



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1101233-1 A2



* B R P I 1 1 0 1 2 3 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 23/03/2011
(43) Data da Publicação: 18/06/2013
(RPI 2215)

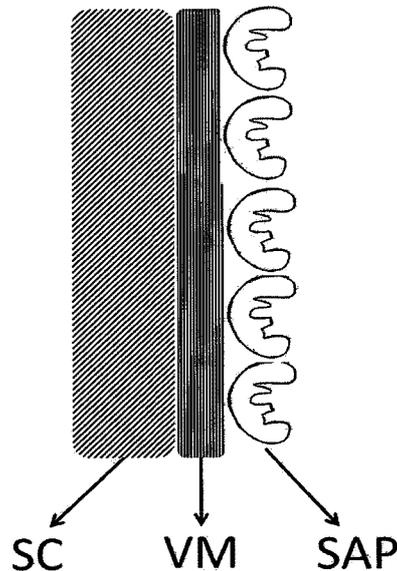
(51) Int.Cl.:
H01M 8/16
H01M 4/86
H01M 4/88
C25B 3/00

(54) Título: BIOANODO PARA BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL ETANOL/O₂ E PROCESSO PARA PREPARAR O MESMO

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): ADALGISA RODRIGUES DE ANDRADE, JULIANE CRISTINA FORTI, PIETRO CIANCAGLINI, SIDNEY DE AQUINO NETO, VALTENCIR ZUCOLOTTO

(57) Resumo: BIOANODO PARA BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL ETANOL/O₂ E PROCESSO PARA PREPARAR O MESMO. Nesta invenção, foi preparado e caracterizado um novo bioanodo para biocélulas a combustível etanol/O₂ utilizando-se o dendrímero PAMAM para imobilização da enzima ADH sobre superfície difusora de tecido de carbono. Os bioanodos foram preparados utilizando-se a técnica de adsorção passiva enzima/dendrímero em um suporte de fibra de carbono (HT1400W, ELAT® GDL - BASF) de 1cm² utilizando-se o corante verde de metileno como eletrocatalisador para a espécie NADH. As medidas de densidade de potência foram realizadas em uma célula de dois compartimentos separadas por uma membrana Nafion®. Após a imobilização, o sistema empregado provou ser estável e com densidade de potência gerada comparável aos demais bioanodos existentes no mercado. Os resultados obtidos mostram que o dendrímero PAMAM é um material muito atrativo para imobilização de enzimas e com grande potencial para aplicação em dispositivos comerciais.



BIOANODO PARA BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL ETANOL/O₂ E PROCESSO PARA PREPARAR O MESMO

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção se refere em geral à preparação de bioanodos para uso em biocélulas a combustível de etanol/O₂ e, em particular, a um bioanodo no qual é aplicada a imobilização da enzima álcool desidrogenase (ADH) empregando o dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) sobre superfície difusora de tecido de carbono.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Fatores principalmente econômicos e ambientais forçam a demanda por processos cada vez mais "limpos" e eficientes para a produção de energia. Nesse sentido observa-se um aumento contínuo nas pesquisas em todo o mundo na busca por fontes alternativas de energia.

O documento PCT/US2005/001827, publicado em 13/10/2005, "Microfluidic biofuel cell", trata de células a biocombustível microfluidicas compreendendo um bioanodo e/ou um biocátodo formadas usando princípios microfluídicos e litografia suave. As enzimas usadas nas reações redox no bioanodo e/ou no biocátodo são estabilizadas em uma estrutura micelar ou micelar invertida. A célula a biocombustível é usada para produzir altas densidades de potência. O referido documento revela imobilização de enzima (álcool desidrogenase entre elas) em bioanodo e biocátodo, porém, os materiais preferidos para a imobilização da enzima são diferentes do material usado na presente invenção.

Há no estado da técnica algumas publicações sobre aplicação de dendrímero, porém, nessas publicações a enzima é imobilizada sobre ouro e na presente invenção a enzima e o dendrímero PAMAM estão suportados sobre suporte de carbono acrescido de um filme orgânico formado a partir do corante verde de metileno. Esta formação é inédita.

O documento US 6.531.239, publicado em 11/03/2003, "Biological fuel cell and methods", trata de uma célula a combustível que tem um anodo e um catodo com enzima de anodo disposta no anodo e enzima de catodo disposta no catodo. O anodo é configurado e disposto para eletro-oxidar um redutor de anodo na presença da enzima de anodo. Da mesma maneira, o catodo é configurado e disposto para eletroreduzir um oxidante de catodo na presença da enzima de catodo. Além disso, o hidrogel redox do anodo pode ser disposto no anodo para transmitir uma corrente entre o anodo e a enzima de anodo e o hidrogel redox do catodo pode ser disposto no catodo para transmitir uma corrente entre o catodo e a enzima do catodo. Este documento revela especificamente outros materiais e sistemas para efetuar a imobilização da enzima (que pode ser álcool desidrogenase).

OBJETO DA INVENÇÃO

É um objetivo da presente invenção proporcionar um novo bioanodo para biocélulas a combustível etanol/O₂, cujo bioanodo utiliza o dendrímero PAMAM para imobilizar a enzima álcool desidrogenase (ADH) sobre superfície difusora de tecido de carbono.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática de uma biocélula a combustível primária.

A Figura 2 é uma representação da arquitetura utilizada na preparação do bioanodo da presente invenção.

A Figura 3 é uma representação da cela utilizada para as medidas de densidade de potência da biocélula da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção será agora descrita em detalhes com referências às figuras em anexo sem, contudo, limitar a presente invenção ao que é revelado no presente relatório.

As células a combustível biológicas, ou biocélulas a combustível, são definidas como células a combustível nas quais a atividade da célula (ou parte dela) se deve à atuação de uma catálise enzimática. Também é possível definir as biocélulas a combustível como um sistema capaz de transformar diretamente energia química em elétrica por meio de reações que envolvem etapas bioquímicas. [Palmore et. al., 1998]. Basicamente, o funcionamento de uma célula a combustível envolve reações de oxidação de um combustível no anodo e redução no catodo as quais promovem, então, como consequência da liberação de elétrons provenientes da oxidação, um fluxo de elétrons até o catodo por um circuito externo que resulta, então, em trabalho elétrico.

Na Figura 1 é apresentado o funcionamento básico de uma biocélula a combustível primária ou direta; similar a uma célula a combustível do tipo membrana de troca de prótons (PEM). Neste tipo de célula, os biocatalisadores são envolvidos diretamente nas reações de oxidação e redução para gerar eletricidade. O combustível CO é oxidado enzimaticamente no anodo (A) produzindo prótons e elétrons, enquanto que no catodo (C) outra enzima reduz o oxidante (geralmente O₂), o produto formado reage com os prótons e elétrons gerando água.

Alternativamente às células que utilizam catalisadores metálicos, as biocélulas a combustível possuem a grande vantagem de operar em temperaturas mais brandas (20 a 40°C). Essa é uma grande vantagem frente às células a combustível tradicionais que operam em temperaturas superiores a no mínimo 80°C. Estas propriedades fazem com

que as biocélulas a combustível sejam cada vez mais objeto de estudo para aplicação onde a obtenção de temperaturas elevadas é difícil. Além disso, enzimas são bastante específicas e catalisam diferentes tipos de reações e portanto, é possível a utilização de diversos tipos de combustíveis podemos citar entre eles: álcoois, açúcares, ácido lático, glicerol etc.

Fator chave nas biocélulas a combustível são as transferências de elétrons entre o sítio reativo da enzima e a superfície do eletrodo. O ponto fundamental para a eficiência ou não de uma biocélula a combustível está ligado à velocidade da transferência de elétrons, sendo que o melhor desempenho das biocélulas a combustível dependerá da facilidade desta transferência.

Um dos maiores obstáculos para se obter uma biocélula a combustível eficiente é a estabilidade que é medida pelo tempo de vida dos bioanodos. Sendo assim, a busca por metodologias de imobilização que aumentem a estabilidade dos bioanodos é de grande interesse de diversos pesquisadores.

A imobilização da enzima com a membrana polimérica na superfície do eletrodo tem por objetivo aumentar o tempo de vida da enzima, além de obter uma camada mecânica e quimicamente estável sem formar uma região capacitiva na superfície do eletrodo. Para se obter uma maior estabilidade é de crucial importância que seja garantido um ambiente adequado para que a enzima resista às mudanças bruscas de temperatura, pH e composição da solução, as quais frequentemente desnaturam ou inativam as mesmas.

A escolha adequada do processo de imobilização empregado no ancoramento da enzima na superfície do eletrodo é de grande importância, pois afeta diretamente o tempo de vida da enzima imobilizada [Jungbae et al., 2006]. Diversas técnicas de imobilização enzimática vêm sendo utilizadas na literatura. Dentre elas, destaca-se a membrana Nafion® tratada com brometo de tetrabutilamônio [Akers et al., 2005]; utilização de polímeros redox [Heller, A., 1992], encapsulamento dentro de uma matriz sol-gel [Lim et al., 2007], entre outras.

Diversos são os atrativos quanto ao uso das biocélulas a combustível, seja atuando em métodos de bioremediação [Kim et al., 2009], sensores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) [Heller, A., 1992], além do grande potencial de uso como bateria. Diversos trabalhos visam tanto o uso in vivo destas células (para um futuro uso em sensores para diabetes, aparelho marca passo etc.) além de aplicações ex vivo (que mostram grande potencial para num futuro próximo talvez até substituir baterias de baixa potência utilizadas em equipamentos eletrônicos, como os aparelhos celulares).

Os principais desafios a serem vencidos no desenvolvimento das biocélulas a

combustível que utilizam a catálise enzimática, para uma futura utilização comercial, estão relacionados ao tempo de vida e custo dessas enzimas além dos problemas relacionados à transferência de elétrons entre sítio ativo e a superfície do eletrodo.

5 O dendrímero PAMAM representa uma classe de polímeros monodispersos ramificados, que possuem grande uniformidade, estreita distribuição de peso molecular e uma superfície terminal altamente funcionalizada. Devido a suas características estruturais e de adsorção, este material tem sido explorado na produção de filmes em multicamadas, utilizados como sensores na detecção de diferentes compostos (Tomalia et al., 1990).

10 Na presente invenção, foi preparado e caracterizado um novo bioanodo para biocélulas a combustível etanol/O₂ utilizando-se o dendrímero PAMAM para imobilização da enzima ADH em tecido de carbono.

Procedimento de preparação dos bioanodos.

15 Os bioanodos foram preparados utilizando-se a técnica de adsorção passiva enzima/dendrímero em um suporte de fibra de carbono, SC (HT1400W, ELAT[®] GDL – BASF) de 1 cm² utilizando-se o corante verde de metileno (VM) como eletrocatalisador para a espécie NADH. Inicialmente, foram realizados estudos de cinética enzimática da enzima imobilizada no bioanodo e a seguir, os ensaios de potência foram realizados em uma célula de dois compartimentos separadas por uma membrana Nafion[®].

20 Após a imobilização, o sistema empregado provou ser estável e com densidade de potência gerada comparável aos demais bioanodos existentes no mercado. Os resultados obtidos mostram que o dendrímero PAMAM é um material muito atrativo para imobilização de enzimas e com grande potencial para aplicação em dispositivos comerciais.

25 O processo para se obter a presente invenção é realizado em duas etapas. Inicialmente, anterior à imobilização enzimática, um filme estável de verde de metileno é polimerizado na superfície do suporte de carbono submetendo o eletrodo a 12 ciclos voltamétricos no intervalo de -0,3 a +1,3 V tendo como referência eletrodo de prata/cloreto de prata, a 50 mV s (-0,3 a +1,3 V vs Ag/AgCl, a 50 mV s⁻¹) em uma solução contendo verde de metileno 4 10⁻⁴ mol L⁻¹, nitrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e tetraborato de sódio anidro 10⁻² mol L⁻¹. Uma vez finalizada a eletropolimerização, os eletrodos são lavados com água deionizada, secos em N₂ e deixados por 24 horas em dessecador.

35 Posteriormente, a imobilização enzimática é realizada mediante adsorção passiva da solução enzima/dendrímero. As soluções ADH/PAMAM (SAP) foram preparadas na razão 1:2 em meio de 1.9 mmol L⁻¹ de NAD⁺, mantendo o volume final em 600 µL em tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ (pH 7,2). Após homogeneização, 50 µL desta solução foram

adicionados diretamente na superfície do suporte, mantendo a quantidade de enzima em 28 U, seguido de secagem por 24 h. A Figura 2 apresenta a estrutura final do bioanodo preparado.

As medidas de densidade de potência do bioanodo B da presente invenção foram realizadas em uma célula de dois compartimentos contendo solução S separadas por uma membrana Nafion[®], NF, similar à descrita por Moehlenbrock and Minteer, 2008. Uma membrana de difusão gasosa SC (ELAT) composta de 20% Pt em C (E-TEK) prensada a quente foi utilizada como material catódico, sendo mantido em contato direto com o ar A (Figura 3).

As concentrações da espécie NAD⁺ e o combustível etanol foram mantidas em 1,9 mmol L⁻¹, e 100 mmol L⁻¹ para um volume final de solução de 10 mL em meio de tampão fosfato. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) em um potenciostato/galvanostato modelo 273A – PAR. Os valores de potencial de circuito aberto (PCA) foram medidos por 1 hora e os voltamogramas lineares foram feitos a 1 mV s⁻¹, a partir destes dados foram obtidos os valores de densidade de potência.

Para avaliar a estabilidade dos bioanodos preparados, foram feitas medidas de densidade de potência por um período de 90 dias, utilizando-se a mesma amostra de bioanodo. Os eletrodos foram mantidos refrigerados em solução tampão por um período de pelo menos 1 semana antes de outro teste. Para avaliar a estabilidade dos bioanodos preparados em experimentos de cronoamperometria, foram realizadas eletrólises aplicando-se 0,3 V (próximo ao potencial de oxidação da espécie NAD⁺) durante 14 h.

Fator crítico para uma boa eficiência das biocélulas a combustível é a densidade de potência, a qual é obtida pela potência gerada em função da área do eletrodo ou volume da célula (P_{cel}/A). Nesse sentido, a melhor maneira de comparar o invento obtido com resultados já apresentados na literatura é a comparação entre os valores de densidade de potência obtidos. A Tabela 1 apresenta os mais recentes resultados em termos de densidade de potência obtidos na literatura [Aquino Neto, et al.; 2010].

Tabela 1: Resumo dos últimos resultados obtidos em biocélulas a combustível enzimáticas

Metodologia de imobilização	Substrato	Sistema enzimático	P gerada / mW cm ⁻²	Referência
Membrana Nafion [®] modificada	Etanol/O ₂	Álcool desidrogenase/bilirrubina oxidase	0,46	Topcagic e Minteer, 2006
Matriz sol-gel/ nanotubo de C	Glicose/O ₂	Glicose oxidase e bilirrubina oxidase	0,12	Lim <i>et al.</i> , 2007

Quitosana modificada	Glicose	Glicose desidrogenase	0,035	Klotzbach <i>et al.</i> , 2008
Glutaraldeido	Etanol	Quino-hemoproteina- Álcool desidrogenase	0,0015	Ramanavicius <i>et al.</i> , 2008
Membrana Nafion® modificada	Etanol	Enzimas desidrogenases em cascata	1,01	Sokic-Lazic and Minteer, 2008
Filme de polipirrol	Glicose/O ₂	Glicose desidrogenase /lacase	0,042	Habrioux <i>et al.</i> , 2008
Membrana Nafion® modificada	Piruvato	Enzimas desidrogenase em cascata	0,93	Sokic-Lazic e Minteer, 2009
Sal de poliacrilato de sódio	Glicose/O ₂	Glicose desidrogenase/ Bilirrubina oxidase	1,45	Sakai <i>et al.</i> , 2009
Polímero condutor / 3-metiltiofeno	Glicose/O ₂	Glicose oxidase/ Bilirrubina oxidase	0,15	Kuwahara <i>et al.</i> , 2009
Celulose em matriz de nanotubo de C	Frutose/ O ₂	D-frutose desidrogenase/ Bilirrubina oxidase	0,12	Wu <i>et al.</i> , 2009
Eletrodo do tipo "Ketjenblack"	Glicose	Glicose desidrogenase	0,052	Miyake <i>et al.</i> , 2009
Pirroquinolina em eletrodos de ouro	Lactato	Lactato desidrogenase	0,14	Lee <i>et al.</i> , 2009
Nanopartículas de silicone	Glicose	Glicose desidrogenase	0,0037	Choi <i>et al.</i> , 2009
Dendrímero PAMAM	Etanol	Álcool desidrogenase	0,28	Presente invenção

Referências

- Akers, N.L., Moore, C.M., Minteer, S.D., 2005. *Electrochim. Acta.* 50, 2521-2525.
- Aquino Neto, S., Forti, J.C., De Andrade, A.R., *Electrocatal.* (2010), doi:10.1007/s12678-010-0013-2.
- 5 Heller, A., 1992. *J. Phys. Chem.* 96 (9) 3579 - 3587.
- Jungbae, K., Hongfei, J., Wang, P., 2006. *Biotechnol. Adv.* 24, 296-308.
- Kim, S.W., 2009. *J. Mol. Catalysis. B: Enzym.* 59, 274-278.
- Lim, J., Malati, P., Bonet, F., Dunn, B., 2007. *J. Electrochem. Soc.* 154, 140-145.
- Moehlenbrock, M.J., Minteer, S.D., 2008. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1188-1196.
- 10 Palmore, G.T.R., Bertschy, H., Bergens, S.H., Whitesides, G.M., 1998. *J. Electroanal. Chem.* 443, 155-161.
- Tomalia, D.A., Naylor, A.M. Goddard III, W.A., 1990. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 138-175.

REIVINDICAÇÕES

1. Bioanodo para biocélulas a combustível etanol/O₂, tendo enzima imobilizada sobre substrato, caracterizado por compreender:

5 um suporte de carbono tendo na sua superfície um filme estável eletrocatalisador e, sobre o referido filme estável eletrocatalisador, uma camada passiva de enzima/agente imobilizador.

2. Bioanodo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o eletrocatalisador ser o corante verde de metileno.

10 3. Bioanodo, de acordo com reivindicação 1, caracterizado por o agente imobilizador ser poliamidoamina (PAMAM).

4. Bioanodo, de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo por a enzima ser álcool desidrogenase imobilizada.

5. Processo para preparar bioanodo para biocélulas a combustível etanol/O₂, caracterizado por compreender as etapas de:

15 proporcionar um substrato de filme de carbono;

polimerizar um filme estável de eletrocatalisador na superfície do suporte de filme de carbono, antes da etapa de imobilização enzimática, submetendo o suporte de filme de carbono a ciclos voltamétricos em uma solução contendo eletrocatalisador;

20 lavar os anodos com água deionizada, secar em N₂ e deixar por 24 horas em um dessecador, uma vez finalizada a referida etapa de polimerização;

realizar a imobilização enzimática no suporte de filme de carbono com eletrocatalisador mediante adsorção passiva da solução enzima/dendrímero.

25 6. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o suporte de filme de carbono ser submetendo a 12 ciclos voltamétricos no intervalo de -0,3 a +1,3 V tendo como referência eletrodo de prata/cloreto de prata, a 50 mV s.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a solução contendo eletrocatalisador conter verde de metileno $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, nitrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tetraborato de sódio anidro $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

30 8. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por na adsorção passiva a solução enzima/dendrímero compreender solução de enzima álcool desidrogenase (ADH)/poliamidoamina (PAMAM) preparada na razão 1:2 em meio de 1.9 mmol L^{-1} de NAD⁺, mantendo o volume final em 600 µL em tampão fosfato 100 mmol L^{-1} (pH 7,2).

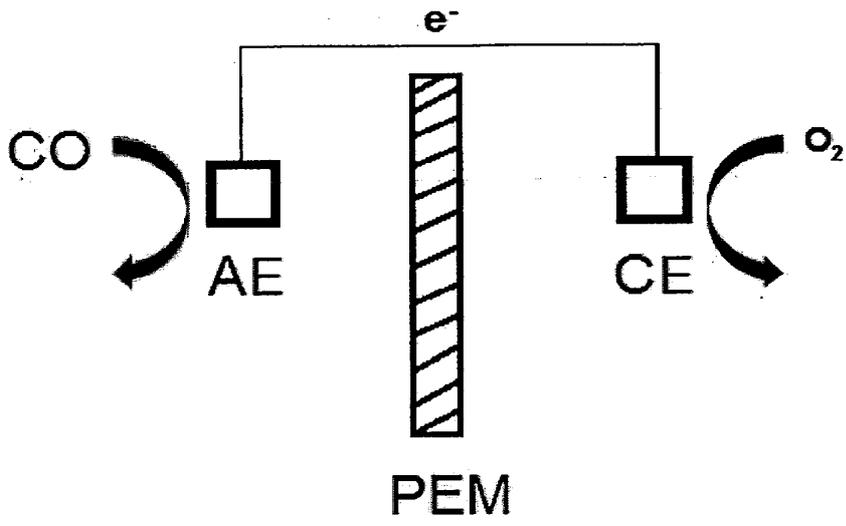


Fig. 1

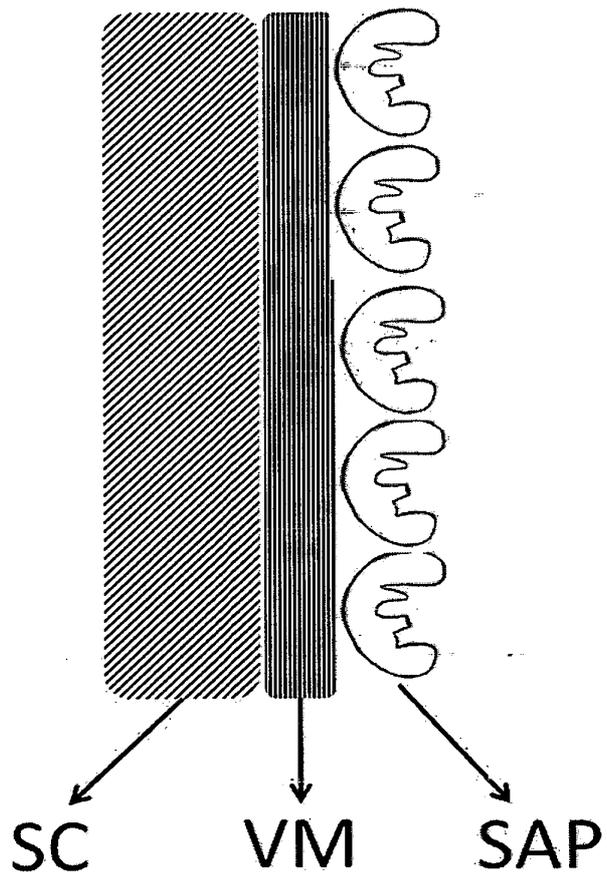


Fig. 2

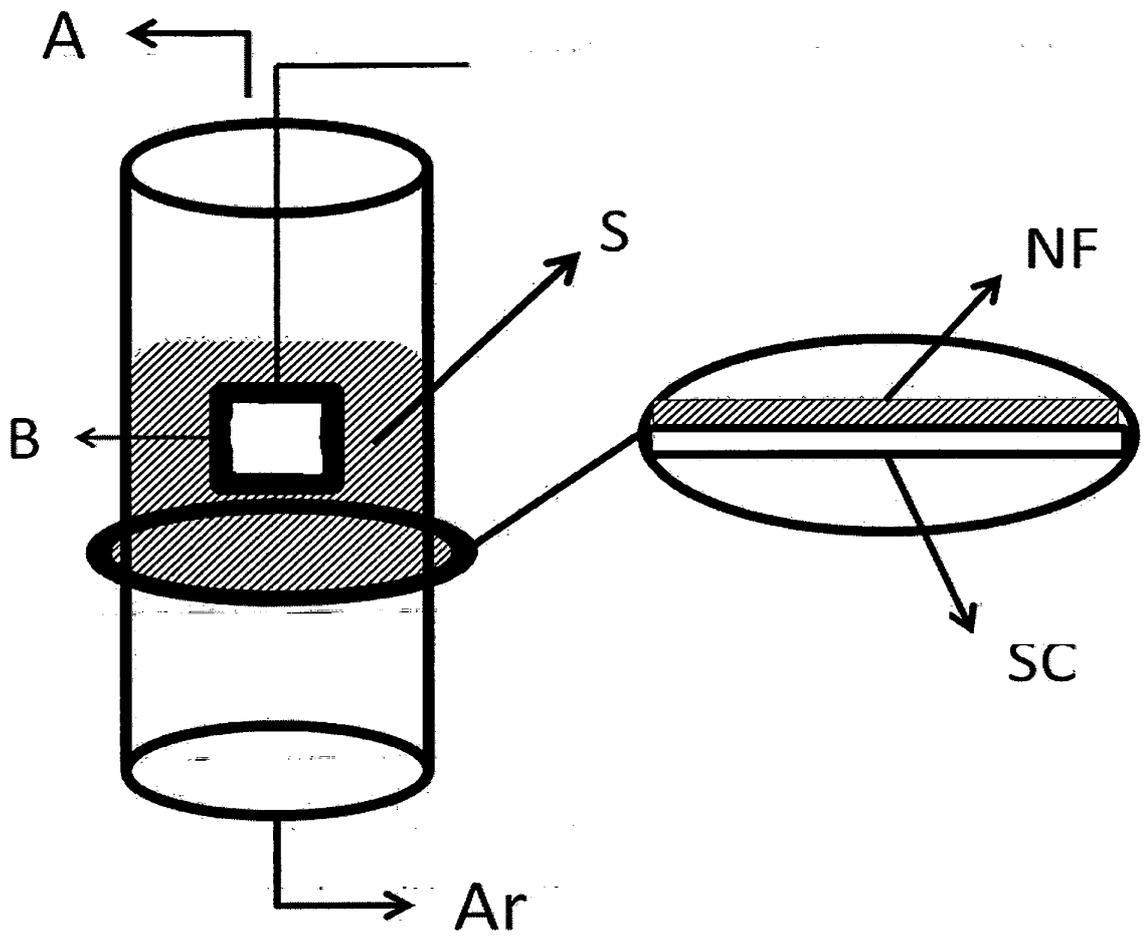


Fig. 3

RESUMO
BIOANODO PARA BIOCÉLULAS À COMBUSTÍVEL ETANOL/O₂ E PROCESSO
PARA PREPARAR O MESMO

Nesta invenção, foi preparado e caracterizado um novo bioanodo para biocélulas a combustível etanol/O₂ utilizando-se o dendrímero PAMAM para imobilização da enzima ADH sobre superfície difusora de tecido de carbono. Os bioanodos foram preparados utilizando-se a técnica de adsorção passiva enzima/dendrímero em um suporte de fibra de carbono (HT1400W, ELAT[®] GDL – BASF) de 1 cm² utilizando-se o corante verde de metileno como eletrocatalisador para a espécie NADH. As medidas de densidade de potência foram realizadas em uma célula de dois compartimentos separadas por uma membrana Nafion[®]. Após a imobilização, o sistema empregado provou ser estável e com densidade de potência gerada comparável aos demais bioanodos existentes no mercado. Os resultados obtidos mostram que o dendrímero PAMAM é um material muito atrativo para imobilização de enzimas e com grande potencial para aplicação em dispositivos comerciais.