo de imobilização. Adicionalmente, os resultados sugerem que o entrecruzamento ocorreu com aminoácidos de cadeias laterais da enzima.
- A partir das microscopias dos bioeletrodos confirmou-se a formação de novas estruturas, onde a presença de orifícios sugere que a imobilização foi conduzida por reticulação. Estes orifícios apreciam-se de diferentes tamanhos a depender do material imobilizado com a catalase. No CAT-G apresentaram-se áreas heterogêneas entre a catalase e o grafite.
- Com estes materiais foram construídos quatro bioeletrodos os quais foram devidamente caracterizados eletroquimicamente. Todos os bioeletrodos apresentaram boa estabilidade, e a presença dos líquidos iônicos provocou um aumento na janela de potencial.
- No estudo de velocidade de varredura observou-se que os processos redox de CAT-I e CAT-G são confinados à superfície. Já os bioeletrodos CAT-[PEHA][Ac] e CAT-mA apresentam processos limitados por difusão.
- Os bioeletrodos apresentaram um comportamento cinético de Michaelis-Menten. O CAT-[PEHA][Ac] apresentou maior afinidade com o substrato H_2O_2 . Isto permite concluir que o líquido iônico também confere um microambiente mais adequado para a interação enzima-substrato.
- Os resultados cinéticos dos bioeletrodos são competitivos com os obtidos por outros autores que usaram líquidos iônicos apróticos e/ou materiais nanocarbonáceos. Isto é indicativo da habilidade do líquido iônico prótico no processo de transferência de carga. O método de imobilização utilizado também é responsável desse aumento positivo nos parâmetros cinéticos.

TRABALHOS FUTUROS

Como parte dos trabalhos futuros propõe-se testar a resposta eletroquímica dos bioeletrodos desenvolvidos frente ao etanol. Para isto, deverá ser estudada previamente a razão entre o peróxido de hidrogênio e o etanol, necessária para que a reação da enzima venha a ser peroxidática. Muito importante também é que uma metodologia mais simples de limpeza seja estabelecida para os bioeletrodos desenvolvidos pelo método CLEA.

Projetando a construção de uma célula a biocombustível propõe-se a obtenção de bioânodos a partir da deposição física do material CAT-[PEHA][Ac] em tecido de carbono. Estes bioânodos devem ser caracterizados morfológica e eletroquimicamente.

Baseado em estudos das propriedades físico-químicas, líquidos iônicos próticos mais condutores e com maior grau de ionicidade podem ser projetados; os quais podem ser testados com a metodologia de desenvolvimento de bioeletrodos aplicada no presente projeto.

O mecanismo responsável da melhora na transferência eletrônica direta com o uso de líquidos iônicos próticos deve ser elucidado e compreendido.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, Y.; GUSCHIN, D. A.; ECKHARD, K.; SHLEEV, S.; SCHUHMANN, W. Design of a bioelectrocatalytic electrode interface for oxygen reduction in biofuel cells based on a specifically adapted Os-complex containing redox polymer with entrapped *Trametes hirsuta* laccase. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 5, p. 640–643, 2010.
- ADAM, C.; BRAVO, M. V.; MANCINI, P. M. E. Molecular solvent effect on the acidity constant of protic ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 1, p. 148–150, 2014.
- ADENIER, A.; CHEHIMI, M. M.; GALLARDO, I.; PINSON, J.; VILÀ, N. Electrochemical Oxidation of Aliphatic Amines and Their Attachment to Carbon and Metal Surfaces. **Langmuir**, v. 20, n. 19, p. 8243–8253, 2004.
- AGNÈS, C.; REUILLARD, B.; GOFF, A. LE; HOLZINGER, M.; COSNIER, S. A double-walled carbon nanotube-based glucose/H₂O₂ biofuel cell operating under physiological conditions. **Electrochemistry Communications**, v. 34, p. 105–108, 2013.
- AHUJA, T.; MIR, I.; KUMAR, D.; RAJESH. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791–805, 2007.
- AKYILMAZ, E.; DINÇKAYA, E. Development of a catalase based biosensor for alcohol determination in beer samples. **Talanta**, v. 61, n. 2, p. 113–8, 2003.
- ALDRICH, S. **Enzymatic Assay of Catalase (EC 1.11.1.6)**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-catalase.html>>. Acesso em: 22 maio. 2017.
- ÁLVAREZ, V. H.; DOSIL, N.; GONZALEZ-CABALEIRO, R.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; IGLESIAS, M.; NAVAZA, J. M. Brønsted Ionic Liquids for Sustainable Processes: Synthesis and Physical Properties †. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 2, p. 625–632, 2010.
- AMMAM, M. Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: Principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes.

Biosensors and Bioelectronics, v. 58, p. 121–131, 2014.

AMMAM, M.; FRANSAER, J. Micro-biofuel cell powered by glucose/O₂ based on electro-deposition of enzyme, conducting polymer and redox mediators: Preparation, characterization and performance in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 6, p. 1474–1480, fev. 2010.

AMMAM, M.; FRANSAER, J. Combination of laccase and catalase in construction of H₂O₂–O₂ based biocathode for applications in glucose biofuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 274–281, 2013.

ANDRONESCU, C.; PÖLLER, S.; SCHUHMANN, W. Electrochemically induced deposition of poly(benzoxazine) precursors as immobilization matrix for enzymes. **Electrochemistry Communications**, v. 41, p. 12–15, 2014.

ANGELL, C. A.; BYRNE, N.; BELIERES, J.-P. Parallel Developments in Aprotic and Protic Ionic Liquids: Physical Chemistry and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 11, p. 1228–1236, 2007.

ANGELONI, R.; TOMASSETTI, M.; CASTRUCCI, M.; CAMPANELLA, L. Ethanol Determination in Alcoholic Beverages Using Two Different Amperometric Enzyme Sensors. **Current Analytical Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 56–67, 2015.

ANNE, A.; BLANC, B.; MOIROUX, J.; SAVÉANT, J. M. Facile Derivatization of Glassy Carbon Surfaces by N -Hydroxysuccinimide Esters in View of Attaching Biomolecules. **Langmuir**, v. 14, n. 9, p. 2368–2371, 1998.

ANTONIADOU, S.; JANNAKOUDAKIS, A. D.; JANNAKOUDAKIS, P. D.; THEODORIDOU, E. Anion exchange activity of electrochemically bonded ethylene diamine on carbon fibres. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 22, n. 11, p. 1060–1064, 1992.

AQUINO NETO, S.; HICKEY, D. P.; MILTON, R. D.; ANDRADE, A. R. DE; MINTEER, S. D. High current density PQQ-dependent alcohol and aldehyde dehydrogenase bioanodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 72, p. 247–254, 2015.

ARECHEDERRA, R. L.; TREU, B. L.; MINTEER, S. D. Development of glycerol/O₂ biofuel cell. **Journal of Power Sources**, v. 173, n. 1, p. 156–161, 2007.

ARMAND, M.; ENDRES, F.; MACFARLANE, D. R.; OHNO, H.; SCROSATI, B. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. **Nature Materials**, v. 8, n. 8, p. 621–629, 2009.

ATKINS, P. **Físico-Química Fundamentos**. 3a. ed. LTC, 2003.

BAI, Y.; WU, J.; XI, J.; WANG, J.; ZHU, W.; CHEN, L.; QIU, X. Electrochemical oxidation of ethanol on Pt–ZrO₂/C catalyst. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 11, p. 1087–1090, 2005.

BARBIER, B. Electrochemical Bonding of Amines to Carbon Fiber Surfaces Toward Improved Carbon-Epoxy Composites. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 137, n. 6, p. 1757, 1990.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Adv.**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications**. 2nd ed. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc, 2001.

BARRIÈRE, F.; DOWNARD, A. J. Covalent modification of graphitic carbon substrates by non-electrochemical methods. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 10, p. 1231–1244, 2008.

BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell about proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 35, n. 4, p. 62, 2002.

BELIERES, J.-P.; ANGELL, C. A. Protic Ionic Liquids: Preparation, Characterization, and Proton Free Energy Level Representation †. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 18, p. 4926–4937, 2007.

BELTRAME, M. B.; MAFRA, A. C. O.; RIBEIRO, M. P. A.; BADINO, A. C.; TARDIOLI, P. W. **AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA COMO AGENTE ESPAÇADOR NA PRODUÇÃO deas DE INVERTASE** Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Cobeq IC 2015. **Anais...** São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2015 Disponível em:

<<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/19826>>

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6th. ed. Barcelona: Editorial Reverté, 2007.

BLESIC, M.; MARQUES, M. H.; PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R.; REBELO, L. P. N.; LOPES, A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. **Green Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 481, 2007.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1–2, p. 48–52, 2004.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; STEWART, P. R.; NINHAM, B. W. Hofmeister effects in membrane biology: The role of ionic dispersion potentials. **Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics**, v. 68, n. 4, p. 1–6, 2003.

BULLEN, R. A; ARNOT, T. C.; LAKEMAN, J. B.; WALSH, F. C. Biofuel cells and their development. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 11, p. 2015–45, 2006.

CALABRESE BARTON, S.; GALLAWAY, J.; ATANASSOV, P. Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 10, p. 4867–4886, 2004.

CAMPANELLA, L.; CAPESCIOTTI, G. S.; GATTA, T.; TOMASSETTI, M. An innovative organic phase enzyme electrode (OPEE) for the determination of ethanol in leadless petrols. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 147, n. 1, p. 78–86, 2010.

CHIU, J.-Y.; YU, C.-M.; YEN, M.-J.; CHEN, L.-C. Glucose sensing electrodes based on a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/Prussian blue bilayer and multi-walled carbon nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 7, p. 2015–2020, 2009.

CINQUIN, P. *et al.* A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10476, 2010.

COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 5, p. 443–456, 1999.

COSNIER, S. Biosensors based on electropolymerized films: new trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 3, p. 507–520, 2003.

COSNIER, S.; GROSS, A. J.; GOFF, A. LE; HOLZINGER, M. Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations. **Journal of Power Sources**, v. 325, p. 252–263, 2016.

D'SOUZA, S. Immobilized enzymes in bioprocess. **Current Science**, v. 77, p. 69–79, 1999.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Biofuel cells--recent advances and applications. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1224–35, 2007.

DEINHAMMER, R. S.; HO, M.; ANDEREGG, J. W.; PORTER, M. D. Electrochemical oxidation of amine-containing compounds: a route to the surface modification of glassy carbon electrodes. **Langmuir**, v. 10, n. 4, p. 1306–1313, 1994.

DEMASTER, E. G.; DAHLSEID, T.; REDFERN, B. Comparative Oxidation of 2-Propyn-1-ol with Other Low Molecular Weight Unsaturated and Saturated Primary Alcohols by Bovine Liver Catalase in vitro. **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, n. 3, p. 414–419, 1994.

DIMCHEVA, N.; HOROZOVA, E. Direct electrochemistry of *Penicillium chrysogenum* catalase adsorbed on spectroscopic graphite. **Bioelectrochemistry**, v. 90, p. 1–7, 2013.

DOCAMPO-ÁLVAREZ, B.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, V.; MÉNDEZ-MORALES, T.; RODRÍGUEZ, J. R.; LÓPEZ-LAGO, E.; CABEZA, O.; GALLEGU, L. J.; VARELA, L. M. Molecular dynamics simulations of mixtures of protic and aprotic ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 34, p. 23932–23943, 2016.

DOWNARD, A. J.; GARRETT, D. J.; TAN, E. S. Q. Microscale Patterning of Organic Films on Carbon Surfaces Using Electrochemistry and Soft Lithography †. **Langmuir**, v. 22, n. 25, p. 10739–10746, 2006.

ENDRES, F.; ABBOTT, A.; MACFARLANE, D. (EDS.). **Electrodeposition from Ionic Liquids**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

EZHIL VILIAN, A. T.; CHEN, S. M.; LOU, B. S. A simple strategy for the immobilization of catalase on multi-walled carbon nanotube/poly (L-lysine) biocomposite for the detection of H₂O₂ and iodate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 639–647, 2014.

FALASE, A.; GARCIA, K.; LAU, C.; ROY, J.; ATANASSOV, P. Hybrid Nano-Structured Platinum-Based Catalyst/Enzyme Anode for Oxidation of Ethanol and Ethylene Glycol. **ECS Electrochemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. F9–F11, 2012.

FARIDBOD, F.; REZA, M.; NOROUZI, P.; RIAHI, S.; RASHEDI, H. Application of Room Temperature Ionic Liquids in Electrochemical Sensors and Biosensors. In: **Ionic Liquids: Applications and Perspectives**. InTech, 2011. p. 653.

FRASER, K. J.; IZGORODINA, E. I.; FORSYTH, M.; SCOTT, J. L.; MACFARLANE, D. R. Liquids intermediate between “molecular” and “ionic” liquids: Liquid Ion Pairs? **Chemical Communications**, n. 37, p. 3817, 2007.

FRY, A. **Synthetic Organic Electrochemistry**. New York: Harper & Row, 1972.

FUJITA, K.; MACFARLANE, D. R.; FORSYTH, M. Protein solubilising and stabilising ionic liquids. **Chemical Communications**, n. 38, p. 4804, 2005.

FUJITA, K.; MACFARLANE, D. R.; FORSYTH, M.; YOSHIZAWA-FUJITA, M.; MURATA, K.; NAKAMURA, N.; OHNO, H. Solubility and Stability of Cytochrome c in Hydrated Ionic Liquids: Effect of Oxo Acid Residues and Kosmotropicity. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2080–2086, 2007.

GABRIEL, S. Ueber Vinylamin und Bromäthylamin. (II.). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 21, n. 2, p. 2664–2669, 1888.

GALHARDO, K. S.; TORRESI, R. M.; TORRESI, S. I. C. DE. Improving the performance of a glucose biosensor using an ionic liquid for enzyme immobilization. On the chemical interaction between the biomolecule, the ionic liquid and the cross-linking agent. **Electrochimica Acta**, v. 73, p. 123–128, 2012.

GAMELLA, M.; KOUSHANPOUR, A.; KATZ, E. Biofuel cells - Activation of micro- and macro-electronic devices. **Bioelectrochemistry**, v. 119, p. 33–42, 2018.

GAO, R.; ZHENG, J. Amine-terminated ionic liquid functionalized carbon nanotube-

gold nanoparticles for investigating the direct electron transfer of glucose oxidase. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 3, p. 608–611, 2009.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345–359, 2002.

GHANDI, K. A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 04, n. 01, p. 44–53, 2014.

GHILANE, J.; MARTIN, P.; RANDRIAMAHAZAKA, H.; LACROIX, J.-C. Electrochemical oxidation of primary amine in ionic liquid media: Formation of organic layer attached to electrode surface. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 246–249, 2010.

GHOLIVAND, M. B.; KHODADADIAN, M. Amperometric cholesterol biosensor based on the direct electrochemistry of cholesterol oxidase and catalase on a graphene/ionic liquid-modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 53, p. 472–478, 2014.

GIROUD, F.; GONDRAN, C.; GORGY, K.; PELLISSIER, A.; LENOUVEL, F.; CINQUIN, P.; COSNIER, S. A quinhydrone biofuel cell based on an enzyme-induced pH gradient. **Journal of Power Sources**, v. 196, n. 3, p. 1329–1332, 2011.

GOMEZ, C.; SHIPOVSKOV, S.; FERAPONTOVA, E. E. Peroxidase biocathodes for a biofuel cell development. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, 2010.

GOODSELL, D. S. Catalase. **RCSB Protein Data Bank**, 2004.

GUAUQUE TORRES, M. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 18–23, 2013.

HALÁMKOVÁ, L.; HALÁMEK, J.; BOCHAROVA, V.; SZCZUPAK, A.; ALFONTA, L.; KATZ, E. Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 11, p. 5040–5043, 2012.

HASHEMNIA, S.; KHAYATZADEH, S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.;

GHOURCHIAN, H. Direct Electrochemistry of Catalase in Multiwall Carbon Nanotube / dodecyl Trimethylammonium Bromide Film Covered With a Layer of Nafion on a Glassy Carbon Electrode. v. 6, p. 581–595, 2011.

HAYES, R.; IMBERTI, S.; WARR, G. G.; ATKIN, R. The Nature of Hydrogen Bonding in Protic Ionic Liquids. **Angewandte Chemie**, v. 52, p. 4623–4627, 2013.

HNAIEN, M.; LAGARDE, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N. A rapid and sensitive alcohol oxidase/catalase conductometric biosensor for alcohol determination. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 222–7, 2010.

HUANG, J.-F.; BAKER, G. A.; LUO, H.; HONG, K.; LI, Q.-F.; BJERRUM, N. J.; DAI, S. Brønsted acidic room temperature ionic liquids derived from N,N-dimethylformamide and similar protophilic amides. **Green Chem.**, v. 8, n. 7, p. 599–602, 2006.

HUANG, K.-J.; NIU, D.-J.; LIU, X.; WU, Z.-W.; FAN, Y.; CHANG, Y.-F.; WU, Y.-Y. Direct electrochemistry of catalase at amine-functionalized graphene/gold nanoparticles composite film for hydrogen peroxide sensor. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 7, p. 2947–2953, 2011.

IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 1–10, 2012.

JIANG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, Z.; CHEN, J. G. Pt-modified TaC as an efficient electrocatalyst for ethanol oxidation in acid and alkaline electrolytes. v. 234, n. April, p. 329–336, 2018.

JÚNIOR, A. A. J.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação Lipídica E Etanol: Papel Da Glutathione Reduzida E Da Vitamina E. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 31, n. 3, p. 434, 1998.

KARNICKA, K.; ECKHARD, K.; GUSCHIN, D. A.; STOICA, L.; KULESZA, P. J.; SCHUHMANN, W. Visualisation of the local bio-electrocatalytic activity in biofuel cell cathodes by means of redox competition scanning electrochemical microscopy (RC-SECM). **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 8, p. 1998–2002, 2007.

KIM, J.; KIM, S. I.; YOO, K.-H. Polypyrrole nanowire-based enzymatic biofuel cells.

Biosensors and Bioelectronics, v. 25, n. 2, p. 350–355, 2009.

KIM, Y. H.; CAMPBELL, E.; YU, J.; MINTEER, S. D.; BANTA, S. Complete Oxidation of Methanol in Biobattery Devices Using a Hydrogel Created from Three Modified Dehydrogenases. **Angewandte Chemie**, v. 125, n. 5, p. 1477–1480, 2013.

KIMBROUGH, D. R.; MAGOUN, M. A.; LANGFUR, M. A Laboratory Experiment Investigating Different Aspects of Catalase Activity in an Inquiry - Based Approach. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 2, p. 210, 1997.

KLOTZBACH, T.; WATT, M.; ANSARI, Y.; MINTEER, S. Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization. **Journal of Membrane Science**, v. 282, n. 1–2, p. 276–283, 2006.

KUSANO, T.; FUJII, K.; HASHIMOTO, K.; SHIBAYAMA, M. Water-in-Ionic Liquid Microemulsion Formation in Solvent Mixture of Aprotic and Protic Imidazolium-Based Ionic Liquids. **Langmuir**, v. 30, n. 40, p. 11890–11896, 2014.

LAMBERG, P.; SHLEEV, S.; LUDWIG, R.; ARNEBRANT, T.; RUZGAS, T. Performance of enzymatic fuel cell in cell culture. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 168–173, 2014.

LEECH, D.; KAVANAGH, P.; SCHUHMANN, W. Enzymatic fuel cells: Recent progress. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 223–234, 2012.

LENTE, F. VAN; PEPOY, M. Coupled-Enzyme Determination of Catalase Activity in Erythrocytes. **Clinical chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1339–1343, 1990.

LI, Q.; LUO, G.; FENG, J. Direct Electron Transfer for Heme Proteins Assembled on Nanocrystalline TiO₂ Film. **Electroanalysis**, v. 13, n. 5, p. 359–363, 2001.

LIU, J.; DONG, S. Grafting of diaminoalkane on glassy carbon surface and its functionalization. **Electrochemistry Communications**, v. 2, n. 10, p. 707–712, 2000.

LIU, J.; WANG, Q.; FAN, X. R.; SUN, X. J.; HUANG, P. H. Layer-by-Layer self-assembly immobilization of catalases on wool fabrics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 7, p. 2212–2222, 2013.

LIU, L.; CHENG, Y.; SUN, F.; YANG, J.; WU, Y. Enhanced direct electron transfer of glucose oxidase based on a protic ionic liquid modified electrode and its biosensing application. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 3, p. 1003–1009, 2012.

LOSETTY, V.; CHENNURI, B. K.; GARDAS, R. L. Thermophysical and spectroscopic study of pure N-methylcyclohexylammonium based ionic liquids. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 90, p. 251–258, 2015.

MA, Y.; LIU, Y.; SU, H.; WANG, L.; ZHANG, J. Relationship between hydrogen bond and viscosity for a series of pyridinium ionic liquids : Molecular dynamics and quantum chemistry. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p. 176–184, 2018.

MALE, K. B.; HRAPOVIC, S.; LUONG, J. H. T. Electrochemically-assisted deposition of oxidases on platinum nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified electrodes. **The Analyst**, v. 132, n. 12, p. 1254, 2007.

MARX, S.; JOSE, M. V.; ANDERSEN, J. D.; RUSSELL, A. J. Electrospun gold nanofiber electrodes for biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2981–2986, 2011.

MEHLER, A. **Introduction to enzymology**. New York: Academic Press INC, 1957.

MEREDITH, M. T.; MINTEER, S. D. Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 157–179, 2012.

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

MISKOLCZY, Z.; SEBÖK-NAGY, K.; BICZÓK, L.; GÖKTÜRK, S. Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution. **Chemical Physics Letters**, v. 400, n. 4–6, p. 296–300, 2004.

MOEHLENBROCK, M. J.; MINTEER, S. D. Extended lifetime biofuel cells. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 6, p. 1188, 2008.

MOEHLENBROCK, M. J.; MINTEER, S. D. Extended lifetime biofuel cells. **Chemical Society reviews**, v. 37, n. 6, p. 1188–96, 2008.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882–1886, 1975.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principios de Bioquímica**. 4ª edición ed, 2005.

OHNO, H. (ED.). **Electrochemical Aspects of Ionic Liquids**. Second ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2011.

OLIVEIRA, K. C. **Desenvolvimento de um biosensor potenciométrico, a base de soja, para determinação de uréia**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

OPALLO, M.; LESNIEWSKI, A. A review on electrodes modified with ionic liquids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n. 1–2, p. 2–16, 2011.

PATEL, R.; KUMARI, M.; KHAN, A. B. Recent Advances in the Applications of Ionic Liquids in Protein Stability and Activity: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3701–3720, 2014.

PEIGHAMBARDOUST, S. J.; ROWSHANZAMIR, S.; AMJADI, M. Review of the proton exchange membranes for fuel cell applications. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 17, p. 9349–9384, 2010.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. DE S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, 2002.

PERIASAMY, A. P.; HO, Y.-H.; CHEN, S.-M. Multiwalled carbon nanotubes dispersed in carminic acid for the development of catalase based biosensor for selective amperometric determination of H₂O₂ and iodate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 29, n. 1, p. 151–158, 2011.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTÍ, E.; CRUAÑAS, R.; GARAU, M. A. A comparative study of the terrestrial ecotoxicity of selected protic and aprotic ionic liquids. **Chemosphere**, v. 108, p. 418–425, 2014.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTÍ, E.; CRUAÑAS, R.; GARAU, M. A.; ARNING, J.; BOTTIN-WEBER, U.; STOLTE, S. (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 99–105, 2013.

PINKERT, A.; ANG, K. L.; MARSH, K. N.; PANG, S. Density, viscosity and electrical conductivity of protic alkanolammonium ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 11, p. 5136, 2011.

PRABHULKAR, S.; TIAN, H.; WANG, X.; ZHU, J.-J.; LI, C.-Z. Engineered Proteins: Redox Properties and Their Applications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 12, p. 1796–1822, 2012.

PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 13, n. 4, p. 4811–4840, 2013.

QIU, J.-D.; WANG, R.; LIANG, R.-P.; XIA, X.-H. Electrochemically deposited nanocomposite film of CS-Fc/Au NPs/GOx for glucose biosensor application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2920–2925, 2009.

RAHIMI, P.; RAFIEE-POUR, H.-A.; GHOURCHIAN, H.; NOROUZI, P.; GANJALI, M. R. Ionic-liquid/NH₂-MWCNTs as a highly sensitive nano-composite for catalase direct electrochemistry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 6, p. 1301–1306, 2010.

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

REWATKAR, P.; BANDAPATI, M.; GOEL, S. Optimized Bucky Paper-Based Bioelectrodes for Oxygen – Glucose Fed Enzymatic Biofuel Cells. **IEEE Sensors Journal**, v. 18, n. 13, p. 5395–5401, 2018.

ROBINSON, R. A.; STOKES, R. H. **Electrolyte Solutions**. 2th. ed. New York: Butterworths Scientific Publication, 2002. v. 72

ROSALES, G.; BOAVENTURA, J. S.; DRUZIAN, J. I. Avanços dos biocatalisadores usados em células a biocombustível. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 3, p. 293–301, 2013.

RYDZEK, G.; JI, Q.; LI, M.; SCHAAF, P.; HILL, J. P.; BOULMEDAIS, F.; ARIGA, K. Electrochemical nanoarchitectonics and layer-by-layer assembly: From basics to future. **Nano Today**, v. 10, n. 2, p. 138–167, 2015.

SAADATI, S.; SALIMI, A.; HALLAJ, R.; ROSTAMI, A. Layer by layer assembly of

catalase and amine-terminated ionic liquid onto titanium nitride nanoparticles modified glassy carbon electrode: Study of direct voltammetry and bioelectrocatalytic activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 753, p. 32–41, 2012.

SAADATI, S.; SALIMI, A.; HALLAJ, R.; ROSTAMI, A. Direct electron transfer and electrocatalytic properties of immobilized hemoglobin onto glassy carbon electrode modified with ionic-liquid/titanium-nitride nanoparticles: Application to nitrite detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 625–633, 2014.

SAHNEY, R.; ANAND, S.; PURI, B. K.; SRIVASTAVA, A. K. A comparative study of immobilization techniques for urease on glass-pH-electrode and its application in urea detection in blood serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 2, p. 156–161, 2006.

SALIMI, A.; NOORBAKHSH, A. Layer by layer assembly of glucose oxidase and thiourea onto glassy carbon electrode: Fabrication of glucose biosensor. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 17, p. 6097–6105, 2011.

SALIMI, A.; NOORBAKHSH, A.; GHADERMARZ, M. Direct electrochemistry and electrocatalytic activity of catalase incorporated onto multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 344, n. 1, p. 16–24, 2005.

SALIMI, A.; SHARIFI, E.; NOORBAKHSH, A.; SOLTANIAN, S. Direct electrochemistry and electrocatalytic activity of catalase immobilized onto electrodeposited nano-scale islands of nickel oxide. **Biophysical Chemistry**, v. 125, n. 2–3, p. 540–548, 2007.

SAMEJIMA, T.; KAMATA, M.; SHIBATA, K. Dissociation of bovine liver catalase at low pH. **Journal of Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 181–187, 1962.

SANTORO, C.; KODALI, M.; HERRERA, S.; SEROV, A.; IEROPOULOS, I. Power generation in microbial fuel cells using platinum group metal-free cathode catalyst : Effect of the catalyst loading on performance and costs. **Journal of Power Sources**, v. 378, n. December 2017, p. 169–175, 2018.

SANTOS, D.; LOURENÇO, É.; SANTOS, M.; SANTOS, J. P.; FRANCESCHI, E.; BARISON, A.; MATTEDI, S. Properties of aqueous solutions of ammonium-based ionic liquids and thermodynamic modelling using Flory theory. **Journal of Molecular Liquids**, v. 229, p. 508–513, 2017.

SANTOS, J. P. **Desenvolvimento de membrana eletrolítica, com líquidos-iônicos, para aplicação em células a combustível.** Universidade Federal da Bahia, 2018.

SCHOEVAART, R.; WOLBERS, M. W.; GOLUBOVIC, M.; OTTENS, M.; KIEBOOM, A. P. G.; RANTWIJK, F. VAN; WIELEN, L. A. M. VAN DER; SHELDON, R. A. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 754–762, 20 2004.

SCHREINER, C.; ZUGMANN, S.; HARTL, R.; GORES, H. J. Fractional Walden Rule for Ionic Liquids: Examples from Recent Measurements and a Critique of the So-Called Ideal KCl Line for the Walden Plot †. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 5, p. 1784–1788, 2010.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 2, p. 207–213, 2006.

SHAMSIPUR, M.; ASGARI, M.; MARAGHEH, M. G.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. A novel impedimetric nanobiosensor for low level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase. **Bioelectrochemistry**, v. 83, p. 31–37, 2012.

SHAMSIPUR, M.; ASGARI, M.; MOUSAVI, M. F.; DAVARKHAH, R. A Novel Hydrogen Peroxide Sensor Based on the Direct Electron Transfer of Catalase Immobilized on Nano-Sized NiO/MWCNTs Composite Film. **Electroanalysis**, v. 24, n. 2, p. 357–367, 2012.

SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 213–223, 2011.

SHEN, Q.; YANG, R.; HUA, X.; YE, F.; ZHANG, W.; ZHAO, W. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1565–1571, 2011.

SHEN, W.; DENG, H.; TEO, A. K. L.; GAO, Z. An electrodeposited redox polymer–laccase composite film for highly efficient four-electron oxygen reduction. **Journal of Power Sources**, v. 226, p. 27–32, 2013.

SHI, W.; LIN, N.; SONG, Y.; LIU, C.; ZHOU, S.; CAI, X. A novel method to

directionally stabilize enzymes together with redox mediators by electrodeposition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 244–248, 2014.

SHIDDIKY, M. J. A.; TORRIERO, A. A. J. Application of ionic liquids in electrochemical sensing systems. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1775–1787, 2011.

SILVA, J. S. **Biossensor impedimétrico baseado em concanavalina A e filmes de polianilina para detecção de lipopolissacarídeos e ácido lipoteicoico bacterianos**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2013.

SLAUGHTER, G.; KULKARNI, T. Fabrication of palladium nanowire array electrode for biofuel cell application. **Microelectronic Engineering**, v. 149, p. 92–96, 2016.

SMITH, P. J.; MANN, C. K. Electrochemical dealkylation of aliphatic amines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 1821–1826, 1969.

SOBER, H. A. **Handbook of biochemistry, Selected data for molecular biology**. 2^a ed. ed. Cleveland: CRC Press, 1970.

SONG, X.; KANZAKI, R.; ISHIGURO, S.; UMEBAYASHI, Y. Physicochemical and Acid-base Properties of a Series of 2-Hydroxyethylammonium-based Protic Ionic Liquids. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 5, p. 469–474, 2012.

SOUKHAREV, V.; MANO, N. A four-electron O₂-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell at 0.88 V. **J. Ame. Chem. Soc.**, v. 126, p. 8368–8369, 2004.

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA. PRIMEIRA PARTE: ASPECTOS TEÓRICOS. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

STOIMENOVSKI, J.; IZGORODINA, E. I.; MACFARLANE, D. R. Ionicity and proton transfer in protic ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 35, p. 10341, 2010.

STOLARCZYK, K.; KIZLING, M.; MAJDECKA, D.; ŻELECHOWSKA, K.; BIERNAT, J. F.; ROGALSKI, J.; BILEWICZ, R. Biobatteries and biofuel cells with biphenylated carbon nanotubes. **Journal of Power Sources**, v. 249, p. 263–269, 2014.

STOLARCZYK, K.; ŁYP, D.; ŻELECHOWSKA, K.; BIERNAT, J. F.; ROGALSKI, J.; BILEWICZ, R. Arylated carbon nanotubes for biobatteries and biofuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 79, p. 74–81, 2012.

SUN, I.; LIN, Y.; CHEN, B.; KUO, C.; CHEN, C.; SU, S.; CHEN, P.; WU, T. Electrochemical and Physicochemical Characterizations of Butylsulfate-Based Ionic Liquids. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 8, p. 7206–7224, 2012.

SUN, Y.; WANG, H.; SUN, C. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer covalent attachment of AMWNTs and IO₄⁻-oxidized GOx. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 1, p. 22–28, 2008.

TALAVERA-PRIETO, N. M. C.; FERREIRA, A. G. M.; SIMÕES, P. N.; CARVALHO, P. J.; MATTEDI, S.; COUTINHO, J. A. P. Thermophysical characterization of N-methyl-2-hydroxyethylammonium carboxylate ionic liquids. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 68, n. 3, p. 221–234, 2014.

TAN, L.-L.; ONG, W.-J.; CHAI, S.-P.; MOHAMED, A. Reduced graphene oxide-TiO₂ nanocomposite as a promising visible-light-active photocatalyst for the conversion of carbon dioxide. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 465, 2013.

TAVARES, A.; RODRIGUEZ, O.; MACEDO, E. **New Generations of Ionic Liquids Applied to Enzymatic Biocatalysis**. 2013 Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>>. Acesso em: 7 fev. 2016.

TISCHER, A.; PULTKE, H.; TOPF, A.; AUTON, M.; LANGE, C.; LILIE, H. The effects of N -ethyl- N '-methyl imidazolium chloride on the solubility, stability and aggregation of tc-rPA. **FEBS Journal**, v. 281, n. 7, p. 1738–1749, 2014.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 326–335, 1999.

TOMLINSON, S. R.; KEHR, C. W.; LOPEZ, M. S.; SCHLUP, J. R.; ANTHONY, J. L. Solubility of the Corn Protein Zein in Imidazolium-based Ionic Liquids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 6, p. 2293–2298, 2014.

TOPCAGIC, S.; MINTEER, S. D. Development of a membraneless ethanol/oxygen

- biofuel cell. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 11, p. 2168–2172, 2006.
- TÜKEL, S. S.; HÜRREM, F.; YILDIRIM, D.; ALPTEKIN, Ö. Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEA) of catalase and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 252–257, 2013.
- TUNCKOL, M.; DURAND, J.; SERP, P. Carbon nanomaterial–ionic liquid hybrids. **Carbon**, v. 50, n. 12, p. 4303–4334, 2012.
- UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The Enzyme Electrode. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 986–988, 1967.
- VASANTHA, T.; KUMAR, A.; ATTRI, P.; VENKATESU, P.; RAMA DEVI, R. S. Influence of biocompatible ammonium ionic liquids on the solubility of l-alanine and l-valine in water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 39–45, 2012.
- VATSYAYAN, P.; BORDOLOI, S.; GOSWAMI, P. Large catalase based bioelectrode for biosensor application. **Biophysical Chemistry**, v. 153, n. 1, p. 36–42, 2010.
- VITORINO, J.; AGAPITO, F.; PIEDADE, M. F. M.; BERNARDES, C. E. S.; DIOGO, H. P.; LEAL, J. P.; MINAS DA PIEDADE, M. E. Thermochemistry of 1,1,3,3-tetramethylguanidine and 1,1,3,3-tetramethylguanidinium nitrate. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 77, p. 179–189, 2014.
- WANG, D.; TAN, Y. Electrodeposition of enzymes-integrated mesoporous composite films by interfacial templating: A paradigm for electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 116, p. 495–503, 2014.
- WANG, S.-F.; CHEN, T.; ZHANG, Z.-L.; PANG, D.-W.; WONG, K.-Y. Effects of hydrophilic room-temperature ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of heme proteins entrapped in agarose hydrogel films. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 7, p. 1709–1714, 2007.
- WANG, S.-F.; CHEN, T.; ZHANG, Z.-L.; SHEN, X.-C.; LU, Z.-X.; PANG, D.-W.; AND KWOK-YIN WONG. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Heme Proteins Entrapped in Agarose Hydrogel Films in Room-Temperature Ionic Liquids. **Langmuir**, v. 21, n. 20, p. 9260–9266, 2005.

WANG, W.; LI, X.; YU, X.; YAN, L.; SHI, Z.; WEN, X.; SUN, W. Electrochemistry of Multilayers of Graphene and Myoglobin Modified Electrode and Its Biosensing. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 63, n. 3, p. 298–302, 2016.

WANG, Y.; LI, T.; ZHANG, W.; HUANG, Y. A hydrogen peroxide biosensor with high stability based on gelatin-multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 7, p. 1981–1987, 2014.

WANG, Y.; ZOU, S.; CAI, W. Recent Advances on Electro-Oxidation of Ethanol on Pt- and Pd-Based Catalysts: From Reaction Mechanisms to Catalytic Materials. p. 1507–1534, 2015.

WU, H.; LIANG, Y.; SHI, J.; WANG, X.; YANG, D.; JIANG, Z. Enhanced stability of catalase covalently immobilized on functionalized titania submicrospheres. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1438–1445, 2013.

WU, L.-Q.; BENTLEY, W. E.; PAYNE, G. F. Biofabrication with biopolymers and enzymes: Potential for constructing scaffolds from soft matter. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 2, p. 215–224, 2011.

XI, F.; LIU, L.; WU, Q.; LIN, X. One-step construction of biosensor based on chitosan–ionic liquid–horseradish peroxidase biocomposite formed by electrodeposition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 1, p. 29–34, 2008.

XIE, Y.; PAN, Y.; ZHANG, R.; LIANG, Y.; LI, Z. Modulating protein behaviors on responsive surface by external electric fields: A molecular dynamics study. **Applied Surface Science**, v. 326, p. 55–65, 2015.

XU, A.; ZHANG, Y.; LI, Z.; WANG, J. Densities and conductivities of seven 1-allyl-3-methylimidazolium carboxylate ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 214, p. 192–195, 2016.

YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 12–22, 2009.

YOSHIZAWA, M.; XU, W.; ANGELL, C. A. Ionic Liquids by Proton Transfer: Vapor Pressure, Conductivity, and the Relevance of $\Delta p K_a$ from Aqueous Solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 50, p. 15411–15419, 2003.

YU, J.; YU, D.; ZHAO, T.; ZENG, B. Development of amperometric glucose biosensor through immobilizing enzyme in a Pt nanoparticles/mesoporous carbon matrix. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1586–1591, 2008.

ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1527–1548, 2008.

ZENG, X.; LI, X.; XING, L.; LIU, X.; LUO, S.; WEI, W.; KONG, B.; LI, Y. Electrodeposition of chitosan–ionic liquid–glucose oxidase biocomposite onto nano-gold electrode for amperometric glucose sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2898–2903, 2009.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 2006.

ZHAO, C.; BURRELL, G.; TORRIERO, A. A. J.; SEPAROVIC, F.; DUNLOP, N. F.; MACFARLANE, D. R.; BOND, A. M. Electrochemistry of Room Temperature Protic Ionic Liquids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 23, p. 6923–6936, 2008.

ZHAO, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids-a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 7, p. 891–907, 2010.

ZHOU, B.; WANG, J.; GAO, X.; TIAN, Y. Attachment of nanoparticles to pyrolytic graphite electrode and its application for the direct electrochemistry and electrocatalytic behavior of catalase. **Analytical Letters**, v. 41, n. 10, p. 1832–1849, 2008.

APÊNDICE

A continuação, serão apresentados os resultados da construção do bioeletrodo na superfície de titânio. Na Figura 82 observa-se o voltamograma da eletrodeposição do [PEHA][Ac] com a formação de um pico no sentido de oxidação em 1,2 V.

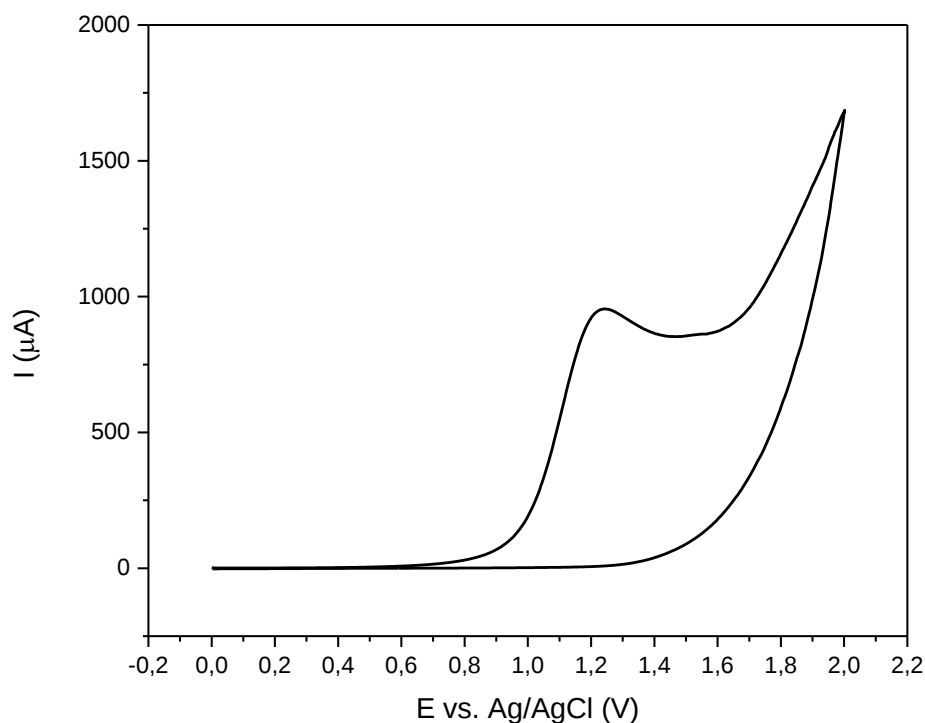


Figura 82. Voltamograma cíclico da eletrooxidação do [PEHA][Ac] na superfície de titânio

Na Figura 83 observa-se que apesar de ter sido obtido um pico no sentido oxidativo no processo de imobilização do líquido iônico, não houve resposta eletroquímica para este eletrodo modificado Ti/[PEHA][Ac].

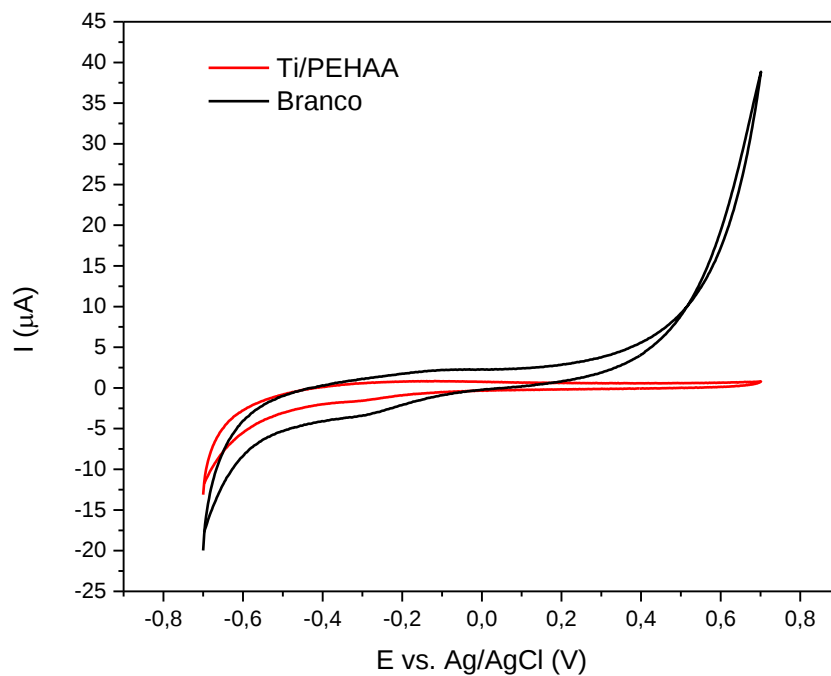


Figura 83. VC comparativos entre o eletrodo modificado com [PEHA][Ac] e antes da modificação.
Conduzidos em tampão fosfato pH = 7,0

Finalmente, foram conduzidas as eletrodeposições de catalase no eletrodo, mas a pesar de ser observada uma mudança no formato da curva a respeito do titânio puro, não foram obtidos picos eletroquímicos tanto para a catalase assim como para o [PEHA][Ac] (Figura 84).

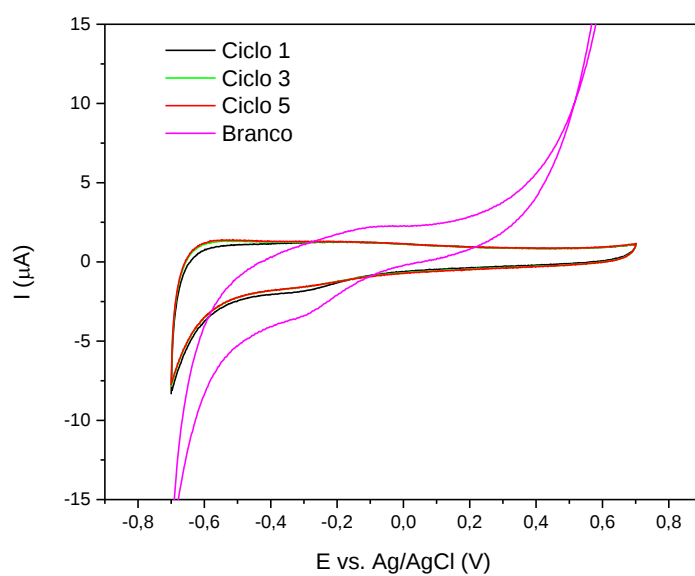


Figura 84. Resposta voltamétrica do eletrodo de titânio (Ti) e 1º, 3º e 5º ciclos de deposição de catalase e [PEHA][Ac] em CV, tampão fosfato pH 7,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Respeito ao eletrodo de titânio modificado com carbono Vulcan encontrou-se um comportamento similar ao anterior, não obtendo nenhuma resposta eletroquímica nem para o líquido iônico assim como para a catalase. As Figura 85 e Figura 86 apresentam estes resultados a seguir.

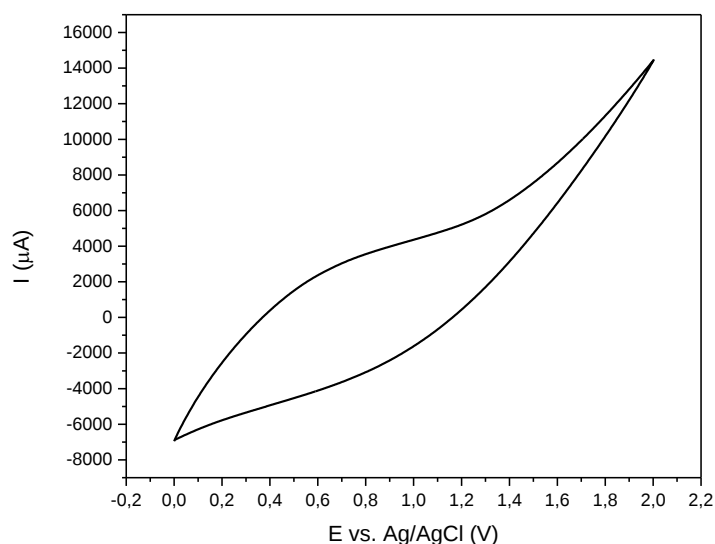


Figura 85. Voltamograma cíclico da eletrooxidação do [PEHA][Ac] na superfície de titânio modificado com carbono Vulcan.

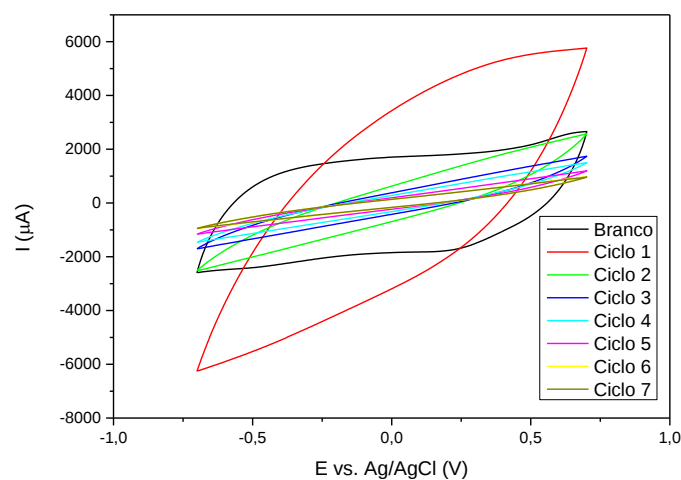


Figura 86. Resposta voltamétrica do eletrodo de titânio modificado (TiC) e 1º a 7º ciclos de deposição de catalase e [PEHA][Ac] em CV, tampão fosfato pH 7,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.