CAIO CÉSAR GONÇALVES SILVA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE W/WO_3 MODIFICADOS COM FILMES DE POLIDOPAMINA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE CLOROPLASTOS VISANDO APLICAÇÕES EM SISTEMAS FOTOBIOELETROQUIMICOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: prof. Dr. Saulo Santesso Garrido
Co-Orientadora: profa. Dra. Maria Valnice Boldrin

Araraquara-SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Caio César Gonçalves
S586s Síntese e caracterização de eletrodos de W/WO_3 modificados com filmes de polidopamina para a imobilização de cloroplastos intactos visando aplicações em sistemas fotobioeletroquímicos / Caio César Gonçalves Silva. – Araraquara : [s.n.], 2021
80 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Saulo Santesso Garrido
Coorientador: Maria Valnice Boldrin

1. Bioeletroquímica. 2. Semicondutores. 3. Eletroquímica. 4. Biotecnologia. 5. Fotossíntese. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE W/WO_3 MODIFICADOS COM FILMES DE POLIDOPAMINA COMO PLATAFORMA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE CLOROPLASTOS INTACTOS VISANDO APLICAÇÕES EM SISTEMAS FOTOBIOELETROQUIMICOS"

AUTOR: CAIO CÉSAR GONÇALVES SILVA
ORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO
COORIENTADORA: MARIA VALNICE BOLDRIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dra. LILIAN DANIELLE DE MOURA TORQUATO (Participaçao Virtual)
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. DIEGO LEONI FRANCO (Participaçao Virtual)
Laboratório de Eletroanalítica Aplicada a Biotecnologia e a Engenharia de Alimentos (LEABE) / Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Patos de Minas

Araraquara, 03 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Caio César Gonçalves Silva

Nascimento: 31/01/1995

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Taguatinga Do Norte- DF- Brasil

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Nelson Pereira da Silva e Vanilde Pereira Gonçalves Silva

E-mail: ccg.silva@unesp.br / caiocesarsilva201473@gmail.com

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55 Bairro: Quitandinha. CEP: 14800-060 Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Biotecnologia

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 04/2019 – 09/2021

Título da dissertação: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE W/WO_3 MODIFICADOS COM FILME DE POLIDOPAMINA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE CLOROPLASTOS VISANDO APLICAÇÕES EM SISTEMAS FOTOBIOELETROQUIMICOS

Orientador: Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin

Bolsa: CAPES

Graduação em Biotecnologia

UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Campus - Patos de Minas, Patos de Minas/MG

Período: 2013-2 / 2018-2
Título do trabalho de conclusão de curso: Polished silver solid amalgam electrodes in eletroanalytical determination of carbamates pesticides: The methomyl case.
Orientadora: Djenaine De Souza.

3. TRABALHOS PUBLICADOS

SILVA, C. C. G., SOUZA, Djenaine de. Polished silver solid amalgam electrode and cationic surfactant as tool in electroanalytical determination of methomyl pesticide. **Talanta**, v. 189, p. 389-396, nov. 2018.

FILHO, D. G.; **SILVA, C. C. G.;** SOUZA, D. D. Pesticides determination in foods and natural waters using solid amalgam-based electrodes: challenges and trends. **Talanta**, v. 212, p. 120756, maio 2020.

SILVA, C.C.G., SILVA, L.M., SILVA, B.C., GARRIDO, S.S, ZANONI, M.V.B e SOUZA, D. D. Cathodic stripping voltammetric determination of β-cyfluthrin, a pyrethroid insecticide, using polished silver solid amalgam electrode. **Journal of Solid State Electrochem** v 24**,** p. 1819–1826, março 2020.

4. Participação em eventos científicos:

SILVA, C.C.G.; GARRIDO, S.S e ZANONI, M.V.B "Construção de biossensor fotoeletroquímico baseados em fotossistema 1, enzima fotossintética, visando o monitoramento e a conversão de CO_2 em produtos economicamente viáveis. " In: III Workshop INCT DATREM,2020, Araraquara-SP.

SILVA, C.C.G.; SILVA, L.M.; ZANONI, M.V.B. e SOUZA, D. D "Electrochemical sensor for β-cyfluthrin, a pyrethroid insecticide, by cathodic stripping voltammetry at p-AgSAE electrode". In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXII SIBEE, 2019, Ribeirão Preto-SP.

SILVA, C. C. G.; MARTINS, F.C.O.L. e SOUZA, D. D. " Estudo do mecanismo redox e determinação eletroanalitica do pesticida metomil em alimentos in-natura. " In: 19º Encontro Nacional de Quimica Analitica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica,2018, Caldas Novas-GO.

GONÇALVES, L. M.; **SILVA, C. C. G.** e SOUZA, D. D. "Electroanalytical methodology for the simultaneous analysis of Pb+2 and Cd+2 ions using p-AgSAE". In: XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- XXXI ERSBQ, 2018, Juiz de Fora-MG.

SILVA, C.C.G.; e SOUZA, D. D "Metodologia eletroanalítica para a quantificação do pesticida metomil em amostras ambientais". In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXI SIBEE, 2017, Natal-RN.

PAULA, M. Jr.; **SILVA, C. C. G**. e SOUZA, D. D. " Determinação eletroanalítica de bht, antioxidante sintético, em amostras alimentícias". In: 1º Workshop em Engenharia de Alimentos- "Ciência e Tecnologia de alimentos: um benefício para a região do Alto Paranaíba",2017, Patos de Minas-MG.

GONÇALVES, L. M.; SOARES, M. G.; **SILVA, C. C. G.** e SOUZA, D. D. "Uso de p-AgSAE para a detecção de metais pesados: o caso do Pb^{+2}". In: 1º Workshop em Engenharia de Alimentos- "Ciência e Tecnologia de alimentos: um benefício para a região do Alto Paranaíba",2017, Patos de Minas-MG.

SILVA, C.C.G.; e SOUZA, D. D "Determinação Eletroanalítica de metomil em amostras complexas". In: 2º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial- 2º ENQ-BIOTEC, 2017, Ribeirão Preto-SP.

SILVA, C.C.G.; e SOUZA, D. D "Avaliação do mecanismo redox e determinação eletroanalítica do pesticida metomil". In: XXXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- XXXI ERSBQ, 2017, Itajubá-MG.

GONÇALVES, L. M.; SOARES, M. G.; **SILVA, C. C. G.** e SOUZA, D. D. “Metodologia eletroanalítica para detecção de Pb^{+2} empregando-se p-AgSAE”. In: XXXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- XXXI ERSBQ, 2017, Itajubá-MG.

SOARES, M. G.; GONÇALVES, L. M.; **SILVA, C. C. G.** e SOUZA, D. D. “ O uso do eletrodo sólido de amálgama de prata na quantificação de íons metálicos: O caso do íon Cd^{+2}”. In: XXXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- XXXI ERSBQ, 2017, Itajubá-MG.

PAULA, M. Jr.; **SILVA, C. C. G**. e SOUZA, D. D. “Uso de eletrodo sólido de amálgama de prata na determinação analítica de antioxidante em alimentos. ” In: XXXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- XXXI ERSBQ, 2017, Itajubá-MG.

SILVA, C. C. G. e SOUZA, D. D. “Detecção e quantificação do pesticida metomil em amostras de sistemas ambientais e alimentícios”. In: 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência ,2016, Patos de Minas-MG.

SILVA, C. C. G. e SOUZA, D. D. “Identificação e quantificaçãodo pesticida fenpropimorfe, desregulador endócrino, em amostras de alimentos e águas naturais”. In: 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência, 2016, Patos de Minas-MG.

SILVA, C.C.G.; FILHO, D. G. e SOUZA, D. D “Detecção voltamétrica de pesticidas morfolínicos”. In: XXXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- XXX ERSBQ, 2016, Uberlândia-MG.

5. Outros:

2016 – 2017:

Bolsista de Iniciação científica:

Instituo de Química;

Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil;

Orientadora: Prof.ª Drª. Djenaine de Souza;

Bolsista da: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
Projeto: “Construção, caracterização e aplicação de eletrodos sólidos de amalgamas para estudos mecanísticos e determinação analítica de pesticidas promotores de desregulação endócrina. Aplicação em amostras de interesse ambiental”.

2017 – 2018:

Bolsista de Iniciação científica:
Instituo de Química;
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil;
Orientador: Prof. Dr. Diego Leoni Franco;
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
Projeto: “Modificação de eletrodos com ácido 4-mercaptofenilpropiônico para desenvolvimento de biossensores enzimáticos aplicados na área alimentícia”.

2018 - 2019:

Bolsista de Iniciação científica:
Instituto de Química;
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil;
Orientadora: Profª. Drª. Djenaine De Souza;
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
Projeto: “Utilização de eletrodos sólidos de amalgama de prata (p-AgSAE) na determinação eletroanalítica de contaminantes em hortifrutigranjeiros: Inseticidas piretróides”.

- Monitor da disciplina de Química Analítica nos cursos de graduação em Biotecnologia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Patos de Minas, no período de 10/10/2014 a 24/02/2015, perfazendo 12 horas semanais, sob a orientação da Professora Drª. Djenaine de Souza;

- Participou da organização, colaborou e ministrou um mini-curso no evento “Métodos eletroanalíticos para identificação e quantificação de moléculas de

interesse ambiental, biológico e industrial", na Universidade Federal de Uberlâdia- Campus de Patos de Minas, sob a coordenação da professora Drª. Djenaine De Souza, no período de 08/08/2018 a 10/08/2018.

- Bolsista no projeto "**Caminhando pela Bioquímica: Desenvolvimento e aplicação de metodologias pedagógicas para ensino de Bioquímica**", coordenado pelo professor Dr. Robson José de Oliveira Junior, promovido pelo Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia, vinculado ao programa 'PROSSIGA/PROCOR - Programa de Combate à Retenção e Evasão', realizado no período de 08/08/2016 a 30/11/2016;

- Participou como ouvinte do 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência (SimTeCi), UFU, 2014, Patos de Minas-MG.

- Participou do minicurso "METODOS ELETROANALÍTICOS APLICADO A ANALISE EM SISTEMAS ALIMENTÍCIOS, BIOLÓGICOS E AMBIENTAIS", Universidade Federal de Uberlândia- Campus de Patos de Minas, no período de 18 a 20 de março de 2015. (Carga horária12h)

- Realizou estágio extracurricular no Grupo De Eletroanalítica de Araraquara (GEAR), no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus de Araraquara, sob a orientação da professora Drª. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor no período de 20/03/2017 até 31/03/2017, com carga horária total de 80 horas de atividade.

- Realizou estágio extracurricular no Laboratório de Eletroanalítica Aplicado a Biotecnologia e a Engenharia de Alimentos (LEABE), Universidade Federal de Uberlâdia- Campus de Patos de Minas, sob a orientação da professora Drª. Djenaine De Souza no período de 01/08/2014 até 31/12/2014, com carga horária total de 240 horas de atividade.

- Participou curso de extensão universitária na modalidade difusão: 1ª Escola de Inverno em Química Analítica na Agricultura e no Ambiente, ocorrido

no Centro de Energia Nuclear na Agricultura- CENA/USP, na cidade de Piracicaba- SP, período do curso 12/07/2016 a 15/07/2016.

- Participou como membro da coordenadoria administrativa do Diretório Acadêmico “César Mansueto Giulio Lattes”, inscrito sob CNPJ de número 20.894.951/0001-69, no período de junho de 2014 a julho de 2015.

- Participou como voluntário do “**Treinamento de discentes para atividades do Programa Pomar**”, promovido pela Faculdade de Engenharia Química (FEQUI) da Universidade Federal de Uberlândia, vinculado ao programa “**Propostas de Desenvolvimento da Fruticultura e da Olericultura no Alto Paranaíba – POMAR**”, realizado no período de 09/04/2018 a 09/10/2018, sob a coordenação de Rodrigo Aparecido Moraes de Souza, com carga horária de 240 horas.

- Participou do curso de extensão online “Competências Profissionais, Emocionais e Tecnológicas para Tempos de Mudança”, no período de 24/08/2020 e 30/08/2020 com carga horária total de 4 horas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus pelo dom da vida, aos meus pais Nelson e Vanilde, aos meus irmãos Marcos e Fabíola e a minha tia Lúcia por todos os sacrifícios e apoio sempre.

“A persistência é o caminho do êxito.” (Charles Chaplin)

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” (Cora Coralina)

“Escrevo. E pronto.

Escrevo porque preciso,

preciso porque estou tonto...Eu escrevo apenas.

Tem que ter por quê?”

(Razão de ser, Paulo Leminski)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo cuidado, pela proteção, e por me abençoar todos os dias com um novo amanhecer dando-me força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria.

Aos meus pais, Vanilde e Nelson, aos meus irmãos Marcos e Fabíola, minha sobrinha Anna Clara e minha tia Lúcia sou infinitamente grato por todo sacrifício, apoio e cuidado que têm comigo. Vocês são minha força e fonte de inspiração. Amo vocês.

À minha família, pelo apoio, e por entender os momentos que eu não pude estar com vocês.

Ao Vitor, mais que amigo, sempre me apoiando em minhas escolhas. Obrigado pelo seu amor e carinho. Te amo. Obrigado também, a sua família por todo apoio e acolhimento.

Aos meus queridos amigos Daniele Freitas, Amanda Brandão, Octavio Augusto, Ailton Pereira, Carol Brasil e Leticia Schiavon, que apesar da distância física, sempre estão presentes, prontos para ouvir, me fazer sorrir e ajudar nos dias difíceis.

Aos amigos feitos no *power jump* que estarão sempre em meu coração, Iara, Renata, Juliana, Raquel, Fernanda, Nádia e Gabi.

Ao professor Doutor Saulo Santesso Garrido, pela paciência e pela disposição e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À professora Doutora Maria Valnice Boldrin, pela paciência na coorientação, colaboração, ensinamentos e discussões sempre pertinentes e instigantes, que levaram a execução deste trabalho.

Á professora Dra. Hideko Yamanaka e a Dra. Lilian Danielle de Moura Torquato pela avaliação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

A minha amiga e professora Dra. Djenaine de Souza por todo o apoio. minha grande tutora, obrigado por todas oportunidades, dedicação e ensinamentos, profissionais e pessoais, que levarei comigo por toda a minha vida.

Aos meus amigos do apartamento 81 Dara Baldi, Gustavo Oliveira, Vitor Becaro e Silvio Pereira que levarei eternamente em meu coração.

Aos meus amigos, Lucas Silva, Barbara Camila, Rafael Fonseca, Fabiana Sayão, Lilian Danielle e Kallyni Irikura Obrigado pela amizade construída, por todos os momentos de descontração, pelo suporte, e por toda a parceria. E a todos os colegas do GEAr pelas discussões científicas e momentos de descontração durante os cafés.

Agradeço aos funcionários da seção de Pós-Graduação do Instituto de Química por todo suporte dado durante o desenvolvimento do mestrado.

A todos os técnicos pelas análises realizadas e discussões dos resultados, bem como aos funcionários e servidores do Instituto de Química.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

Ao INCT-Datrem, processo 2014/50945-4, pelo suporte técnico proporcionado.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível. Muito obrigada!

RESUMO

As reações de transferência de elétrons impulsionadas pela luz na fotossíntese usualmente envolvem um complexo clorofila-proteína presente na membrana tilacóide, que apresentam várias aplicabilidades em processos eletrocatalíticos. Este projeto investigou a extração, caracterização e aplicação de uma solução rica em material fotossintético de folhas de espinafres para desenvolver sistemas de detecção fotobioeletroquímico. Inicialmente, investigou-se o comportamento eletroquímico do composto 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) usado como sonda redox sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Este estudo permitiu o desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica simples e rápida para a reação de Hill. Para isto, monitorou-se a diminuição do sinal voltamétrico de onda quadrada por meio da oxidação da sonda sobre eletrodo de carbono vítreo usando uma suspensão rica em material fotossintético na ausência e na presença de luz. Além disso, na segunda parte do projeto foi realizado os testes iniciais para a construção de um biossensor fotoeletroquimico utilizando a imobilização de material fotossintético extraídos de folhas de espinafre, *Spinacia oleracea,* sobre substrato semicondutor de trióxido de tungstênio (W/WO_3) como transdutor eletroquímico e como agente ancorante do material biológico, a polidopamina (PDA).

ABSTRACT

The light-driven electron transfer reactions in photosynthesis usually involve a chlorophyll-protein complex present in the thylakoid membrane, which has several applicability in electrocatalytic processes. This project investigated the extraction, characterization and application of a solution rich in photosynthetic material obtained from spinach leaves to develop photobioelectrochemical detection systems. Initially, he investigated the electrochemical behavior of the compound 2,6-dichlorophenolindophenol (DCFI) was investigated, using it as a redox probe on the surface of the glassy carbon electrode. From this study, a simple and fast methodology for the Hill reaction was developed, in which the square wave voltammetric signal was monitored from the oxidation of the DCFI redox probe immobilized on the surface of glassy carbon, in the absence and in the presence of light, using a suspension rich in photosynthetic material as electrolyte. For this, the decrease of the square wave voltametric signal was monitored through the oxidation of the probe on a glassy carbon electrode using a suspension rich in photosynthetic material in the absence and presence of light. In addition, in the second part of the project, tests were carried out for the construction of a photoelectrochemical biosensor using the immobilization of photosynthetic material extracted from spinach leaves, *Spinacia oleracea*, using the substrate of tungsten trioxide (W/WO_3) as an electrochemical transducer and polidopamine as anchoring agent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do organismo fotossintético oxigênico, uma planta **(A)**, a célula vegetal com suas respectivas organelas **(B)**, com o enfoque no cloroplasto **(C)**, mostrando a sua estrutura, onde em **(D)** membranas tilacóides em **(E)** o estroma..... 27
Figura 2: Cadeia transportadora de elétrons e prótons que ocorre na fotossíntese durante a fase clara. 28
Figura 3: Esquema do processo transferência de elétrons na superfície do eletrodo, por mecanismos de transferência direta de elétrons (TDE) e por meio de transferência mediada de elétrons (TME)..... 31
Figura 4: Ilustração do processo de isolamento de cloroplastos por meio de gradiente de percoll 40%..... 35
Figura 5: Formula estrutural do DCFI. 38
Figura 6: Ilustração de uma célula eletroquímica de três eletrodos. 39
Figura 7: (A) Espectro de absorção UV-visível do extrato contendo material fotossintético, mostrando a presença das bandas de absorção dos pigmentos fotossintéticos, em meio de acetona 80%. **(B)** SDS-PAGE do material fotossintético extraído de folhas de espinafre..... 44
Figura 8: Imagem de microscopia confocal de fluorescência dos cloroplastos intactos em solução com uma objetiva de 40x. 45
Figura 9: Curva de decaimento da absorbância do DCFI na presença do extrato contendo o material fotossintético na presença e na ausência da luz. 46
Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos para redução (A) e oxidação (B) de $1{,}0x10^{-4}$ mol L^{-1} de DCFI em tampão BR pH=7,0 sobre GCE, v=100 mV s^{-1}... 47
Figura 11: (A) Voltamogramas cíclicos de $1{,}0x10^{-4}$ mol L^{-1} de DCFI em 0,04 mol L^{-1} tampão BR pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mV.s^{-1}. **(B)** Relação entre a v e Ip com r: 0,9976. 48
Figura 12: Efeito do pH sobre os voltamogramas cíclico obtidos para oxidação $1x10^{-4}$ mol L^{-1} de DCFI em 0,04 mol L^{-1} de tampão BR pH 2 a 10 sobre GCE, v=100 mV $^{s-1}$. 49
Figura 13: Gráficos do efeito do pH sobre o potencial de pico anódico **(A)** e da corrente de pico **(B)** correspondentes aos voltamogramas da Figura 10. 50

Figura 14: Voltamogramas de VOQ 0,25 até 8,00 µmol L^{-1} de DCFI em 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7.2, os parâmetros utilizados foram a: 50mV, ∆Es: 2mV e f: 150 s^{-1} **(A)**. Curva de calibração construída com os dados da Figura 11A bem como a respectiva equação da reta **(B)**, com r=0,998. 52
Figura 15: Voltamogramas de onda quadrada na presença de 0,59 mmol L- 1 de DCFI em 0,1 mol L- 1 PBS pH 7.2 e material fotossintético, onde em (A) reação acontecendo no escuro e em (B) reação acontecendo no claro, onde em (a) medida realizada no momento em que adiciona o DCFI, (b) a medida após 1minuto de exposição a luz, (c) a medida após 2 minutos de exposição a luz, (d) a medida após 3minutos de exposição a luz, (e) a medida após 4 minutos de exposição a luz, (f) a medida após 5minutos de exposição a luz e (g) branco. Branco é a solução de 0,1mol L-1 de PBS + material fotossintético. 53
Figura 16:(A) Esquema proposto para o mecanismo de transferência de elétrons das membranas tilacóides (suspensas em solução) para o GCE por meio dos complexos proteicos diferentes, por exemplo, FTI, PQ, Citb6f, Ptc, FTI e Fdx. Para simplificação, outros componentes das membranas tilacóides não são mostrados. (B) Reação de redução química do DCFI na presença dos complexos fotossintéticos e luz. 55
Figura 17: Difratogramas de Raios-X obtidos para a placa de W e após a formação do filme de WO_3 em meio de NH_4F 0,7% com Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1}, aplicando-se 40 V por um período de 15 minutos. 56
Figura 18: Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) da placa de W, com magnificação de 25,000x **(A)**, eletrodos de W/WO_3 preparados por anodização em meio de NH4F 0,7% e Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1}, 40 V, 15 minutos 25,000x **(B)**, filme de WO_3 com magnificação de 50,000x **(C)** e histograma de distribuição de tamanho dos poros **(D)**. 57
Figura **19:**Imagem de microscopia eletrônica de alta eficiência com o respectivo resultado das análises de EDS da região escolhida da placa de W **(A)** e do eletrodo após a formação do filme de WO_3 **(B)**. 58
Figura 20: Curva de reflectância difusa obtida para o eletrodo de W/WO_3 **(A).** Gráfico de Tauc construído para o cálculo do band gap do eletrodo de W/WO_3 obtido **(B)**. 59
Figura 21: Espectros de emissão dos dispositivos **(A)** LED-1 e **(B)** LED-2. ... 59

Figura 22: Curvas de Fotocorrentes vs potencial geradas sobre eletrodo de W/WO_3 em 0,1 mol L^{-1} de PBS pH 7,0 no escuro e irradiados pelo sistema de LEDS e. v= 10mV s^{-1}..... 60
Figura 23: Fotocorrentes obtidas pelo eletrodo de W/WO_3 em diferentes eletrólitos de suporte **(A)** Na_2SO_4 0,1 mol L-1 (curva verde) e **(B)** PBS 0,1 mol L^{-1} (curva azul) ambos em pH 7,0. Apli-cando potencial de +0,25V e +0,80V. ... 61
Figura 24: Reação de polimerização da dopamina. 62
Figura 25: Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) do eletrodo de W/WO3 modificados com filmes de PDA em diversos tempos de polimerização **(A)** filme de 2 horas, **(B)** filme de 4 horas e **(C)** filme de 6 horas. Onde **(A.1, B.1, C.1)** são magnificações de 25,000x e **(A.2, B.2, C.2)** são magnificações de 50,000x..... 63
Figura 26: Diagramas de Nyquist obtidos **(A)** com eletrodo de W/WO3 sem modificação e modificado com a PDA em diferentes tempos, **(B)** 2 horas, **(C)** 4 horas e **(D)** 6 horas. Medidas realizadas em meio de ferricianeto de potássio $5,0x10^{-3}$mol L^{-1} preparada em 0,5 mol L^{-1} de KCl. 64
Figura 27: Fotocorrentes geradas em **(A)** eletrodo de W/WO3 sem modificação, **(B)** W/WO3-PDA2h, **(C)** W/WO3-PDA4h e **(D)** W/WO3-PDA6h. Utilizando voltametria de varredura linear com v= 10mV s-1 em meio de 0,1 mol L-1 PBS pH 7,0. 65
Figura 28: Mapeamento elementar do eletrodo de WO_3/PDA-4h. 66
Figura 29: Fotocorrentes obtidas em **(A)** eletrodo de W/WO_3, **(B)** WO_3-PDA4h em meio de 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0. 67
Figura 30: Fotocorrentes obtidas em **(A)** eletrodo de W/WO_3, **(B)** WO_3/PDA e em **(C)** WO_3/PDA/Cloroplastos em meio de 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 aplicando E=+0,25V. 68
Figura 31: (A) A relação da fotocorrente em diferentes concentrações de cloroplastos. **(B)** E relação da fotocorrente em diferentes tempos de imobilização. As medidas foram realizadas em meio de PBS 0,1 mol L-1 em pH 7,0 aplicando E=+0,25V. 69
Figura 32: Imagens de microscopia confocal de fluorescência, onde em **(A)** eletrodo de WO_3, em **(B)** eletrodo de WO_3/PDA e em **(C)** eletrodo de

WO_3/PDA/Cloroplastos. Utilizando uma objetiva de 40x com imersão em óleo. 71
Figura 33: Comparação da geração de fotocorrente mediada nas etapas de montagem do dispositivo fotobioeletroquímico, WO_3 (preto), WO_3/PDA (vermelho), WO_3/PDA/Clp (verde) e WO_3/PDA/Clp/ DCFI (azul) na presença de 60μM de DCFI dissolvido no eletrólito. Condições: eletrólito, 0,1mol L-1 PBS pH 7,0 e E= +0,25V. Onde Clp= cloroplastos e sob iluminação de LED-2 (395nm). 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$K_3[Fe(CN)_6]^{-3}$: Ferricianeto de Potássio

ATP: Adenosina trifosfato

CdTe: Telureto de cadmio

CH_2O: carboidratos

$Citb_6f$: Citocromo b_6f

CSSC: Células solares sensibilizadas por corante

CuInSe\Ga: Seleneto de cobre, índio e gálio

DCFI: 2,6-diclorofenolindofenol

DRX: Difração de Raios-X

e^-: Elétron

EDS: (do inglês *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*)

EIS: Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*)

Fdx: Ferredoxina

Fe_2O_3: Hematita

FEG-SEM: Microscópio eletrônico de varredura com campo de emissão

FNR: Ferredoxina–NADP+ redutase

FTI: Fotossistema 1

FTII: Fotossistema 2

GCE: Eletrodo de carbono vítreo (do inglês *Gassy Carbono Electrode*)

H^+: Próton

LED: Diodo emissor de luz (do inglês *Light-Emitting Diode*)

LHC: Complexo de coleta de luz (do inglês *Light-Harvesting Complex*)

N_2O: Óxido nitroso

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

O_3: Ozônio

OPV: Fotovoltaica orgânica (do inglês *Organic Photovoltaic*)

PBS: tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffer Solution*)

PDA: Polidopamina

PQ: Plastoquinona na forma oxidada

PQH_2: Plastoquinona na forma reduzida

Ptc: Plastocianina

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

TDE: Transferencia direta de elétrons

TiO_2: Dióxido de titânio

TME: Transferencia mediada de elétrons

TW: Terawatt

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta- visível

VOQ: Voltametria de onda quadrada

W: Tungstênio

WO_3: Trióxido de tungstênio

ZnO: Óxido de zinco

Φ: Ângulo de Fase

SUMÁRIO

1. Introdução 25

2. Objetivos 33

3. Material e Métodos 34

3.1. Obtenção do material fotossintético 34

3.2. Determinação da concentração de clorofila 35

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 36

3.3.1. Preparo do gel de resolução 36

3.3.2. Preparo do gel de empacotamento (*stacking gel*) 4,5% 36

3.3.3. Processo de eletroforese 37

3.3.4. Revelação do gel 37

3.4. Teste de atividade do material fotossintético (Reação de Hill) 37

3.5. Construção do biossensor fotoeletroquímico 39

3.5.1. Preparo do eletrodo de W/WO_3 39

3.5.2. Modificação do eletrodo de W/WO_3 com filme polimérico de polidopamina 40

3.5.3. Modificação do eletrodo de WO_3/PDA com os cloroplastos 40

3.6. Medidas fotoeletroquímicas 41

3.7. Caracterização do eletrodo 41

3.8. Caracterização do eletrodo por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) 41

4. Resultados e discussão 43

4.1. Caracterização do extrato contendo material fotossintético 43

4.2. Reação de Hill..... 45

4.3. Abordagem eletroquímica para Reação de Hill..... 46

4.3.1. Comportamento eletroquímico do DCFI sobre o eletrodo de carbono vítreo..... 47

4.4. Curva analítica para determinação de DCFI em meio aquoso 51

4.5. Abordagem eletroquímica para reação de Hill..... 52

4.6. Etapas de construção do sistema foto-bioeletroquímico 55

4.6.1. Caracterização estrutural, morfológica e fotocatalítica do eletrodo W/WO_3..... 55

4.6.2. Modificação do eletrodo de W/WO_3 com filmes de polidopamina..... 62

4.6.3. Imobilização dos cloroplastos intactos sobre a superfície do eletrodo de WO_3-PDA 67

5. Conclusão 73

6. Perspectivas 74

7. Referências 75

1. Introdução

Concomitante ao vertiginoso crescimento da população, o mundo moderno se depara com a crescente demanda por fontes de energia sustentáveis, ecologicamente corretas e economicamente viáveis como alternativas ao consumo de combustíveis fósseis (carvão mineral, petróleo e gás natural) (ORT et al., 2015), que tem sustentado a matriz energética desde longa data. Esta necessidade se deve ao esgotamento das reservas de combustível fósseis além do fato que seu uso vem contribuindo acentuadamente para o aumento dos níveis de emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa (CO_2, CH_4, N_2O, O_3, clorofluorcarbonetos e hidrofluorcarbonetos) que prejudicam o meio ambiente e alteram o ciclo de carbono vital para a proteção dos organismos vivos (FRIEDLINGSTEIN et al., 2020).

Atualmente, diversos tipos de fontes renováveis são explorados como alternativa para sanar o problema da crise energética, como a luz solar, vento, chuva, marés e calor geotérmico, dentre outros. Dentre essas fontes de energia, a luz solar é a fonte de energia mais abundante no planeta. A Terra recebe aproximadamente cerca de 120.000 TW de energia solar, e tem sido bastante usada para a construção de sistemas fotovoltaicos (também chamados de células solares), os quais convertem a energia luminosa em energia elétrica (KALYANASUNDARAM; GRAETZEL, 2010).

Atualmente, as células solares podem ser classificadas em três gerações:

a) células convencionais à base de silício cristalino;

b) células solares composta de um filme fino de silício amorfo, CdTe (telureto de cádmio) e CuInSe/Ga (seleneto de cobre, índio e gálio);

c) emprego de várias arquiteturas, como fotovoltaica orgânica (OPV), células solares sensibilizadas por corante (CSSC) e células solares de pontos quânticos.

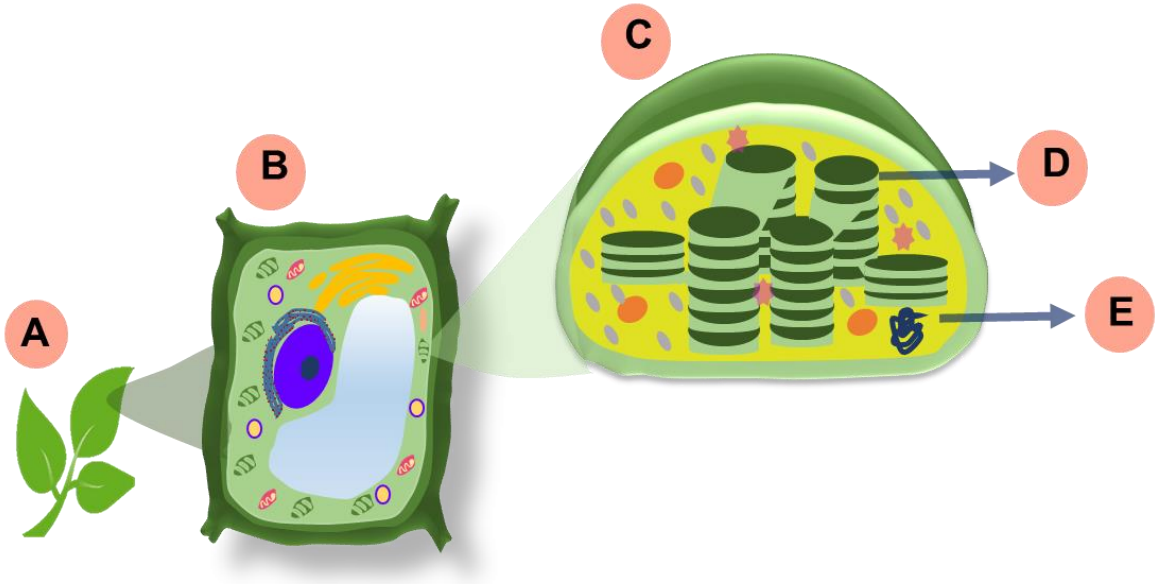
Cada tipo de célula solar tem limites de eficiência, vantagens de design e limitações de recursos. Coletivamente, as tecnologias atuais têm várias desvantagens, tais como, limitação de recursos naturais e geopolíticos e toxicidade am-

biental de certos componentes usados em sua fabricação. Devido a esses desafios, diversas pesquisas vêm explorando abordagens mais naturais, como o processo de conversão de energia solar via fotossíntese (MUSAZADE et al., 2018).

A fotossíntese é indiscutivelmente um dos processos naturais mais importante e complexos que existe, transformando nosso planeta antes sem vida em um mundo vivo. Enquanto as bactérias fotossintéticas primitivas, como as bactérias sulfurosas roxas e verdes, realizam fotossíntese anoxigênica, produzindo enxofre elementar a partir de sulfeto de hidrogênio com a ajuda da luz solar, já as cianobactérias, algas e plantas realizam fotossíntese oxigenada para converter H_2O e CO_2 em açúcares, liberando gás oxigênio como um subproduto. Neste processo há conversão da energia luminosa em energia química com uma eficiência quântica de 100%. A, fotossíntese resulta em energia armazenada em ligações químicas produzindo biocombustíveis ou biomassa. Diante disto o processo fotossintético tem sido utilizado com sucesso para aplicações de conversão de energia em uma variedade de maneiras (geração de H_2, produção de eletricidade e produção de biocombustíveis) (KALYANASUNDARAM; GRAETZEL, 2010; SEKAR; RAMASAMY, 2015; MUSAZADE et al., 2018).

O processo fotossintético ocorre nas membranas dos organismos em duas etapas, a fase dependente da luz (também chamada de fase clara ou etapa fotoquímica) e a fase independente da luz (chamada de fase escura ou etapa química) em estruturas celulares (organelas) denominadas cloroplastos. É importante ressaltar que as reações que ocorrem tanto na fase clara quanto na fase escura, acontecem em locais distintos no cloroplasto, onde a fase fotoquímica ocorre nas membranas tilacóides e fase química ocorre no estroma (JOHNSON, 2017), conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Ilustração do organismo fotossintético oxigênico, uma planta **(A)**, a célula vegetal com suas respectivas organelas **(B)**, com o enfoque no cloroplasto **(C)**, mostrando a sua estrutura, onde em **(D)** membranas tilacóides em **(E)** o estroma



Fonte: Próprio autor.

As reações que ocorrem na etapa fotoquímica e a transferência de elétron/próton da fotossíntese ocorrem principalmente dentro das membranas. Em muitos organismos fotossintéticos, a fotossíntese ocorre em membranas especializadas chamadas membranas tilacóides e em alguns organismos procarióticos, a membrana citoplasmática serve como membrana fotossintética. A unidade mínima, funcional e estrutural da fotossíntese é chamada de fotossistema. Inicialmente a fotólise da água, que é impulsionada pela luz em gás oxigênio, prótons e elétrons todo esse processo ocorre pela cadeia transportadora de elétrons localizadas nas membranas tilacóides. Já as reações que ocorrem na etapa química, os prótons e elétrons produzidos são usados para reduzir o CO_2 a carboidrato (CH_2O), em um processo chamado Ciclo de Calvin (também chamado de Ciclo das Pentoses) (JOHNSON, 2017). Os dois processos podem ser resumidos assim:

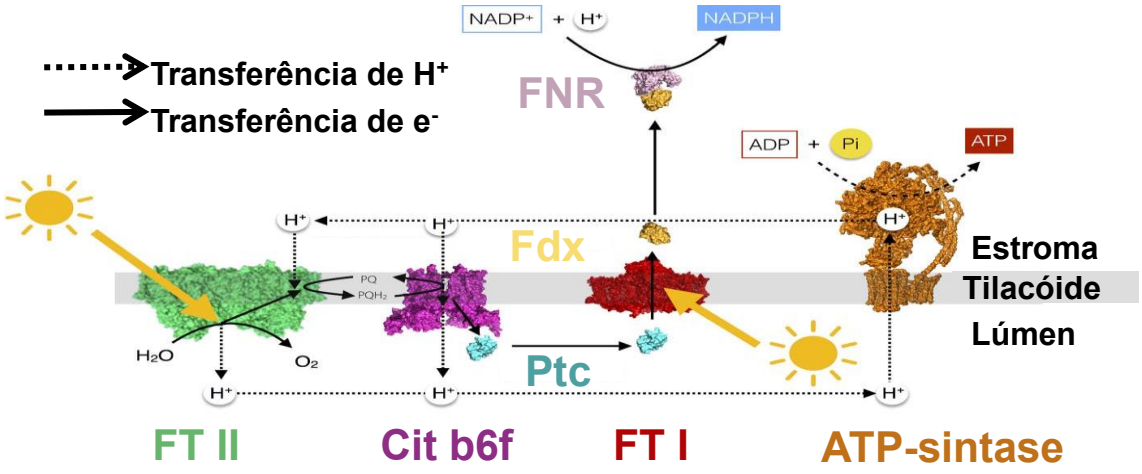
1) Reações que ocorrem na etapa fotoquímica: $2H_2O + luz \rightarrow O_2 + 4e^- + 4H^+$

2) Reações que ocorrem na fase química: $CO_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow CH_2O + H_2O$

3) Reação geral: $H_2O + luz + CO_2 \rightarrow CH_2O + O_2$

As reações de transferência de elétrons impulsionadas pela luz na fotossíntese começam com a fotólise da água pelo Fotossistema II (FTII), o qual é um complexo clorofila-proteína presente na membrana tilacóide que usa luz para oxidar água em oxigênio e reduzir o aceptor de elétrons plastoquinona (PQ) em plastoquinol (PQH_2). Em sequência, o PQH_2, transporta os elétrons provenientes da fotólise da água para outros complexos proteicos embutidos na membrana tilacóide, denominado citocromo *b*$_6$*f* (citb$_6$f), que oxida o PQH_2 a PQ e reduz uma pequena proteína transportadora de elétrons, plastocianina (Ptc). Uma segunda reação conduzida pela luz é então realizada por outro complexo de clorofila-proteína, Fotossistema I (FTI), que oxida a Ptc e reduz outra proteína transportadora de elétrons. A ferredoxina (Fdx), que reside no estroma. A Fdx, pode então ser usada pela enzima ferredoxina–$NADP^+$ redutase (FNR) para reduzir $NADP^+$ a NADPH (JOHNSON, 2017), esse processo é mostrado na Figura 2.

Figura 2: Cadeia transportadora de elétrons e prótons que ocorre na fotossíntese durante a fase clara.



Fonte: Adaptado de Johnson (2017).

O processo ilustrado acima ocorre com a liberação de oxigênio e a formação de NADPH e ATP, o quais são dependentes de reações de oxidação-redução catalisadas pela cadeia transportadora de elétrons. Neste contexto, a incorporação dos componentes fotossintéticos na construção de dispositivos fotobioeletroquímicos tem sido bastante explorados, como cloroplastos (HASAN et al., 2017a; DIACCI et al., 2020; WELIWATTE et al., 2021), membranas tilacóides

(DEWI et al., 2015; PANKRATOV et al., 2017, 2019; PANKRATOVA et al., 2018a; BUNEA et al., 2018; TAKEUCHI et al., 2018), fotossistema 1 (FT I) (MERSHIN et al., 2012; FEIFEL, S. C. et al., 2015; BEAM et al., 2015; FEIFEL, SVEN C. et al., 2015; TAPIA et al., 2017; KILISZEK et al., 2018; ZHAO et al., 2019) e fotossistema 2 (FT II) (WANG et al., 2015; SOKOL et al., 2016; LI et al., 2016; STONES et al., 2017; RIEDEL et al., 2019; HARTMANN et al., 2020), nas últimas décadas tem sido uma alternativa interessante para a conversão de energia. Neste universo, os usos de catalisadores e biocatalisadores versáteis e inteligentes utilizados para aperfeiçoar estas reações são cada vez mais intrigantes (KIM; NAM; et al., 2014). Dentre as biomoléculas fotossintéticas citadas acima os cloroplastos são as estruturas menos estudadas em fotobioeletroquímica em comparação com suas contrapartes para conversão de energia fotossintética. Diante da deficiência de trabalhos na literatura, os cloroplastos foi a organela escolhida para o desenvolvimento do projeto.

Na construção de uma plataforma fotobioeletroquímica, algumas etapas são cruciais, como a escolha do material utilizado como transdutor, a estratégia para a imobilização do material biológico e sua comunicação o eletrodo. Na literatura estas estruturas fotossintéticas citadas acima têm sido incorporadas como um filme fino sobre diversos tipos de eletrodos, assim podendo ser exploradas como fotobiocatalisadores na transferência de elétrons entre o eletrodo e a fase da solução (mediadores com potenciais formais adequados) produzindo fotocorrentes amplificadas.

Os principais materiais explorados como substratos são os eletrodos de ouro (YEHEZKELI et al., 2012; HASAN et al., 2014; ZHAO; HARDT; et al., 2018) e materiais baseados em carbono como, eletrodo de carbono vítreo(GCE) (LEE, J. et al., 2016), nanotubos de carbono (CALKINS et al., 2013; DEWI et al., 2015), óxido de grafeno (CAI et al., 2015; KILISZEK et al., 2018; PANKRATOVA et al., 2018b) e papel de carbono (Toray Carbon) (SJOHOLM et al., 2012; HASAN et al., 2017b; ZHOU et al., 2019; WELIWATTE et al., 2021). Porém, o uso de materiais semicondutores também vêm sendo aplicados de forma satisfatória como substrato para ancorar estas biomoléculas como Fe_2O_3 (WANG et al., 2015), TiO_2 (KAVADIYA et al., 2016; LI et al., 2016), ZnO (MERSHIN et al., 2012) e WO_3 (PANG et al., 2018). Dentre os materiais semicondutores o trióxido de tungstênio

(WO_3), semicondutor do tipo-n, tem sido muito utilizado para ancorar biomoléculas, devido suas propriedades que o tornam um material favorável como substrato para ancorar estas biomoléculas, como: material de baixo custo, ecologicamente correto, quimicamente estável, absorção na região do visível, baixa energia de *band-gap* (2,5eV – 2,8eV) e biocompatibilidade (SANTOS et al., 2016), diante disto o WO_3 foi escolhido como substrato para o desenvolvimento da plataforma fotobioeletroquímica.

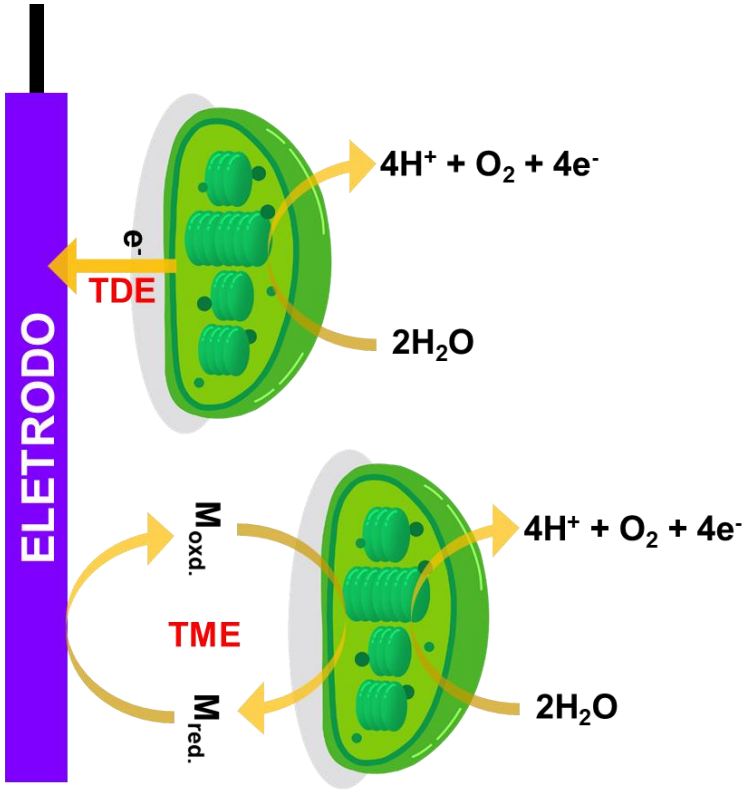
Na literatura os aparatos fotossintéticos estão sendo imobilizados e a comunicação com seus substratos tem sido feita de duas formas: por transferência direta de elétrons (TDE) e por transferência mediada de elétrons (TME), conforme ilustrado na Figura 3, entre o biomaterial e o eletrodo (MILTON et al., 2016). Basicamente a TDE ocorre quando os elétrons produzidos no biocatalisador são transferidos para um eletrodo sem a necessidade de um mediador de elétrons (SJOHOLM et al., 2012; DEWI et al., 2015; LEE, J. et al., 2016; PANKRATOVA et al., 2018b).

Já para o método TME pequenas porções redox-ativas transportam elétrons entre um biocatalisador e um eletrodo, os mediadores comumente usados são filmes poliméricos redox baseados em polivinilimidazol de ósmio ($Os^{2+/3+}$) (ZHAO; HARTMANN; et al., 2018), poli(etilenimina) funcionalizada com naftoquinona (HASAN et al., 2017b), polihidroxianilina (WELIWATTE et al., 2021), entre outros.

Como os cloroplastos são protegidos por complexos sistemas de membrana lipídica, a comunicação direta de elétrons torna o processo de TDE se torna mais difícil, então os trabalhos na literatura têm explorado o uso TME, A vantagem de se utilizar polímeros redox é que eles cumprem simultaneamente o papel de um mediador redox e uma matriz de imobilização tridimensional, aumentando assim a taxa de transferência de elétrons e a quantidade de complexos que podem ser imobilizadas produtivamente na superfície do eletrodo. Porém este material polimérico tem algumas desvantagens como o seu elevado custo e a complexidade envolvida na síntese (HARTMANN et al., 2020; WANG et al., 2020). O uso de mediadores de elétrons em solução entre as biomoléculas fotossintéticas também é explorado na literatura, como o uso de 2,6-diclorofeno-

lindofenol e moléculas derivadas de quinonas (p-benzoquinona, diclorobenzo-quinona, duroquinona, tetracloro-benzoquinona entre outros) (HASAN et al., 2014).

Figura 3: Esquema do processo transferência de elétrons na superfície do eletrodo, por mecanismos de transferência direta de elétrons (TDE) e por meio de transferência mediada de elétrons (TME).



Fonte: Próprio autor.

Diante disto o grande desafio consiste no preparo dos eletrodos usando destas estruturas fotossintéticas, em configurações funcionais que permitem a comunicação de transferência de elétrons entre as espécies primárias de elétrons (fotogeradas nas estruturas fotossintéticas) e a superfície do eletrodo. Deste modo, seria relevante para o trabalho investigar novas formas de imobilização de cloroplastos (material fotossintético) utilizando filmes de polidopamina depositados sobre o eletrodo de WO_3. A escolha da polidopamina foi atribuída a suas características de ser facilmente depositadas em uma variedade de substratos, a espessura do filme pode ser controlada, estabilidade, grupos funcionais (catecol, amina e imina) que permitem imobilizar biomoléculas além de melhorar

a absorção do material na região do visível (LIU et al., 2014). Além destas características, na literatura o potencial da polidopamina de agir como agente ancorante e como mediador e elétrons já vem sendo explorados de forma satisfatória (KIM; LEE; et al., 2014; LEE, S. Y. et al., 2016).

2. Objetivos

O objetivo do projeto foi a síntese e caracterização de eletrodos de WO_3 modificados com filmes poliméricos de polidopamina visando a imobilização de cloroplastos, extraídos de folhas de espinafre, para construção de um dispositivo fotobioeletroquímico para geração de fotocorrentes amplificadas.

Além disso foi investigado o comportamento eletroquímico do composto 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) sobre o eletrodo de carbono vítreo (GCE) e o seu uso como potencial sonda redox para Reação de Hill, usando o monitoramento via voltametria de onda quadrada com o intuito de buscar novas formas de avaliação do poder fotossintético do cloroplasto.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção do material fotossintético

Todos os processos de obtenção do material fotossintético foi realizado de acordo com (HASAN et al., 2017b) e todas as etapas de extração dos cloroplastos foram realizados em baixa temperatura ~4°± 2ºC.

Inicialmente pesou-se 30 g do limbo das folhas de espinafre, compradas em mercado local na cidade de Araraquara, os quais foram completamente lavados com água destilada e cortados em pedaços menores e processados em um liquidificador com 120 mL do tampão de extração (constituído por 330 mM sorbitol, 50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2,6 mM EDTA e 10,6 mM $MgCl_2$) com 0,1% BSA (p/V) em pH 7,0.

Posteriormente, a solução resultante foi então sujeita a filtragem através de uma tripla camada de gaze para remover materiais particulados e o filtrado foi recolhido em tubos tipo Falcon. O filtrado foi centrifugado a 200xg por 3 min para remover todas as células inteiras indesejadas e detritos da parede celular.

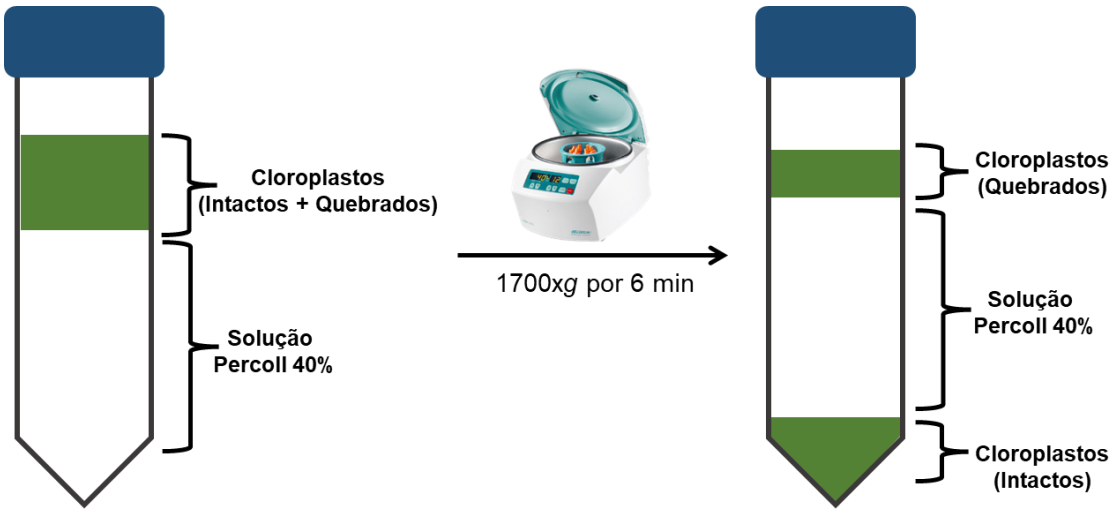
Os sobrenadantes de cada tubo foram transferidos para novos tubos Falcon e centrifugados novamente a 1000xg por 7 min, após esta etapa os cloroplastos estarão no pellet do tubo Falcon.

Afim de isolar os cloroplastos intactos dos quebrados, foi realizado uma etapa de centrifugação por gradiente de Percoll. Nesta etapa uma porção de 10 mL de solução Percoll 40% (v/v) foi usada para cada 6 mL de suspensão de cloroplasto e centrifugados a 1700x*g* por 6 min. Após a centrifugação, os cloroplastos intactos estavam no pellet e os quebrados na parte superior do tubo Falcon. Este processo está ilustrado na Figura 3.

Os cloroplastos intactos foram cuidadosamente coletados do fundo do tubo e ressuspenso em 0,5 mL do tampão de extração. Foi avaliada a concentração de clorofila presente na solução de cloroplastos, etapa descrita no item 3.2.. A solução de cloroplastos foi ajustada para uma concentração de 1,5 mg mL^{-1} de clorofila.

O extrato contendo os cloroplastos intactos foram armazenadas no freezer em meio de glicerina em uma proporção de 1:1 (solução de cloroplastos: glicerina).

Figura 4: Ilustração do processo de isolamento de cloroplastos por meio de gradiente de percoll 40%.



Fonte: Próprio autor.

Para visualizar as estruturas dos cloroplastos em solução foi realizada a micrografia confocal de fluorescência utilizando o equipamento (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) utilizando uma objetiva de 40x com imersão em óleo, utilizando uma linha de laser de 561nm.

3.2. Determinação da concentração de clorofila

A concentração de clorofila que está presente nas proteínas do fotossistema nas membranas tilacoides, dentro dos cloroplastos, foi estimada de acordo com o procedimento de (ARNON, 1949). Resumidamente, 10 µL da amostra contendo os cloroplastos foram suspensos em 1,0 mL de acetona 80% (v/v) (extrair os pigmentos fotossintéticos) e centrifugados a 3000xg por 5min. O sobrenadante foi coletado e sua absorbância foi medida em 652 nm. A partir deste dado a concentração total de clorofila presente nas amostras foram estimadas pela Equação 1.

Equação 1 $$[clorofila]\frac{mg}{mL} = \frac{Abs(652nm)X1000}{34{,}5}$$

Além da concentração de clorofila presente na solução de cloroplastos, foi realizado o espectro de absorção UV/Vis utilizando o equipamento (Agilent®

Technologies model Cary 60) afim de observar a banda de absorção dos pigmentos fotossintéticos presentes na amostra.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Com a finalidade de confirmar a presença dos complexos fotossintético na suspensão obtida e a pureza, foi feito uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) para visualizar os complexos proteicos presentes na membrana tilacóide, uma vez que esses complexos apresentam em sua estrutura, moléculas com tamanho e peso diferentes, podendo assim ser observado por meio do sistema de eletroforese, SDS-PAGE (HAYASHI; OHBA, 1972). As etapas dos processos envolvidos no preparo do SDS-PAGE são explanadas a seguir:

3.3.1. Preparo do gel de resolução

Foram adicionados 3,3mL da solução A (composta por 30,0 g acrilamida e 0,8 g de N'N' bis metilenoacrilamida em 100mL de água destilada. Filtrado em membrana de 0,45µm), 2 mL da solução B (composta por Tris-HCl 1,9 mol L^{-1} pH 8,8 + SDS 1% (p/v)); 10µL TEMED (N,N,N',N'- tetrametilenenodiamino); 100µL de APS 10%(p/v) (persulfato de amônio) e 4,7mL de água destilada. A mistura foi transferida imediatamente, utilizando uma pipeta, para o conjunto de placas de vidro previamente montado (sistema de eletroforese). Esperou-se por um período de tempo de 20 minutos a polimerização do gel em temperatura ambiente.

3.3.2. Preparo do gel de empacotamento (*stacking gel*) 4,5%

Foi Adicionado em um béquer os seguintes reagentes: 750µL da solução A; 1mL da solução C (composta por Tris-HCl 1,9 mol L^{-1} pH 8,8 + SDS 0,5% (p/v)); 5µL TEMED; 50 µL de APS 10% e 3,35 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada rapidamente e transferida para as placas de vidro contendo o gel de separação. Foi colocado o pente e aguardou-se a polimerização por cerca de 20 min. Após a polimerização do gel, foi retirado cuidadosamente o pente e adicionado o tampão de corrida (para um volume de 1000mL foi pesado Tris (30,3 g), glicina (144,0 g) e SDS (10,0 g)).

3.3.3. Processo de eletroforese

O sistema de eletroforese utilizado para realizar os experimentos foi o GNA 100, equipado com fonte Pharmacia Biotech modelo EPS 301. A cuba foi cuidadosamente preenchida com o tampão de corrida Tris-Glicina 1x. Foi tomado um volume de 25 µL da amostra obtida no item 3.2, nos poços do gel de empacotamento e depois foi aplicado um potencial de 65V por 10 min, para que as amostras entrassem no gel de empacotamento. Em seguida, a tensão foi aumentada para 250V e mantida a corrida pelo tempo suficiente para que o corante (azul de bromofenol) atingisse a base do gel (~ 45min). Foi interrompido a eletroforese, o sistema foi desfeito e removido cuidadosamente os conjuntos de placas contendo os géis.

3.3.4. Revelação do gel

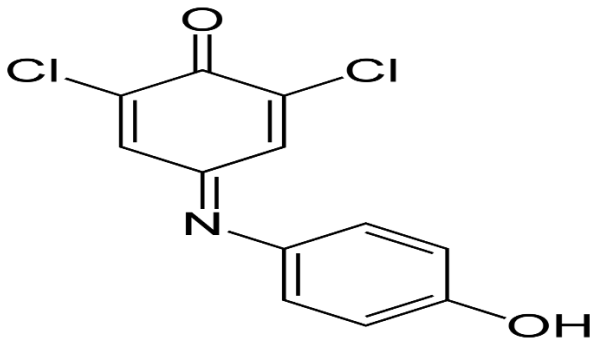
Foi adicionado, em containers apropriados, aproximadamente 100mL de uma solução contendo o corante Coomassie Blue Brilliant 0,05% (p/v) (solubilizado em metanol 50%, ácido acético 10% e 40% de água). Os containers foram aquecidos por 30 segundos em um forno microondas. O gel foi embebido nesta solução pré-aquecida e incubado em temperatura ambiente, sob agitação suave, por 15-20 min. A solução contendo o gel foi removida cuidadosamente, foi lavado rapidamente em água corrente e adicionado 100mL da solução descorante (composta por: metanol (30%), ácido acético (7%), água (63%)). os containers contendo o gel e a solução descorante foram aquecidos no forno microondas por 30 segundos e incubados em temperatura ambiente, sob suave agitação, para descoloração do gel, durante 15 min. Por fim, removeu-se a solução descorante cuidadosamente, podendo assim analisar o gel, visualizando as bandas de proteínas.

3.4. Teste de atividade do material fotossintético (Reação de Hill)

Uma etapa muito importante para o desenvolvimento do projeto foi testar se os cloroplastos extraídos e isolados apresentavam atividade. Para isto foi realizada a reação de Hill. Esta reação colorimétrica apresenta a transferência de elétrons impulsionada pela luz em uma suspensão de cloroplastos ativos. Os

cloroplastos nesta solução reduzem um aceptor artificial de elétrons como o 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) (Figura 5), passando de uma coloração fortemente azulada para incolor, sendo possível o monitoramento.

Figura 5: Formula estrutural do DCFI.



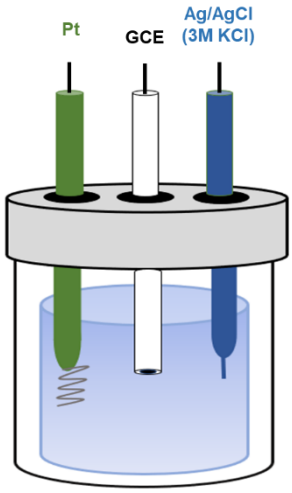
Fonte: Próprio autor.

Nesta reação colocou-se em um tubo de ensaio 3 mL de tampão fosfato pH 7,0 (contendo 330 mmol L^{-1} de sorbitol), 1,5 mL do extrato de cloroplastos e 0,5 mL de DCFI a 0,016% (p/v). A partir da exposição a uma lâmpada de irradiação no Ultravioleta/visível com potência de 125W, a reação foi monitorada pela absorbância da sonda, em 620nm, durante um período de tempo de 5 minutos. A reação foi monitorada também no escuro, onde o tubo era envolto por papel alumínio para evitar o contato com a luz externa.

Com o intuito de monitorar o processo de transferência de elétrons que ocorre durante a fotossíntese, via sonda redox, utilizou-se a técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada, o que se caracteriza como uma nova abordagem para a reação de Hill.

Para as medidas eletroquímicas, foram feitas utilizando um sistema de célula contendo três eletrodos, o qual foi usado como eletrodo de trabalho o eletrodo carbono vítreo (GCE), eletrodo de referência Ag/AgCl-KCl 3,0 mol L^{-1} e como eletrodo auxiliar um fio de platina, ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Ilustração de uma célula eletroquímica de três eletrodos.



Fonte: Próprio autor.

As medidas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302N (Metrohm, Herisau, Suíça). O experimento foi conduzido utilizando os mesmos parâmetros experimentais (eletrólito de suporte, sistema de iluminação e o tempo de avaliação) para a reação monitorada colorimetricamente, descritos anteriormente. Para isto, voltamogramas VOQ foram registrados no intervalo de potencial de -0,1 V a +0,3 V, com os seguintes parâmetros de onda quadrada otimizados: amplitude de potencial= 50mV, amplitude de pulso ΔE_s= 2 mV e frequência (f) = 150 Hz.

3.5. Construção do biossensor fotoeletroquímico

3.5.1. Preparo do eletrodo de W/WO_3

Para o desenvolvimento do biossensor fotoeletroquímico foi utilizado como transdutor o eletrodo de trióxido de tungstênio (W/WO_3). O eletrodo de W/WO_3 foi preparado por anodização de uma placa de tungstênio. A placa com dimensões de 1x1 cm² de tungstênio metálico (Alfa Aesar, 0,25 mm, 99,95%) foi polida mecanicamente com lixas de diferentes granulometrias (600,800, 1000, 1200, 1500, 2000). Após este tratamento, a placa foi lavada em banho de ultrassom durante cinco minutos em acetona, isopropanol e água ultrapura respectivamente. Posteriormente, a placa foi submetida a fluxo de N_2 com a finalidade de secagem. Na sequência, a placa de W foi imersa em uma solução eletrolítica contendo 0,7% (p/V) NH_4F com 0,1 $molL^{-1}$ de sulfato de sódio e submetido a uma

rampa de potencial de 1 V por segundo, até ser atingido o potencial equivalente a 40V, mantido em um período de 15 minutos. Para a anodização da placa de W foi utilizada uma fonte de tensão estabilizada 60 V/2 A Tectrol®. Como contra eletrodo utilizou-se uma rede de platina. Após o término da anodização, o eletrodo foi cuidadosamente lavado pela imersão em água deionizada, seguido da secagem por fluxo de N_2 (LAI, 2014). Na sequência, o eletrodo foi submetido a um processo de calcinação a 450 ºC por 2 horas em um forno mufla.

3.5.2. Modificação do eletrodo de W/WO_3 com filme polimérico de polidopamina

O eletrodo de W/WO_3 modificados com o filme polimérico de dopamina foram preparados seguindo o trabalho de (YU et al., 2019; TORQUATO et al., 2020) da seguinte forma: para o crescimento do filme de PDA sobre a superfície do W/WO_3, o eletrodo foi imerso em uma solução de 5mg mL^{-1} de dopamina em meio de 10mM Tris-HCl pH 8,5 a 4º C em diferentes intervalos de tempos (2,4 e 6 horas) para avaliar o melhor tempo de deposição do filme sobre a superfície do eletrodo, formando então o eletrodo de W/WO_3 com filme de polidopamina (WO_3/PDA).

3.5.3. Modificação do eletrodo de WO_3/PDA com os cloroplastos

Primeiramente, foi gotejado 50,0 µL do extrato contendo os cloroplastos (1,5 mg mL^{-1}) sobre a superfície do eletrodo de WO3/PDA. O eletrodo foi incubado em câmara úmida por 1hora, para que se adsorvesse na superfície do eletrodo. Após isso o eletrodo foi lavado com água ultrapura e secos com jatos suaves de N_2. Então o eletrodo de WO_3/PDA/Cloroplastos estava pronto para realizar as medidas fotoeletroquímicas.

Para visualizar as estruturas dos cloroplastos sobre a superfície do eletrodo de WO_3/PDA foram realizadas imagens de micrografia de confocal de fluorescência utilizando o equipamento (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) utilizando uma objetiva de 40x com imersão em óleo, utilizando uma linha de laser de 561nm.

3.6. Medidas fotoeletroquímicas

As medidas fotoeletroquímicas foram realizadas com um auxílio de um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302N (Metrohm, Herisau, Suíça), software Nova 2.1 para configurações de parâmetros e software de tratamento de dados para obtenção dos gráficos. Foi utilizado um reator de 1 compartimento e sistema de 3 eletrodos. Sendo o eletrodo de W/WO_3 e suas modificações como eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência foi o de Ag/ AgCl 3,0 mol L^{-1} e como eletrodo auxiliar uma rede de platina.

Como sistema de irradiação foi utilizado dois sistemas diferentes de LEDs que emitem em comprimento de onda na região do UV (LED-1: 375nm e LED-2: 395nm), os quais os espectros de emissão foram caracterizados utilizando o equipamento de espectrofluorímetro Modelo Fluorolog-3 FL3-122 da Horiba Jobin Yvon. Além disso a intensidade luminosa de cada LED foi registrada por meio do equipamento de radiômetro modelo PMA2100 (Solar Light Co. Inc.) equipado com um detector de UVA (320-400 nm).

3.7. Caracterização do eletrodo

As propriedades morfológicas e estruturais dos filmes de WO_3 foram investigadas por análise de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-SEM) e difração de Raios-X (DRX). As medidas de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM de alta resolução, com fonte de elétrons por emissão de campo, da marca JOEL, modelo JSM - 7500-F e também pelo modelo JSM-7401-F. Medidas de difração de Raios X foram obtidas em um equipamento Rigaku RINT 1500 usando radiação Cu K na região de 10-70°. Espectros de Reflectância Difusa na região do UV-vis foram obtidos em um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer Lambda 35. Os dados de reflectância difusa foram convertidos em dados de coeficiente de absorção (α) por meio da função de Kubelka-Munk e assim, os valores de band gap foram estimados por gráficos de Tauc.

3.8. Caracterização do eletrodo por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

As medidas impedimétricas foram realizadas em um potenciostato AUTO-LAB 302N. Utilizando-se uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos: rede de platina como eletrodo auxiliar, Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}) como eletrodo de referência e WO_3 eletrodo de trabalho, as medidas foram realizadas em solução $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em meio de solução de KCl 0,5 mol L^{-1}. O OCP foi calculado utilizando um tempo de estabilização de potencial de 120 segundos e então a medida foi realizada utilizando um intervalo de frequência de 1,0x10^5 a 0,01 Hz com 10 pontos/ década.

.

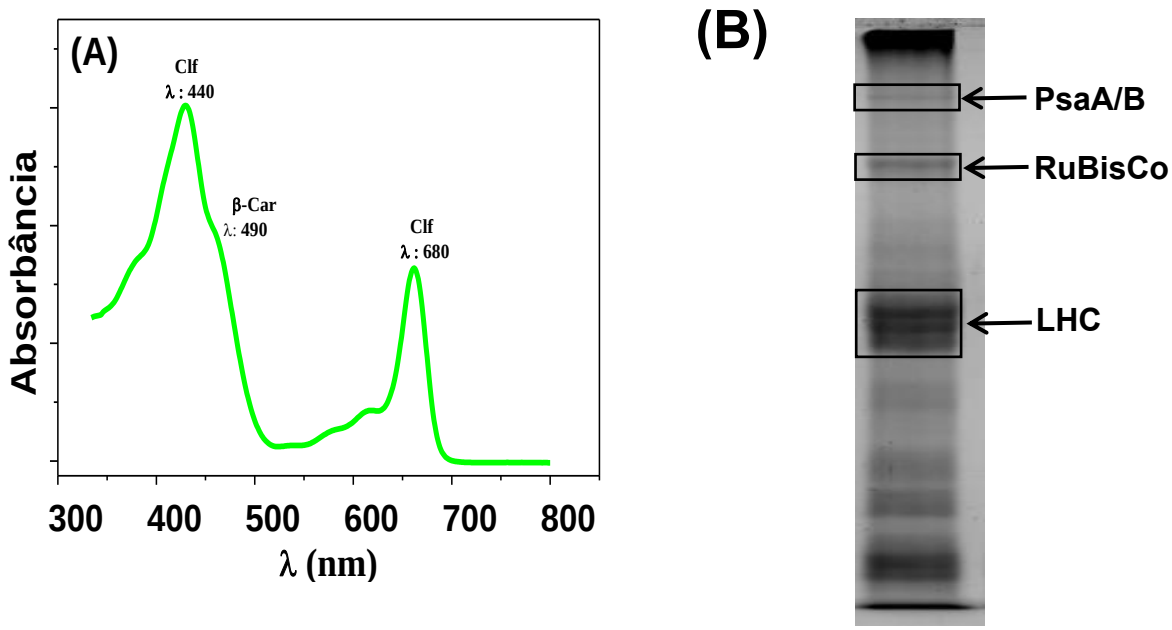
4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização do extrato contendo material fotossintético

Para avaliar a presença dos pigmentos fotossintéticos presentes no extrato obtido, foi feito o espectro de absorção UV-visível suspensos em uma solução de acetona 80% (v/v), como mostrado na Figura 7(A). Dentre os pigmentos fotossintéticos primários, a clorofila (Clf), apareceu com máximo de absorção em 680 nm e 440nm, observa-se também bandas relacionadas aos pigmentos secundários, como os carotenoides (β-Car), com máximo de absorção em 490 nm. Esses dados são consistentes com os dados apresentados na literatura (XIONG et al., 2013).

Como o extrato fotossintético não teve nenhuma etapa de purificação, foi realizado a análise por eletroforese, SDS-PAGE, para investigar a pureza, bem como a presença dos complexos proteicos, Figura 7(B). De acordo com dados da literatura (ROLLAND et al., 2003), pode-se observar a presença de várias bandas proeminentes. Algumas mostram a presença de proteínas importantes envolvidas na fotossíntese, os complexos envolvidos no centro de reação (PsaA/B), as proteínas do complexo de coleta de luz presentes nos fotossistema II e no fotossistema I (LHC, do inglês "*Light-Harvesting Complex*") e a enzima RuBisCo. Além dessas, pode-se observar a presença de outras bandas que podem estar atribuídas a outras proteínas presentes no extrato da folha de espinafre, uma vez que a amostra não teve nenhuma etapa de purificação. Talvez para construção do biossensor fotoeletroquímico seja necessário realizar uma etapa de purificação na amostra para evitar interferentes na imobilização do material sobre a superfície eletródica.

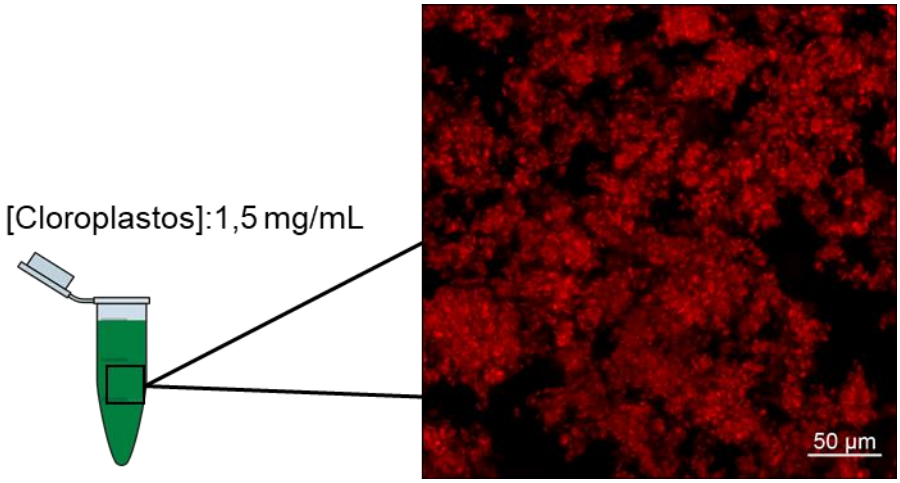
Figura 7: (A) Espectro de absorção UV-visível do extrato contendo material fotossintético, mostrando a presença das bandas de absorção dos pigmentos fotossintéticos, em meio de acetona 80%. **(B)** SDS-PAGE do material fotossintético extraído de folhas de espinafre.



Fonte: Próprio autor.

A integridade dos cloroplastos é de extrema importância, uma vez que sua atividade fotoeletroquímica e atividade metabólica dependem de sua integridade estrutural. Para investigar se os componentes internos dos cloroplastos não foram danificados durante o processo de isolamento, foram registradas imagens usando microscopia de fluorescência confocal como mostrado na Figura 8. Como pode ser observado na imagem, os cloroplastos estão em grande quantidade, mostrando uma aparência opaca, brilhante e com halo, em estreita concordância com estudos anteriores da literatura (HASAN et al., 2017b; WELIWATTE et al., 2021).

Figura 8: Imagem de microscopia confocal de fluorescência dos cloroplastos intactos em solução com uma objetiva de 40x.

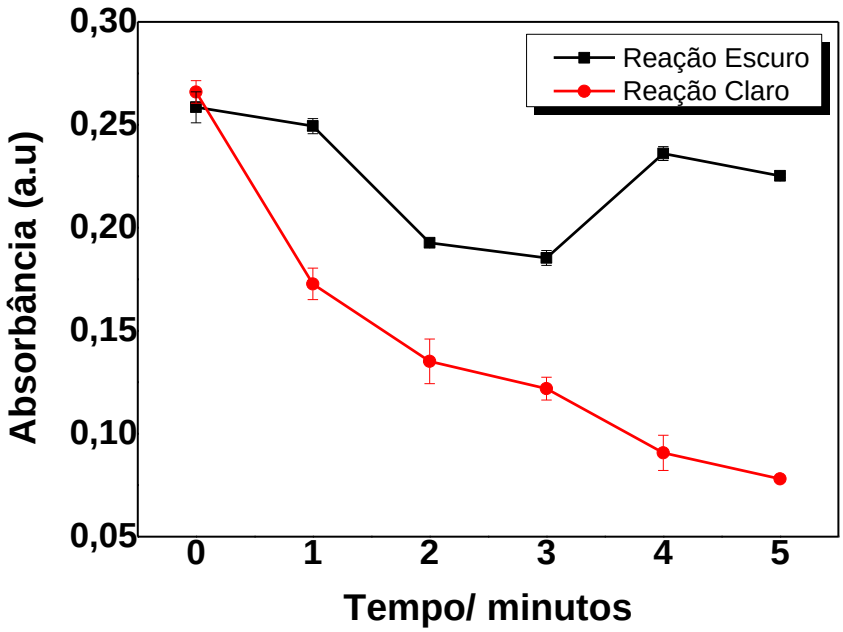


Fonte: Próprio autor.

4.2. Reação de Hill

A figura 9 mostra a curva de decaimento da absorbância do DCFI obtida pela Reação de Hill nas condições de ausência (Reação Escuro) e na presença de luz (Reação Claro) na presença do material fotossintético em um intervalo de 5 minutos. Como pode ser observado na reação que ocorre no escuro (em preto) houve uma variação com os valores de absorbância do DCFI, as quais podem ter sido ocasionadas por erro experimental no recobrimento do tubo de ensaio permitindo a entrada da luz, porem ao observar a reação na presença de luz (curva em vermelho) o decaimento da absorbância do DCFI é melhor evidenciado, sendo que em um tempo de 5 minutos de reação, decai cerca de ~70,4%. Os resultados obtidos em ambas reações (escuro e claro) eram esperados, indicando que os complexos fotossintéticos presentes no extrato fotossintético necessitam da luz, para poder reduzir a sonda redox DCFI na forma oxidada (cor azul) para a forma reduzida (incolor), em um processo acoplado á fotólise da água com liberação de O_2. Os resultados obtidos comprovam então a atividade do material extraído das folhas de espinafre.

Figura 9: Curva de decaimento da absorbância do DCFI na presença do extrato contendo o material fotossintético na presença e na ausência da luz.



Fonte: Próprio autor.

4.3. Abordagem eletroquímica para Reação de Hill

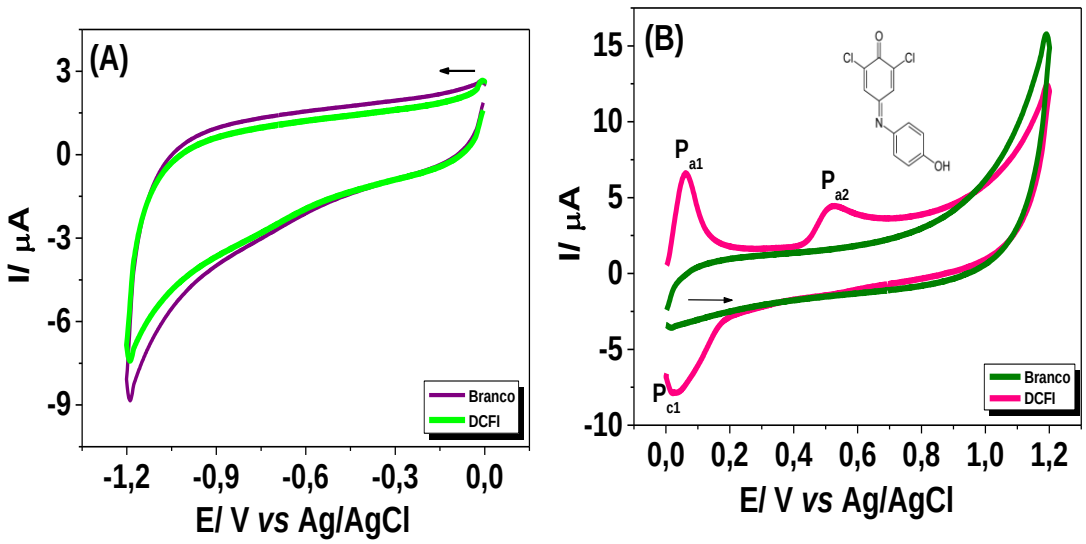
Considerando que a sonda redox é um composto importante no monitoramento do processo fotossintético que ocorre via reações de oxidação-redução catalisadas pela cadeia transportadora de elétrons, investigou-se nesta etapa o comportamento eletroquímico do 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI), como aceptor artificial de elétrons o qual é facilmente reduzido na presença de cloroplastos e luz, com o intuito de estabelecer uma abordagem eletroquimica para o monitoramento da trasferência de eletrons envolvidas na fotossintese utilizando o sinal eletroquimico do composto DCFI, uma vez que este fenômeno é usualmente monitorado pelo método colorimétrico (VIVIANI, 2016).

Assim, nesta primeira parte do trabalho investigou-se o comportamento eletroquímico do DCFI sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e o seu uso como sonda redox para Reação de Hill, usando o monitoramento via voltametria de onda quadrada com o intuito de buscar novas formas de avaliação do poder fotossintético do cloroplasto.

4.3.1. Comportamento eletroquímico do DCFI sobre o eletrodo de carbono vítreo

A Figura 9, mostra os respectivos voltamogramas cíclicos obtidos para redução (A) e oxidação (B) de 1,0x10^{-4} mol L^{-1} DCFI em 0,04 mol L^{-1} de tampão Britton-Robinson (BR) pH 7,0 sobre eletrodo de carbono vítreo (GCE), sob velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1}.Nenhum processo de redução foi observado para o DCFI no intervalo útil de potencial (Figura 9, Curva A). No entanto, na varredura em regiões mais anódicas, observa-se dois picos de oxidação, o pico em potencial de +0,06 V *vs* Ag/AgCl (P_{a1}) e pico na varredura reversa em potencial de 0,00 V *vs* Ag/AgCl (P_{c1}), bem como um pico de pequena intensidade em potencial ao redor de +0.50V *vs* Ag/AgCl (P_{a2}), provavelmente atribuídos a oxidação do grupo fenólico presente na estrutura química do DCFI (inserte) na Figura 9(B).

Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos para redução (A) e oxidação (B) de 1,0x10^{-4} mol L^{-1} de DCFI em tampão BR pH=7,0 sobre GCE, v=100 mV s^{-1}.

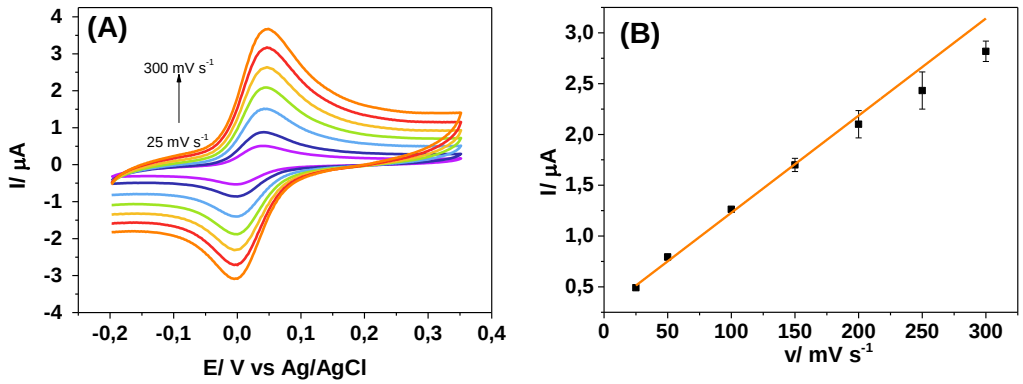


Fonte: Próprio autor.

No intuito de explorar melhor o pico P_{a1} para fins analíticos investigou-se a seguir o efeito da velocidade de varredura (v) no intervalo de 25 a 300 mV.s^{-1} sobre a altura do primeiro pico (P_{a1}), mostrados na Figura 11(A). Observa-se que a intensidade de corrente anódica aumenta proporcionalmente à velocidade de

varredura, como pode ser visto na Figura 11(B). A variação entre potencial de pico anódico (E_{pa}) e potencial de pico catódico (E_{pc}) ($E_{pa} – E_{pc}$) é constante e igual a 60 mV. Considerando que processos reversíveis apresentam valores de ($E_{pa} – E_{pc}$) = 50 /nmV (COMPTON; BANKS, 2007), os valores obtidos indicam que o primeiro pico de oxidação do composto DCFI envolve a transferência de um elétron. Em adição a razão entre corrente de pico catódico e pico anódico também é constante e igual 1. Este comportamento é indicativo que provavelmente DCFI é oxidado em um processo reversível envolvendo transferência de 1 elétron (BARD; FAULKNER, 2002). A relação entre a Ip_a é linear com v (Figura 11B) segundo a equação: Ipa (V)= $4{,}1126x10^{-7} + 8{,}0412x10^{-9}$ (mV s^{-1}) indicando que o processo eletródico é controlado por adsorção do reagente (COMPTON; BANKS, 2007).

Figura 11: (A) Voltamogramas cíclicos de $1{,}0x10^{-4}$ mol L^{-1} de DCFI em 0,04 mol L^{-1} tampão BR pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mV.s^{-1}. **(B)** Relação entre a v e Ip com r: 0,9976.

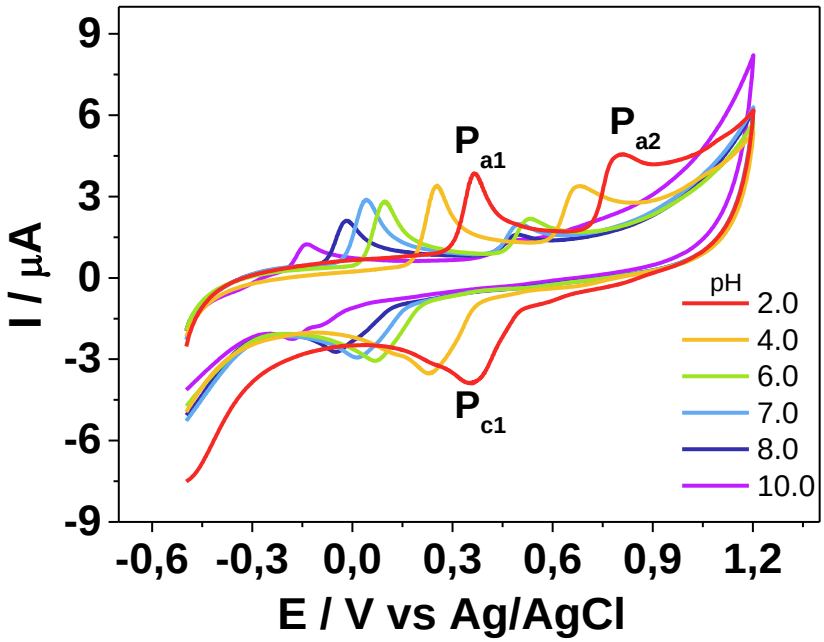


Fonte: Próprio autor.

O efeito do pH sobre os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de DCFI em tampão Britton-Robinson (BR) no intervalo de 2-10, pode ser observado na Figura 12. A intensidade dos dois picos anódicos P_{a1} e P_{a2} é máxima em pH ácido, mas a altura diminui em pH alcalino até completo desaparecimento em pH > 10. Também há um claro deslocamento dos picos para potenciais menos anódicos quando o pH aumenta, indicando dependência de reações de protonação do grupo eletroativo na reação eletródica (BARD; FAULKNER, 2002).

Em meio ácido também é observado que a intensidade do segundo pico anódico é maior e diminui sensivelmente em pH alcalino.

Figura 12: Efeito do pH sobre os voltamogramas cíclico obtidos para oxidação $1x10^{-4}$ mol L^{-1} de DCFI em 0,04 mol L^{-1} de tampão BR pH 2 a 10 sobre GCE, v=100 mV $^{s-1}$.



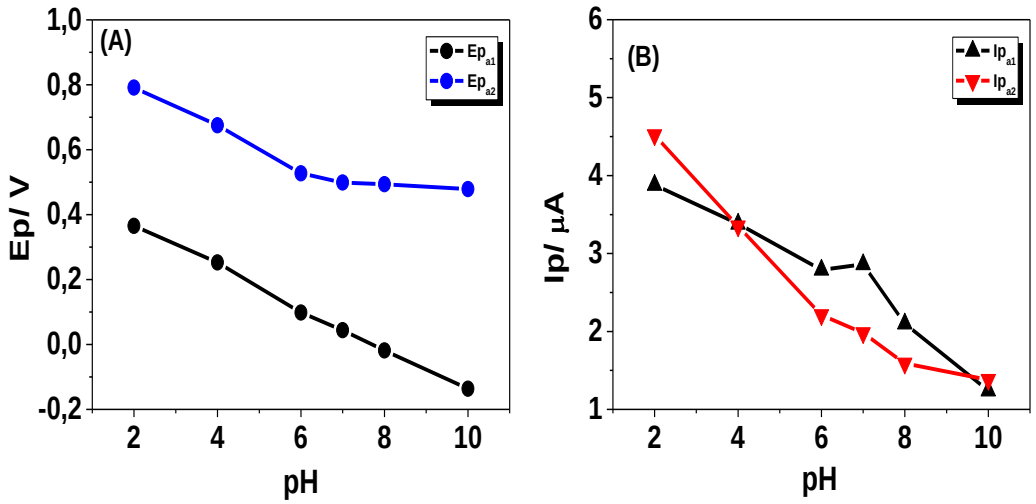
Fonte: Próprio autor.

Em seguida, a relação dos respectivos valores de potencial de pico (Ep) correspondente aos processos de oxidação P_{a1} e P_{a2} e o efeito do pH sobre a intensidade da corrente de pico (Ip) P_{a1} e P_{a2}, podem ser observados, respectivamente, na Figura 13A e 13B.

A relação entre Ep *vs* pH (Figura 13A), indica que o primeiro pico de oxidação (P_{a1}) se desloca linearmente para potenciais menos anódicos com o aumento do pH de acordo com a equação Ep(V)= 0,494 - 0,063pH. Considerando que, segundo a literatura (COMPTON; BANKS, 2007), da relação entre $\Delta Ep/\Delta pH = 0.059mH^+/ ne^-$, é possível estimar o número de prótons envolvidos na reação. A estimativa foi feita utilizando valores da inclinação da reta de 63mV, onde o valor estimado da relação é que 1 H^+ estaria envolvido na reação redox, considerando uma transferência de 1 e^-. Por outro lado, observa-se claramente que o segundo pico anódico (P_{a2}) desloca-se para potenciais menos anódicos em valores 2,0 ≤ pH ≤ 6,0, já para valores de pH ≥ 6,0 o potencial torna-se constante.

Este comportamento é indicativo que também a segunda etapa de oxidação ocorre na forma protonada em solução de tampão BR pH ≤ 6. Na Figura 13B é possível observar que a relação entre Ip *vs* pH para ambos os picos (P_{a1} e P_{a2}) é máxima em valores de pH =2, porém diminui acentuadamente até pH 6 e o segundo pico é totalmente suprimido em pH 10.

Figura 13: Gráficos do efeito do pH sobre o potencial de pico anódico **(A)** e da corrente de pico **(B)** correspondentes aos voltamogramas da Figura 10.



Fonte: Próprio autor.

O comportamento da curva de Ep *vs* pH, Figura 13A, indica que provavelmente a função fenólica do composto DCFI é oxidado em uma primeira etapa envolvendo um elétron. No intervalo de pH < 7, o grupo (C-OH) é oxidado na forma protonada, no entanto em pH alcalino o grupo pode estar sendo oxidado na forma não protonada ($C\text{-}O^-$). Este comportamento é confirmado pelos valores de corrente de pico anódico em função do pH que diminuem em função da desprotonação do grupo original, Figura 13B, até completo desaparecimento em pH 10.

A segunda etapa de oxidação pode ser atribuída a oxidação do produto da primeira etapa de redução ou da imina secundária (-N=) no composto DCFI que ocorre em potenciais mais anódicos. A mudança de inclinação da relação entre Ep *vs* pH em pH= 6, sugere mudança de protonação da espécie envolvida na segunda etapa de oxidação, confirmando o diagnóstico de que a redução do

grupo fenólico (-C=OH) deve ser responsável pela oxidação do DCFI na primeira etapa de oxidação. O produto gerado -C-$O^{\cdot+}$ poderia estar sendo oxidado na segunda etapa de oxidação. No entanto, novos estudos serão realizados, como estudos de eletrólise a potencial controlado e análise dos produtos para confirmar estas hipóteses.

No entanto, de acordo com os dados obtidos é possível propor um esquema para a oxidação do composto DCFI como mostrado abaixo.

Pico P_{a1}:

R1- C-OH + 1e-, 1H+ → R1 – C -$O^{+\cdot}$

Pico P_{a2}:

R1 – C -$O^{+\cdot}$+1e-, 1H+ → R1- C=O

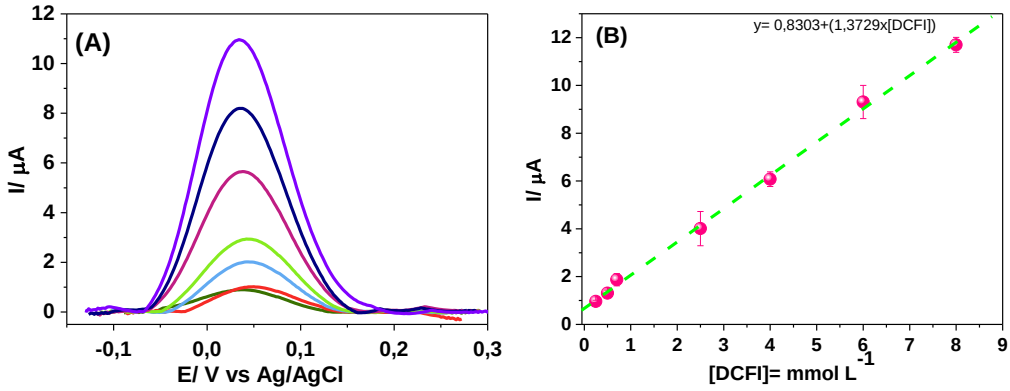
4.4. Curva analítica para determinação de DCFI em meio aquoso

A determinação do DCFI foi realizada pela técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ), uma vez que usualmente apresenta maior sensibilidade para sistemas reversíveis do que o método de voltametria de varredura linear.

Na Figura 14A, estão apresentados os perfis dos voltamogramas de VOQ para DCFI no intervalo de concentração de 0,25 a 8,00 μmol L^{-1}. Em todo o intervalo de concentração investigado há um pico bem definido que aumenta sucessivamente com a adição de DCFI em tampão PBS 7,2. A respectiva curva analítica construída com os valores de Ip *vs* [DCFI] é mostrada na Figura 14B. Observa-se uma relação linear em todo o intervalo de concentração. Outros parâmetros foram calculados também como o limite de quantificação (LQ) 0,8569μmol L^{-1} e de detecção (LD) 0,2571μmol L^{-1}. Esses parâmetros foram calculados pelas equações abaixo, onde Sb é o desvio padrão referente aos brancos e S é a inclinação da reta obtida pela equação da reta da curva analítica.

$$\boldsymbol{LD} = \frac{3xSb}{S} \qquad \boldsymbol{LQ} = \frac{10xSb}{S}$$

Figura 14: Voltamogramas de VOQ 0,25 até 8,00 µmol L^{-1} de DCFI em 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7.2, os parâmetros utilizados foram a: 50mV, ΔEs: 2mV e f: 150 s^{-1} **(A)**. Curva de calibração construída com os dados da Figura 11A bem como a respectiva equação da reta **(B)**, com r=0,998.



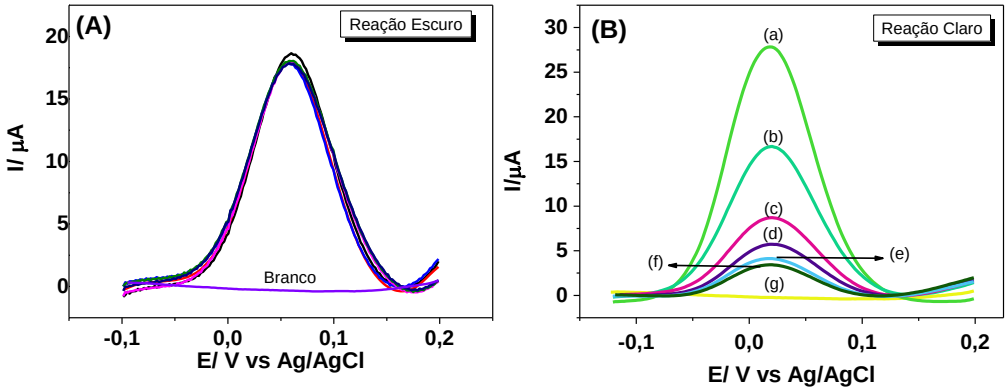
Fonte: Próprio autor.

4.5. Abordagem eletroquímica para reação de Hill

O comportamento eletroquímico do DCFI indica que a oxidação do grupo fenólico apresenta uma onda bem definida em potenciais ao redor de + 0, 05 V na voltametria de onda quadrada, com potencialidades de ser utilizado como sonda eletroquímica para a atividade fotossintética.

Para isto, avaliou-se nesta etapa a possibilidade de uso do mediador redox DCFI como sinalizador do material fotossintético. Deste modo, o eletrodo de carbono vítreo foi inserido em solução de 0,1 mol L^{-1} PBS, pH 7,2 com adição do material fotossintético (cloroplastos intactos, cloroplastos quebrados e membranas tilacóides e fotossistemas (I e II)). O sistema foi monitorado em tempos entre 0 a 5 minutos no escuro, onde a célula eletroquímica foi envolvida com papel alumínio e, no claro, onde a célula eletroquímica foi submetida a irradiação externa (UV/Vis) utilizando uma lâmpada com potência de 125W, Figura 15.

Figura 15: Voltamogramas de onda quadrada na presença de 0,59 mmol L- 1 de DCFI em 0,1 mol L- 1 PBS pH 7.2 e material fotossintético, onde em (A) reação acontecendo no escuro e em (B) reação acontecendo no claro, onde em (a) medida realizada no momento em que adiciona o DCFI, (b) a medida após 1minuto de exposição a luz, (c) a medida após 2 minutos de exposição a luz, (d) a medida após 3minutos de exposição a luz, (e) a medida após 4 minutos de exposição a luz, (f) a medida após 5minutos de exposição a luz e (g) branco. Branco é a solução de 0,1mol L-1 de PBS + material fotossintético.



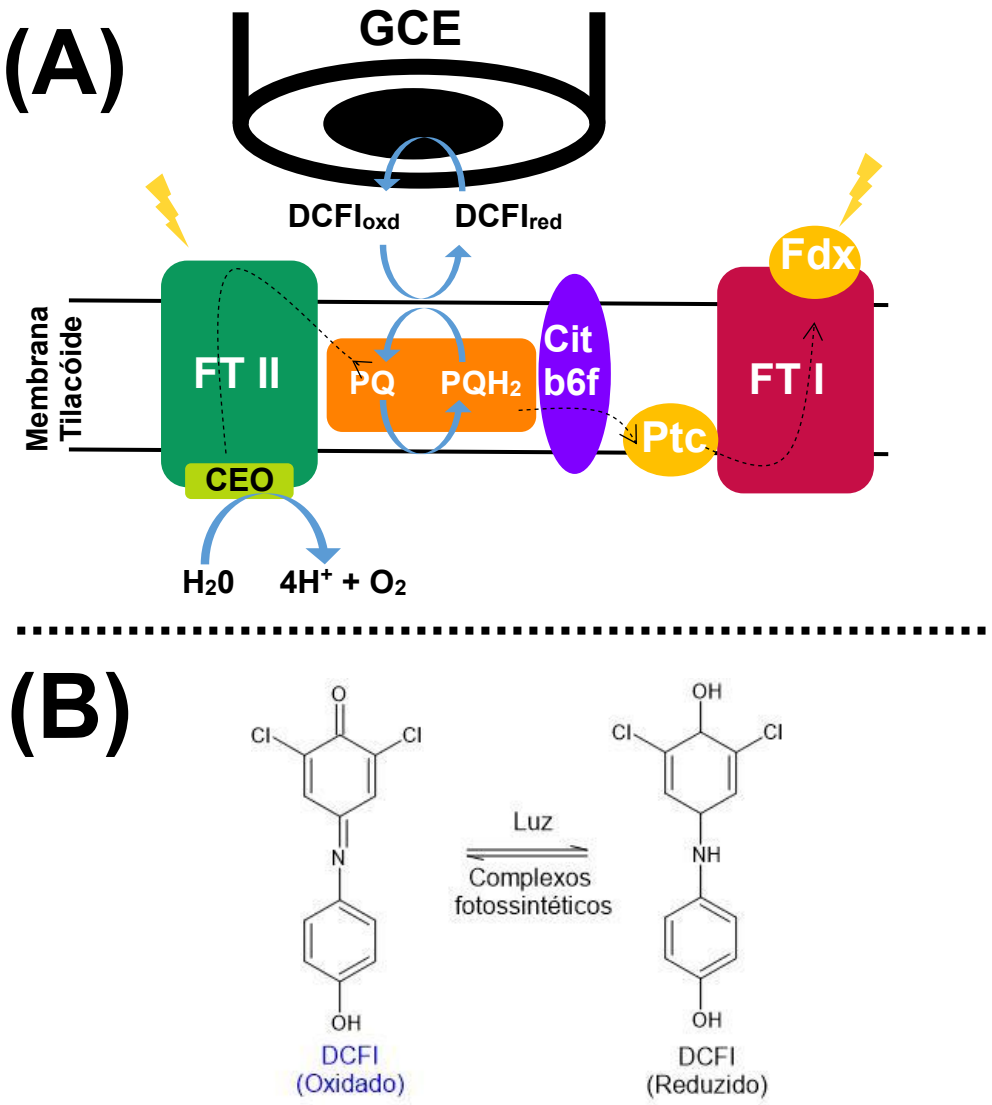
Fonte: Próprio autor.

A Figura 15 apresenta os respectivos voltamogramas de onda quadrada registrados no intervalo de potencial de -0, 10 V até +0, 20 V, utilizando os parâmetros otimizados de frequência: 150 Hz, amplitude: 50 mV e incremento: 2 mV, em tempos de irradiação entre 0 e 5 minutos. Observa-se na Figura 15(A) em um tempo com 5 minutos com a reação acontecendo no escuro, não houve mudanças significativas na corrente de pico anódica do DCFI. Isto está atribuído principalmente a necessidade da exposição a luz para que os componentes responsáveis pela fase clara, exerçam sua atividade na cadeia transportadora de elétrons na fotossíntese. Porém na Figura 15 (B) a qual representa a reação de Hill em exposição a luz, o sinal de corrente proveniente do DCFI decaiu aproximadamente ~78%. O processo bioquímico envolvido no decaimento do sinal da sonda é devido aos eventos que ocorrem em estruturas localizadas nos cloroplastos, nas membranas tilacóides (MT). Então, nas MT, inicialmente ocorre a fotoexcitação do complexo fotosistema II impulsionada pela luz, que resulta na oxidação da água em O_2. Os elétrons produzidos a partir dessa reação são transferidos através de uma série de portadores de elétrons (plastoquinona, citocromo b6f, plastocianina e ferrodoxina), para o fotosistema I, no qual são novamente excitados. A redução do DCFI ocorre quando a molécula chega nos

portadores de elétrons, na plastoquinona, está na forma oxidada é reduzida a plastoquinol, e é nesta fase que o DCFI na forma oxidado é reduzido, então a forma reduzida é oxidada novamente, este processo é ilustrado na Figura 16 (VIVIANI, 2016; JOHNSON, 2017). Podendo assim a transferência de elétrons, ser monitorada de maneira simples, pela oxidação da sonda DCFI sobre a superfície do GCE, utilizando-se da técnica de VOQ.

Por fim, ambos as metodologias abordadas para a reação de Hill, tanto por espectroscopia quanto por eletroquímica, podem ser aplicadas de maneira satisfatória para a verificação do processo de transferência de elétrons provenientes do material fotossintético extraído de folhas de espinafre.

Figura 16:(A) Esquema proposto para o mecanismo de transferência de elétrons das membranas tilacóides (suspensas em solução) para o GCE por meio dos complexos proteicos diferentes, por exemplo, FTI, PQ, Citb6f, Ptc, FTI e Fdx. Para simplificação, outros componentes das membranas tilacóides não são mostrados. (B) Reação de redução química do DCFI na presença dos complexos fotossintéticos e luz.



Fonte: Próprio autor.

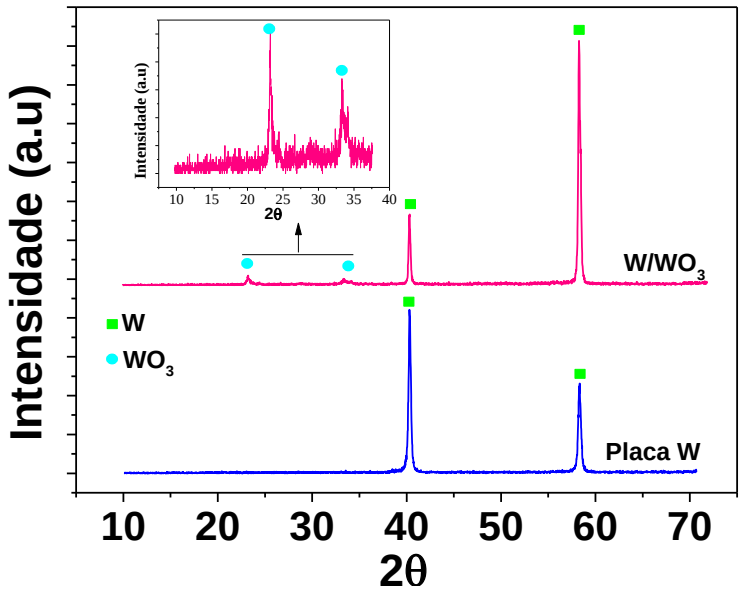
4.6. Etapas de construção do sistema foto-bioeletroquímico

4.6.1. Caracterização estrutural, morfológica e fotocatalítica do eletrodo W/WO_3

Neste tópico serão discutidos a estrutura e morfologia do eletrodo de W/WO_3. São apresentados na Figura 17, os difratogramas de raio-x (DRX)

obtidos da placa de W antes e depois da formação do filme de WO_3 por meio da técnica de anodização. Os picos posicionados em 2θ=~40,4º e 2θ=~58,4º podem ser atribuídos ao tungstênio metálico. Após a formação dos filmes, observa-se um agrupamento de picos localizados em (2θ = 23,06; 2θ= 23,71; 2θ =24,36; 2θ = 33,16 2θ = 33,65 e 2θ= 34,00) característico do WO_3 em sua fase monoclínica, fase fotoativa do óxido (SOUZA et al., 2017).

Figura 17: Difratogramas de Raios-X obtidos para a placa de W e após a formação do filme de WO_3 em meio de NH_4F 0,7% com Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1}, aplicando-se 40 V por um período de 15 minutos.

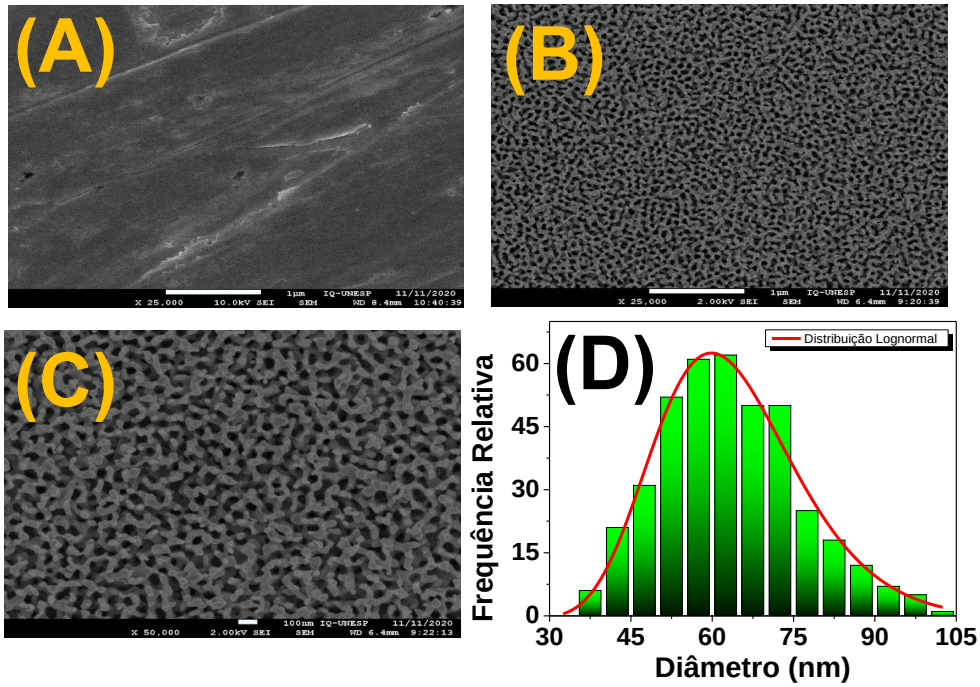


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 18 são mostradas as imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) do eletrodo antes e depois da formação do filme de WO_3 construído por meio de anodização da placa de W (1,0 cm^2) em meio de NH_4F 0,7% (p/V) com Na_2SO_4 0,1mol L^{-1} sob potencial controlado de 40V por um tempo de 15 minutos. A Figura 18(A) corresponde a superfície da placa de W relativamente lisa. Com a imagem da Figura 18(B) é possível evidenciar a formação uniforme do filme de WO_3 apresentando uma morfologia nanoporosa. A Figura 18(C) é referente ao filme de WO_3 com uma magnificação maior. A Figura

18(D) representa o histograma de distribuição de tamanho dos nanoporosa formados e a curva de distribuição LogNormal, onde foi possível encontrar o valor de diâmetro médio dos nanoporosa de WO_3 formado, onde foi possível encontrar o valor de diâmetro médio dos nanoporos de WO_3 formado, cujo valor correspondente à 62,6nm.

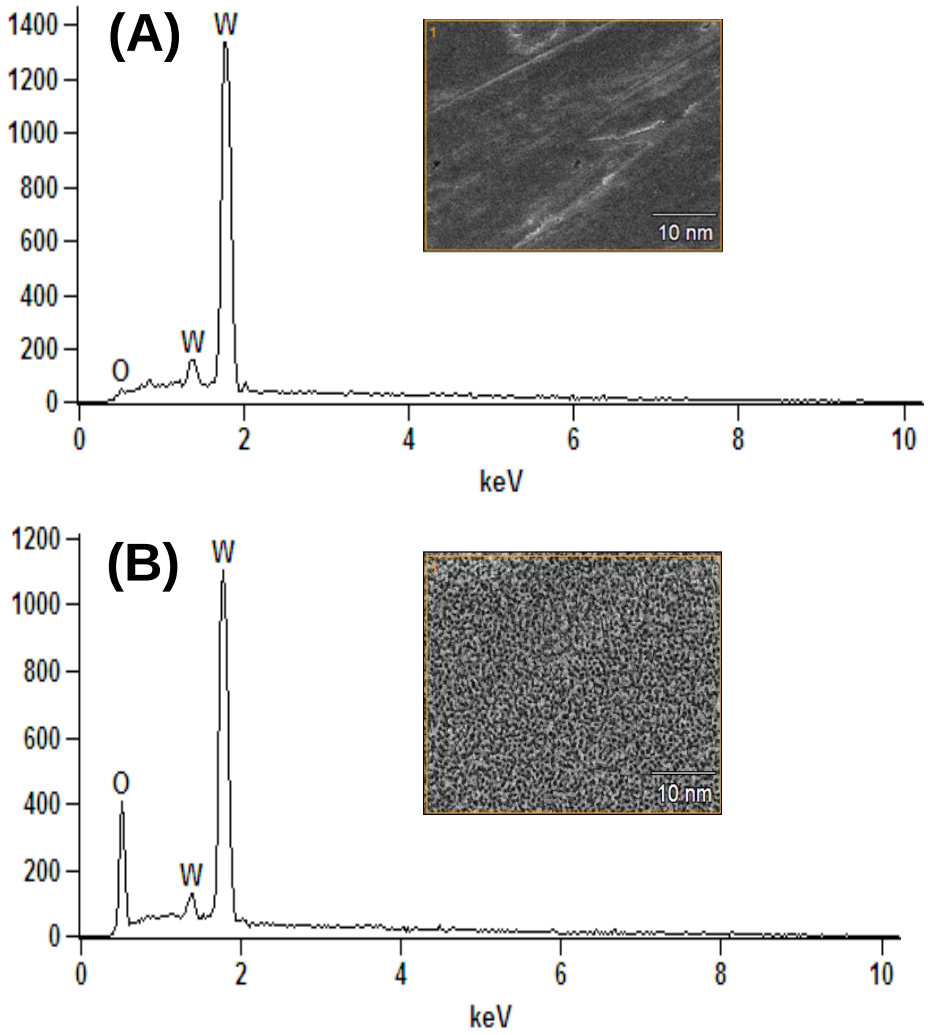
Figura 18: Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) da placa de W, com magnificação de 25,000x **(A)**, eletrodos de W/WO_3 preparados por anodização em meio de NH4F 0,7% e Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1}, 40 V, 15 minutos 25,000x **(B)**, filme de WO_3 com magnificação de 50,000x **(C)** e histograma de distribuição de tamanho dos poros **(D)**.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 19 são apresentados os espectros de EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) para a placa de W, Figura 19(A), e para o eletrodo de W/WO_3, Figura 19(B). O espectro mostra a presença dos elementos tungstênio e oxigênio, sugerindo a formação do trióxido de tungstênio. Para a obtenção deste dado, foi utilizada uma voltagem de aceleração de 10 kV.

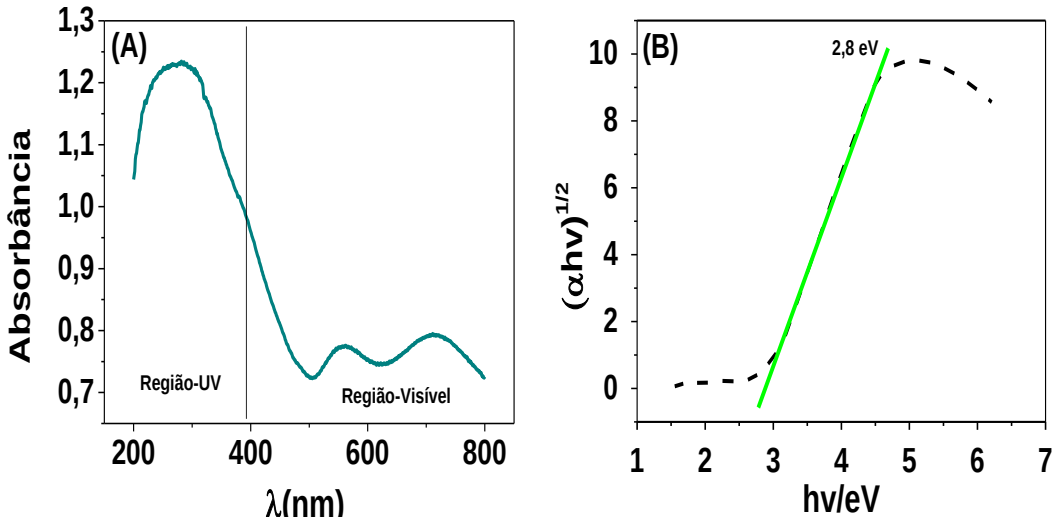
Figura **19:**Imagem de microscopia eletrônica de alta eficiência com o respectivo resultado das análises de EDS da região escolhida da placa de W **(A)** e do eletrodo após a formação do filme de WO_3 **(B)**.



Fonte: Próprio autor.

A curva de reflectância difusa registrada para o eletrodo de W/WO_3 é mostrado na Figura 20(A). O material apresentou bandas de máxima absorção em comprimento de onda menor que 450 nm, mas também bandas de absorção na região de 550 e 650 nm, mostrado que absorve na região do visível e do UV. O resultado representado na Figura 20(B) é o gráfico proposto por Kubelka-Munk, permitindo estimar os valores da energia de banda proibida (Ebg). A partir da construção do gráfico de Tauc foi calculado a E_{bg} para o eletrodo de W/WO_3, E_{bg}= 2,8eV, dado esse equivalente ao encontrado para o WO_3 na literatura (SOUZA et al., 2017; KALANUR et al., 2018).

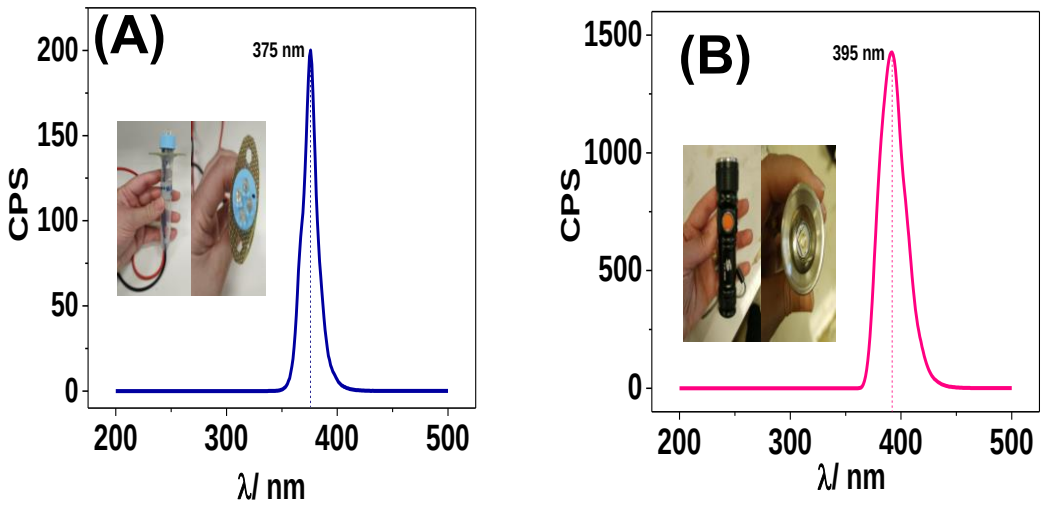
Figura 20: Curva de reflectância difusa obtida para o eletrodo de W/WO_3 **(A).** Gráfico de Tauc construído para o cálculo do band gap do eletrodo de W/WO_3 obtido **(B)**.



Fonte: Próprio autor.

Além disso, para desenvolver o sensor foto-bioeletroquímico investigou-se a possibilidade de irradiar o eletrodo de W/WO_3 com dois sistemas de iluminação LED, em máxima absorção de 375 nm (LED 1) e absorção em 395 nm (LED2). Os respectivos espectros de emissão destes sistemas de irradiação foram registrados e mostrados na Figura 20.que comprovam a região de emissão desses sistemas de luz.

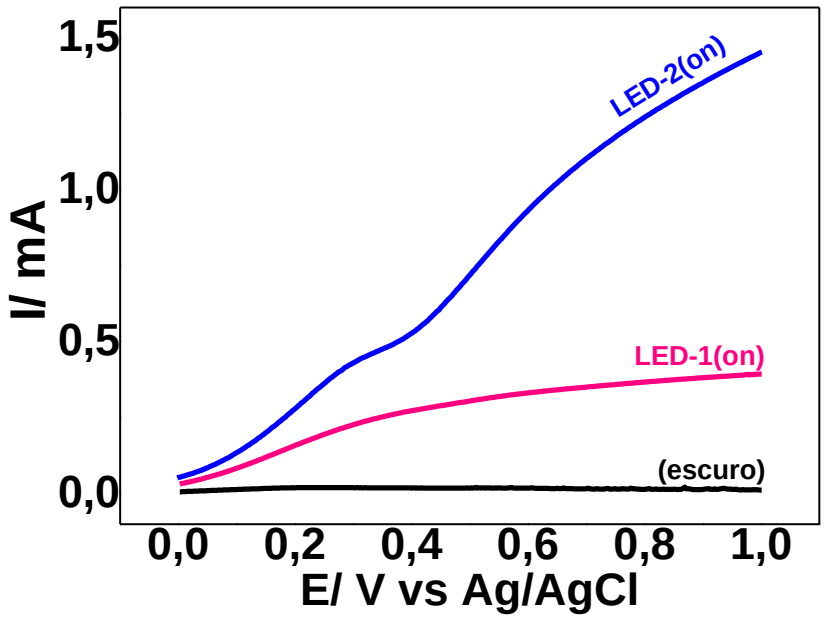
Figura 21: Espectros de emissão dos dispositivos **(A)** LED-1 e **(B)** LED-2.



Fonte: Próprio autor.

A seguir investigou-se o efeito da irradiação com ambos os LEDs sobre o eletrodo de W/WO_3 em meio aquoso de 0,1 mol L^{-1} de PBS pH 7,0. A Figura 22 mostra curvas de fotocorrente vs potencial obtidas no escuro e sobre irradiação com os LEDs. Ao contrário do escuro que não apresenta fotocorrente, ambos os LEDS propiciam a geração de fotocorrente. No entanto, o sistema LED-1 (curva rosa) apresentou uma fotocorrente menor do que o sistema de LED-2 nos eletrodos de W/WO_3. Este comportamento está relacionado a irradiância emitida pelos sistemas de LED-1 (8,87 mW/cm^2) é menor que fotocorrente gerada com o LED-2 (60,33 mW/cm^2), indicando maior fotoexcitação do material e, portanto, foi escolhido nos experimentos futuros.

Figura 22: Curvas de Fotocorrentes *vs* potencial geradas sobre eletrodo de W/WO_3 em 0,1 mol L^{-1} de PBS pH 7,0 no escuro e irradiados pelo sistema de LEDS e. v= 10mV s^{-1}



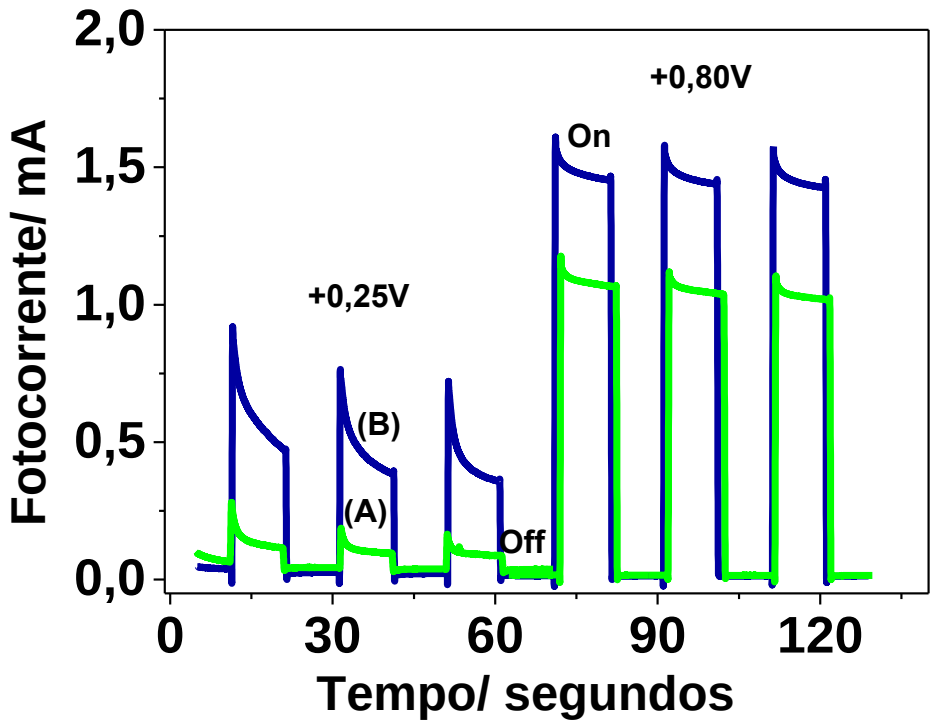
Fonte: Próprio autor.

Foi avaliado também a influência do eletrólito de suporte nas respostas de fotocorrente sobre o eletrodo de W/WO_3, para isso foi realizado experimentos de croanoamperometria para obter uma geração quantitativa de fotocorrente pela aplicação de um potencial de +0,25V e +0,80V em um período de 120 segundos,

garantindo um potencial grande o suficiente para a foto-oxidação da H_2O. O eletrodo foi então exposto à luz por 10 segundos (indicado na figura como 'On') e 10 segundos com a luz apagada (indicado na figura como 'Off'), conforme indicado na Figura 23.

O eletrodo foi testado em eletrólitos constituídos por 0,1mol L^{-1} de PBS (curva em azul) e 0,1mol L^{-1} de Na_2SO_4 (curva em verde) ambos em pH 7,0. As respostas de fotocorrente obtidas em meio de PBS foram superiores comparadas com meio de Na_2SO_4. Em meio de PBS à fotocorrente gerada foi de 0, 50 mA no potencial de + 0, 25 V e de 1, 48 mA sob potencial de + 0, 80 V. Quando comparado a fotocorrente em Na_2SO_4, observa-se valores de 0,12 mA para o potencial de + 0, 25 V e 1,08 mA para o potencial de +0,80V. Diante disto para as próximas etapas o eletrólito escolhido foi o PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Os experimentos também mostram que a fotocorrente obtida em ambos os eletrólitos são reprodutíveis, com valores aproximadamente constantes para 3 ciclos de on/off.

Figura 23: Fotocorrentes obtidas pelo eletrodo de W/WO_3 em diferentes eletrólitos de suporte **(A)** Na_2SO_4 0,1 mol L-1 (curva verde) e **(B)** PBS 0,1 mol L^{-1} (curva azul) ambos em pH 7,0. Aplicando potencial de +0,25V e +0,80V.

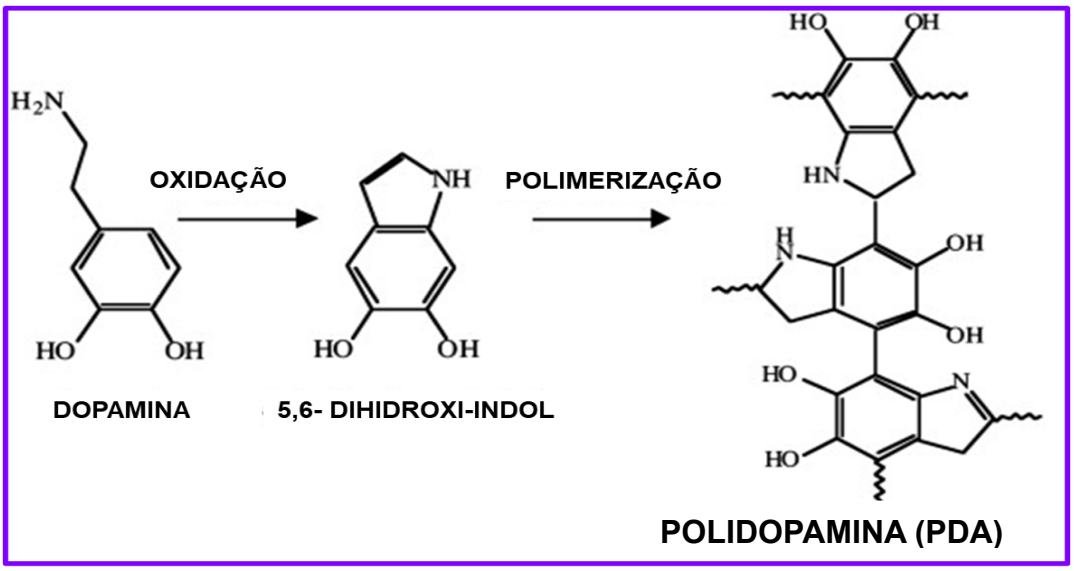


Fonte: Próprio autor.

4.6.2. Modificação do eletrodo de W/WO_3 com filmes de polidopamina

Visando melhorar a eficiência fotoeletrocatalítica do eletrodo produzido, a construção dos eletrodos de W/WO_3 foi investigada usando polidopamina (PDA) como agente ancorante. Tal metodologia é baseada na reação de polimerização da dopamina na superfície do substrato, formando a PDA in situ, Figura 24.

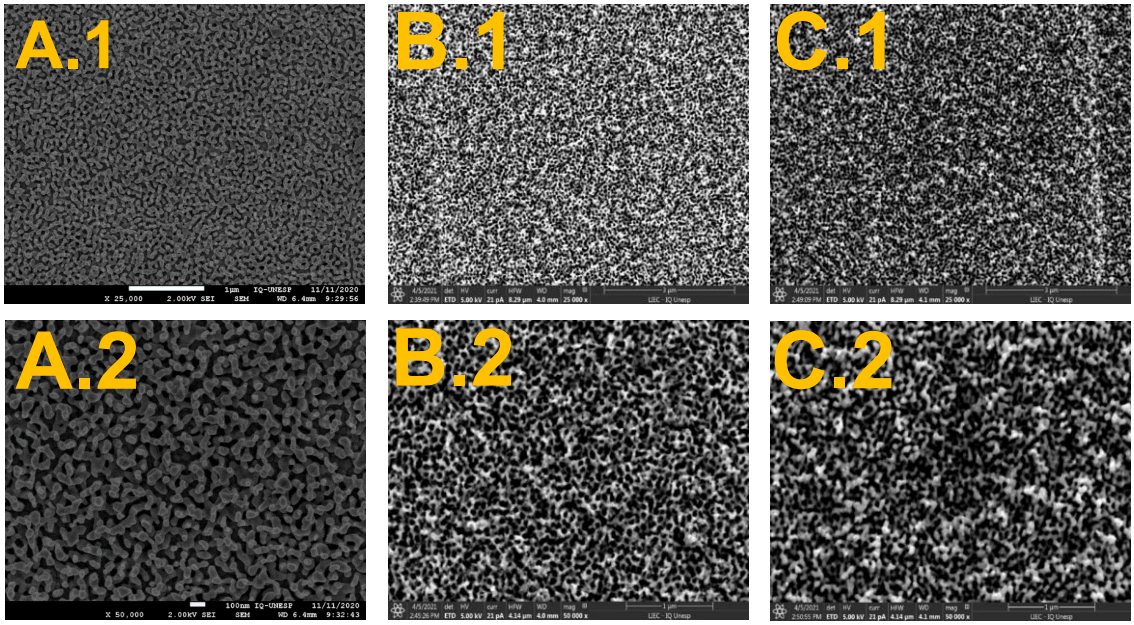
Figura 24: Reação de polimerização da dopamina.



Fonte: Adaptado de (VASELBEHAGH et al., 2014).

A polidopamina foi testada como meio ancorante dos cloroplastos. Deste modo, inicialmente analisou-se com a adição de dopamina altera as características do eletrodo. As imagens de micrografias eletrônicas da superfície do eletrodo de W/WO_3 modificado com o filme de polidopamina (PDA), em diversos tempos de formação do filme (2, 4 e 6 horas) estão indicadas na Figura 25 (A, B e C) respectivamente. O filme de PDA formado sobre a superfície do eletrodo de W/WO_3 em diversos tempos não ocasionou a perda da morfologia inicial do eletrodo, isto está associado a capacidade da PDA de se polimerizar moldando ao seu substrato (LIU et al., 2014).

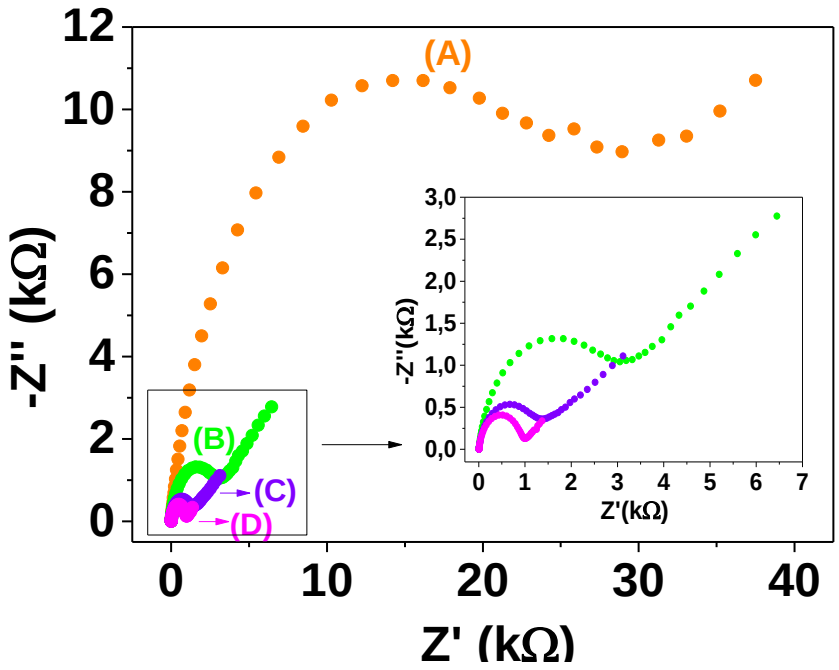
Figura 25: Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução (FEG-MEV) do eletrodo de W/WO3 modificados com filmes de PDA em diversos tempos de polimerização **(A)** filme de 2 horas, **(B)** filme de 4 horas e **(C)** filme de 6 horas. Onde **(A.1, B.1, C.1)** são magnificações de 25,000x e **(A.2, B.2, C.2)** são magnificações de 50,000x.



Fonte: Próprio autor.

Além do estudo da morfologia do eletrodo modificado, foi estudado ainda o comportamento da interface dos eletrodos quando modificados com o filme polimérico, pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). A Figura 26 compara as curvas de EIS para o eletrodo de W/WO_3 antes e após a modificação com filme de PDA usando o sistema de ferricianeto como sonda redox. Para os eletrodos de W/WO_3 sem modificação com filmes de polidopamina observa-se um gráfico de Nyquist com alta resistência de transferência de carga (R_{tc}), o que já era previsto uma vez que materiais semicondutores podem apresentar alta resistência de transferência de carga. Em relação ao eletrodo modificado com filme de PDA, a R_{tc} vai diminuindo drasticamente em função do aumento da espessura do recobrimento obtido com o aumento do tempo de deposito de 2 a 6 horas, como mostra a Figura 26 (curvas (b) > (c) > (d)). E estes resultados indicam que o aumento da espessura dos filmes de PDA aumenta a melhora a transferência de carga e consequentemente e aumentam a condutividade elétrica do eletrodo (LIU et al., 2014).

Figura 26: Diagramas de Nyquist obtidos **(A)** com eletrodo de W/WO3 sem modificação e modificado com a PDA em diferentes tempos, **(B)** 2 horas, **(C)** 4 horas e **(D)** 6 horas. Medidas realizadas em meio de ferricianeto de potássio 5,0x10^{-3}mol L^{-1} preparada em 0,5 mol L^{-1} de KCl.

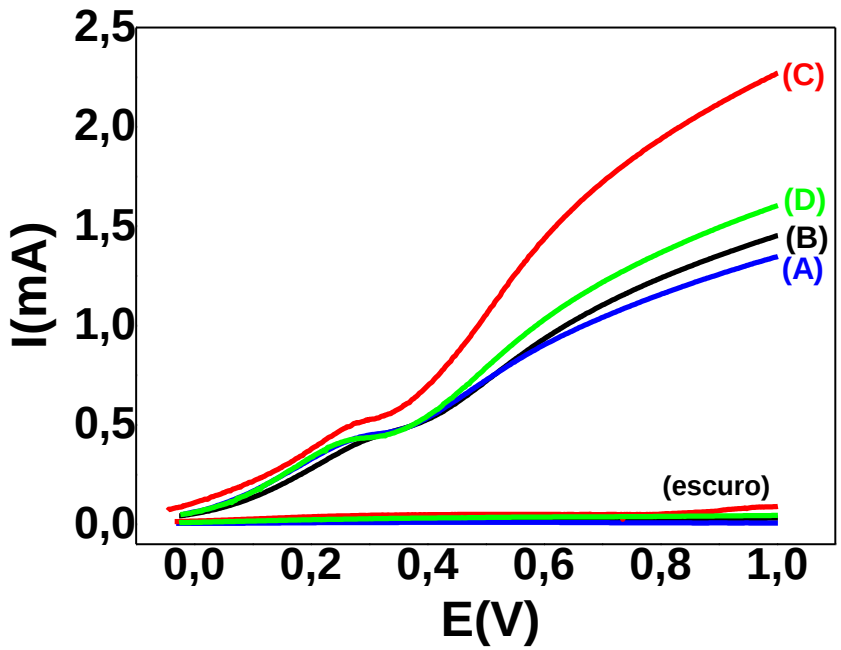


Fonte: Próprio autor.

A Figura 27, mostra gráficos de fotocorrente para o eletrodo de W/WO$_3$ em tampão PBS pH 7,0 antes e após modificações com os filmes de PDA foto-excitados por luz LED. Durante a varredura de potencial, as fotorresposta geradas para o eletrodo de W/WO$_3$, Figura 27 (A), aumentou proeminentemente, após as modificações com o filme PDA. A Figura 27 (B), representa o eletrodo com o filme de 2 horas (W/WO$_3$-PDA2h), Figura 27 (C) filme de 4 horas (W/WO$_3$-PDA4h) e Figura 27 (D) filme de 6 horas (W/WO$_3$-PDA6h).

As fotocorrentes obtidas na Figura 27 (C) foram superiores à aquelas obtidas na Figura 27 (B), isto porque há um limite no tempo de polimerização, onde o filme de polidopamina fotoexcita o eletrodo. Porém, após 6 horas, há um recobrimento excessivo do semicondutor, diminuindo suas propriedades fotocatalíticas.

Figura 27: Fotocorrentes geradas em **(A)** eletrodo de W/WO3 sem modificação, **(B)** W/WO3-PDA2h, **(C)** W/WO3-PDA4h e **(D)** W/WO3-PDA6h. Utilizando voltametria de varredura linear com v= 10mV s-1 em meio de 0,1 mol L-1 PBS pH 7,0.



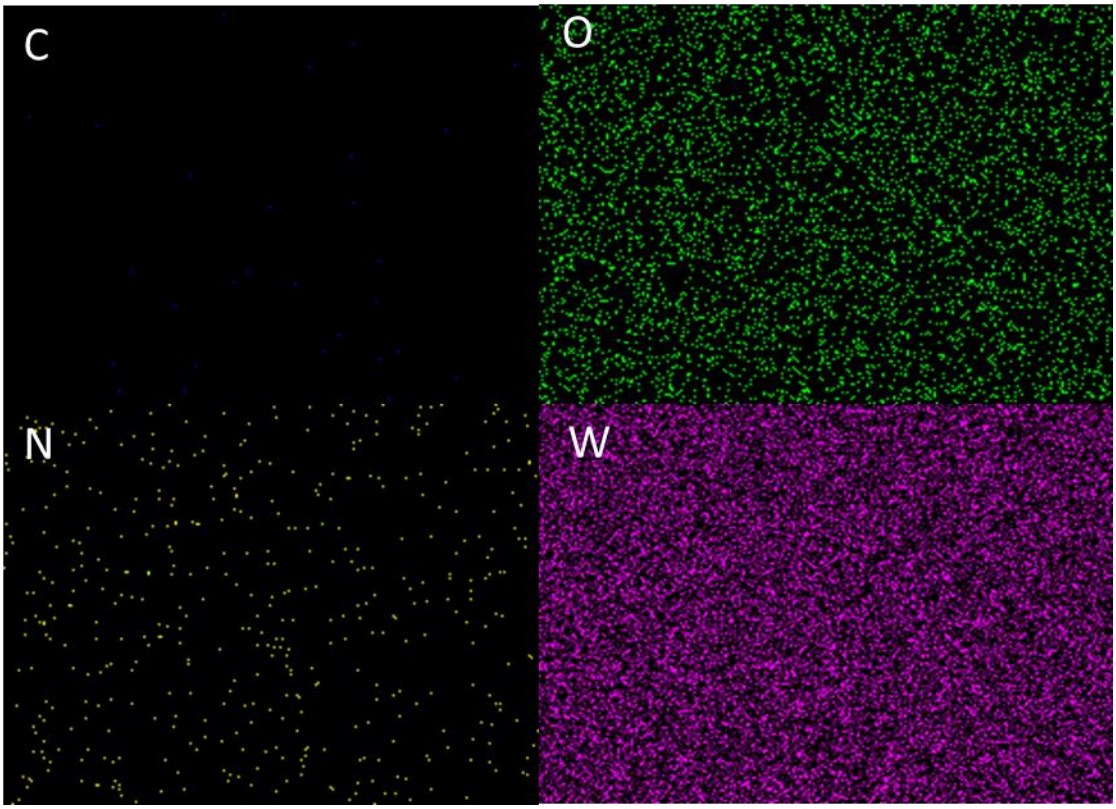
Fonte: Próprio autor.

Foi estudado também as respostas de fotocorrente obtidas depois de modificar o eletrodo de W/WO_3 com filme de polidopamina em um tempo de 4 horas pela técnica de cronoamperometria aplicando potenciais de +0,25 V e +0,80 V por um tempo de 200 segundos utilizado o LED-2, mostrado na Figura 29. Pode se observar que após a modificação com o filme de polidopamina houve um acréscimo de ~20% (0,6 mA) na fotocorrente produzida em potencial de +0, 25 V e ~33% para o potencial de +0, 80 V. Estes dados validam que a PDA realmente pode atuar como um sensibilizador para melhorar o desempenho fotoeletroquímico do semicondutor estudado, melhorando sua condutividade, encurtando a distância de difusão do portador, melhorando a eficiência de coleta de luz e eficiência de coleta de carga (LIU et al., 2014; YU et al., 2019).

A Figura 28 mostram os mapas de distribuição elementar do eletrodo de WO_3 modificados com filme de PDA-4horas, o qual mostraram a maior presença dos elementos de W (rosa) e O (verde). Isto se deve à composição do substrato,

onde os elementos C e N estiveram presentes em proporções menores, em relação aos demais elementos, como era de se esperar por estarem associados ao revestimento do eletrodo de WO_3 com a PDA.

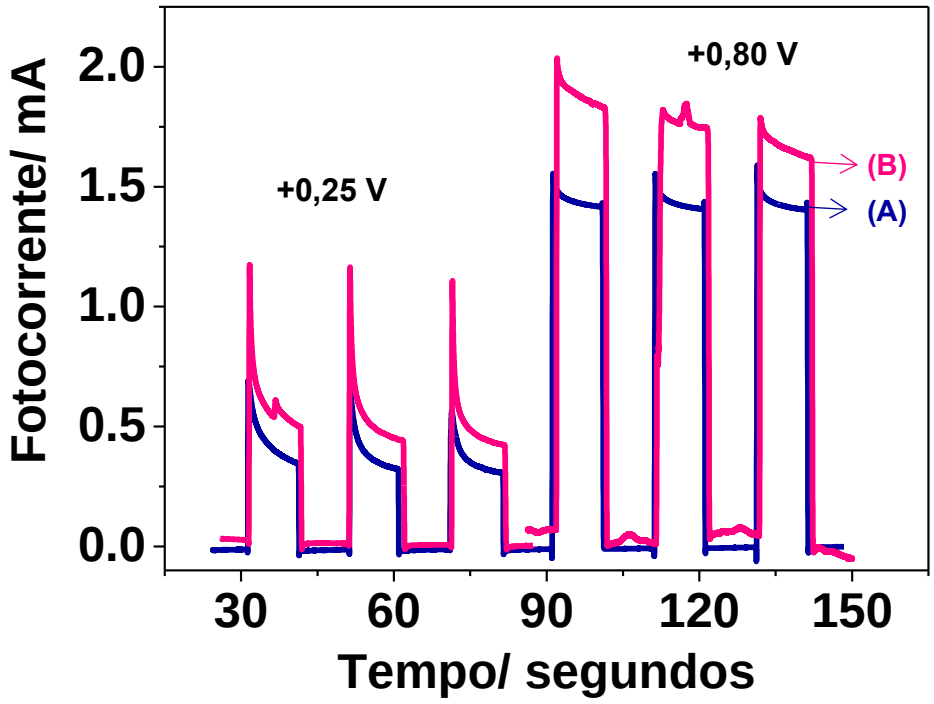
Figura 28: Mapeamento elementar do eletrodo de WO_3/PDA-4h.



Fonte: Próprio autor.

Para as próximas etapas foi investigada a geração de fotocorrente utilizando a PDA como agente ancorante dos cloroplastos intactos. O potencial escolhido foi de +0,25V para garantir a estabilidade da organela celular sobre o eletrodo.

Figura 29: Fotocorrentes obtidas em **(A)** eletrodo de W/WO_3, **(B)** WO_3-PDA4h em meio de 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0.

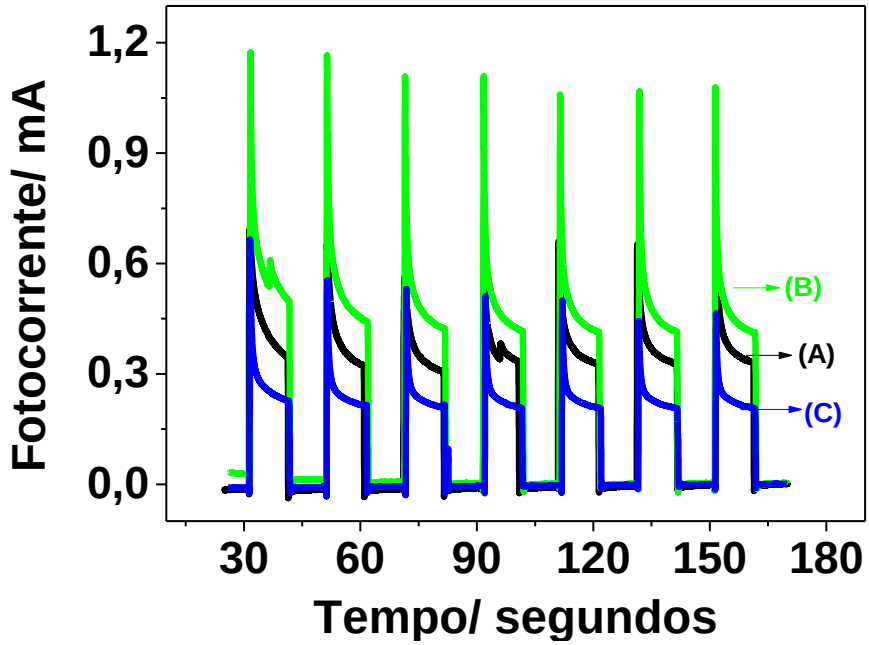


Fonte: Próprio autor.

4.6.3. Imobilização dos cloroplastos intactos sobre a superfície do eletrodo de WO_3-PDA

Inicialmente foi investigado a imobilização dos cloroplastos intactos sobre a superfície do eletrodo de WO_3/PDA, utilizando uma [Cloroplastos]=1,5 mg mL^{-1} e um tempo de imobilização de 1 hora e as curvas de fotocorrente obtidas estão mostradas na Figura 30. Pode-se observar que houve um decaimento na fotocorrente de ~42% após a imobilização dos cloroplastos, Figura 30 (C), em relação ao eletrodo de WO_3/PDA, Figura 30 (B) e ao eletrodo de WO_3, Figura 30 (A). Isto se deve a alta concentração de cloroplastos, conforme mostrado na microscopia confocal na Figura 8, na superfície do eletrodo que dificultou a passagem de luz pelo eletrodo, por consequência diminuindo a intensidade da fotocorrente produzida.

Figura 30: Fotocorrentes obtidas em **(A)** eletrodo de W/WO_3, **(B)** WO_3/PDA e em **(C)** WO_3/PDA/Cloroplastos em meio de 0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0 aplicando E=+0,25V.



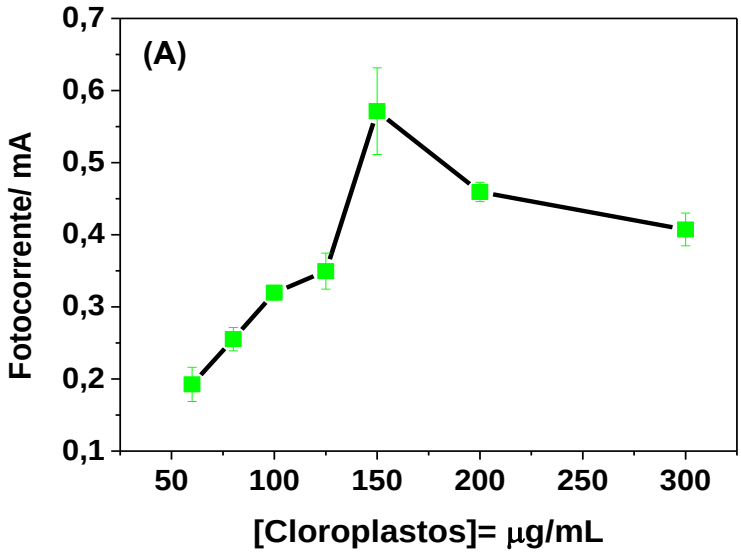
Fonte: Próprio autor.

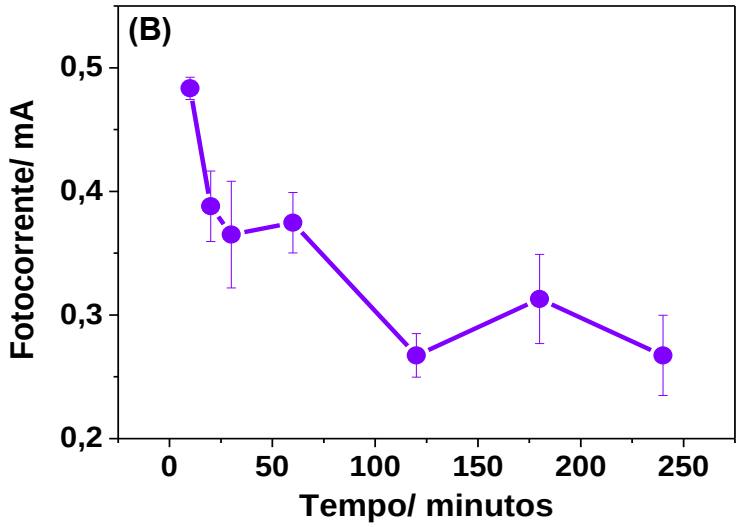
Para compreender o efeito da concentração de cloroplastos na fotocorrente gerada, curvas de cronoamperometria foram registradas em várias concentrações de cloroplastos (60 até 300µg mL^{-1}), e os resultados são exibidos na Figura 31 (A). A fotocorrente aumentou com o aumento da concentração de cloroplastos até 150µg mL^{-1}. Esse resultado é esperado, pois as proteínas presentes nas membranas tilacóides, que estão localizadas dentro dos cloroplastos, é a fonte de geração de fotocorrente a partir da oxidação fotoexcitada da água. Entretanto, se a concentração de cloroplastos for aumentada para mais de 150µg mL^{-1}, pode observar a diminuição da fotocorrente. Isto se deve a soluções altamente concentradas evitam que a iluminação atinja a superfície do eletrodo de trabalho, resultando em uma fotocorrente consideravelmente reduzida. Portanto, a condição otimizada para os próximos experimentos foi considerada a concentração de cloroplastos igual a 150µg mL^{-1}.

A próxima etapa avaliada foi o tempo de imobilização dos cloroplastos, o qual é exibida na Figura 31 (B). Os valores de tempo estudados foram (10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos), o que observa é que em um tempo de 10 minutos a fotocorrente foi maior, cerca de ~0,49mA, em relação aos outros tempos

avaliado. Isto pode estar acontecendo devido à característica da PDA de agir como um forte agente aderente e a estrutura celular do cloroplasto, por se tratar de uma organela com um tamanho ~ 0,5µm (relativamente grande) o processo adsortivo entre a PDA e a organela aconteça mais rapidamente. Já para tempos <10minutos a fotocorrente gerada decai consideravelmente, uma explicação para este fenômeno seria aos processos de dessorção envolvidas nas etapas de imobilização dos cloroplastos sobre a superfície do eletrodo (SALAZAR et al., 2007).

Figura 31: (A) A relação da fotocorrente em diferentes concentrações de cloroplastos. **(B)** E relação da fotocorrente em diferentes tempos de imobilização. As medidas foram realizadas em meio de PBS 0,1 mol L-1 em pH 7,0 aplicando E=+0,25V.

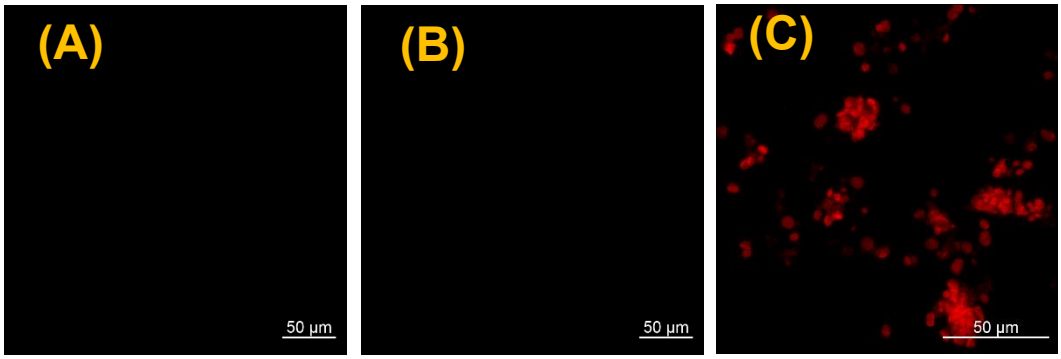




Fonte: Próprio autor.

Uma das propriedades inerentes a PDA é o seu poder de ancoramento e a biocompatibilidade para imobilizar biomoléculas (LIU et al., 2014), diante disto foi investigado usando a microscopia confocal de fluorescência (Figura 32). As imagens de confocais mostram que o eletrodo de WO_3 e o eletrodo após a modificação com filme de PDA não apresentou fluorescência (Figura 32 A e 32 B), porem ao adicionar os cloroplastos sobre a superfície do eletrodo pode observar a autofluorescência da clorofila (aparência opaca, brilhante e semelhante a um halo) indicando que os cloroplastos foram efetivamente ancorados sobre a superfície do eletrodo (Figura 32 C).Este dados corroboram com dados da literatura, garantindo que a PDA atua como um ótimo agente aderente para os cloroplastos (LILLEY et al., 1975; HASAN et al., 2017b; WELIWATTE et al., 2021).

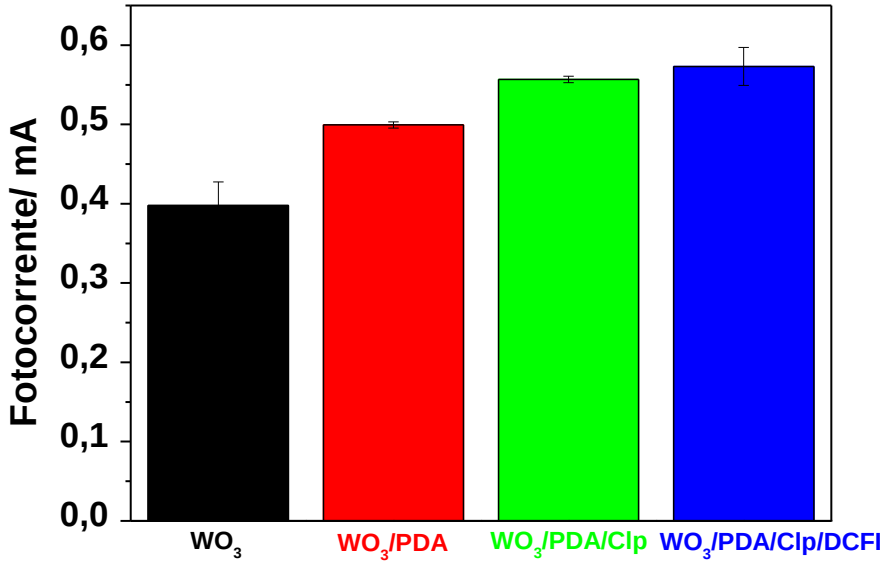
Figura 32: Imagens de microscopia confocal de fluorescência, onde em **(A)** eletrodo de WO_3, em **(B)** eletrodo de WO_3/PDA e em **(C)** eletrodo de WO_3/PDA/Cloroplastos. Utilizando uma objetiva de 40x com imersão em óleo.



Fonte: Próprio autor.

Foi investigado a influência do DCFI como mediador de elétrons na resposta de fotocorrente, Figura 33. Como pode ser observado na presença do DCFI houve um pequeno acréscimo na fotocorrente cerca de 3,7 %. Na literatura (HASAN et al., 2014), foi investigada a comunicação de diferentes mediadores de elétrons em membranas tilacóides, dentre eles o DCFI, o qual obteve uma resposta inferior às outras moléculas estudadas como, por exemplo, p-benzoquinona e seus derivados. A explicação dada pelo autor e que pode ser atribuída à sua estrutura (sistemas de anéis aromáticos estendidos) e baixa solubilidade provenientes do DCFI, por consequência gerando fotocorrentes mais baixas.

Figura 33: Comparação da geração de fotocorrente mediada nas etapas de montagem do dispositivo fotobioeletroquímico, WO_3 (preto), WO_3/PDA (vermelho), WO_3/PDA/Clp (verde) e WO_3/PDA/Clp/ DCFI (azul) na presença de 60µM de DCFI dissolvido no eletrólito. Condições: eletrólito, 0,1mol L-1 PBS pH 7,0 e E= +0,25V. Onde Clp= cloroplastos e sob iluminação de LED-2 (395nm).



Fonte: Próprio autor.

5. Conclusão

Por meio dos resultados obtidos, foi extraído e caracterizado uma solução rica em material fotossintético de folhas de espinafres. Investigou-se ainda o comportamento eletroquímico do composto DCFI sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, bem como o desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica simples e rápida visando a aplicação eletroquímica para a reação de Hill usando uma suspensão rica em material fotossintético em solução na ausência e na presença de luz utilizando-se da técnica de voltametria de onda quadrada utilizando o DCFI como mediador artificial de elétrons. Além disso, foi construído e caracterizado um eletrodo semicondutor de W/WO_3 como substrato, onde foi imobilizado cloroplastos intactos a partir de filmes de polidopamina construídos previamente como agente ancorante e testou-se o comportamento fotoeletrocatalítico do material imobilizado sobre eletrodo de W/WO_3. Também foi construído e caracterizado os sistemas de iluminação LED.

6. Perspectivas

Para finalizar o trabalho algumas atividades ainda são necessárias como realizar os testes de on e off (cronoamperometria) utilizando outros sistemas de iluminação, visando uma melhor performance dos cloroplastos na geração de fotocorrente, além de comparar a eficiência de outras moléculas como mediadores artificiais de elétrons entre os cloroplastos e a superfície do eletrodo de WO_3 modificados com polidopamina, como o uso de p-benquinona. Por fim, afim de confirmar a fonte de geração da fotocorrente proveniente dos cloroplastos é necessário realizar testes com moléculas que inibem a fotossíntese, como alguns herbicidas (diuron, atrazina ou simainza).

7. Referências

ARNON, D. I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.

BARD, A; FAULKNER, L. Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, New York: Wiley, 2001. **Russian Journal of Electrochemistry**, 2002.

BEAM, J. C.; LEBLANC, G.; GIZZIE, E. A.; et al. Construction of a Semiconductor–Biological Interface for Solar Energy Conversion: p-Doped Silicon/Photosystem I/Zinc Oxide. **Langmuir**, v. 31, n. 36, p. 10002–10007, 2015.

BUNEA, A.-I.; HEISKANEN, A.; PANKRATOVA, G.; et al. Micropatterned Carbon-on-Quartz Electrode Chips for Photocurrent Generation from Thylakoid Membranes. **ACS Applied Energy Materials**, v. 1, n. 7, p. 3313–3322, 2018.

CAI, P.; FENG, X.; FEI, J.; et al. Co-assembly of photosystem II/reduced graphene oxide multilayered biohybrid films for enhanced photocurrent. **Nanoscale**, v. 7, n. 25, p. 10908–10911, 2015.

CALKINS, J. O.; UMASANKAR, Y.; O'NEILL, H.; RAMASAMY, R. P. High photo-electrochemical activity of thylakoid–carbon nanotube composites for photosynthetic energy conversion. **Energy & Environmental Science**, v. 6, n. 6, p. 1891–1900, 2013.

COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding voltammetry**. 2007.

DEWI, H. A.; SUN, G.; ZHENG, L.; LIM, S. Interaction and charge transfer between isolated thylakoids and multi-walled carbon nanotubes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 5, p. 3435–3440, 2015.

DIACCI, C.; LEE, J. W.; JANSON, P.; et al. Real-Time Monitoring of Glucose Export from Isolated Chloroplasts Using an Organic Electrochemical Transistor. **Advanced Materials Technologies**, 2020.

FEIFEL, SVEN C.; LOKSTEIN, H.; HEJAZI, M.; ZOUNI, A.; LISDAT, F. Unidirectional Photocurrent of Photosystem I on π-System-Modified Graphene Electrodes: Nanobionic Approaches for the Construction of Photobiohybrid Systems. **Langmuir**, v. 31, n. 38, p. 10590–10598, 2015.

FEIFEL, S. C.; STIEGER, K. R.; LOKSTEIN, H.; LUX, H.; LISDAT, F. High photocurrent generation by photosystem I on artificial interfaces composed of π-system-modified graphene. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 23, p.

12188–12196, 2015.

FRIEDLINGSTEIN, P.; O'SULLIVAN, M.; JONES, M. W.; et al. Global Carbon Budget 2020. **Earth System Science Data**, 2020.

HARTMANN, V.; HARRIS, D.; BOBROWSKI, T.; et al. Improved quantum efficiency in an engineered light harvesting/photosystem II super-complex for high current density biophotoanodes. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 8, n. 29, p. 14463–14471, 2020.

HASAN, K.; DILGIN, Y.; EMEK, S. C.; et al. Photoelectrochemical Communication between Thylakoi[1] K. Hasan, Y. Dilgin, S.C. Emek, M. Tavahodi, H.-E. Åkerlund, P.-Å. Albertsson, L. Gorton, Photoelectrochemical Communication between Thylakoid Membranes and Gold Electrodes through Different Quinone D. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 1, p. 131–139, 2014.

HASAN, K.; MILTON, R. D.; GRATTIERI, M.; et al. Photobioelectrocatalysis of Intact Chloroplasts for Solar Energy Conversion. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 4, p. 2257–2265, 2017a.

HASAN, K.; MILTON, R. D.; GRATTIERI, M.; et al. Photobioelectrocatalysis of Intact Chloroplasts for Solar Energy Conversion. **ACS Catalysis**, 2017b.

HAYASHI, K.; OHBA, Y. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. **Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme**, 1. Apr. 1972.

JOHNSON, M. P. Correction: Photosynthesis (Essays in Biochemistry (2016) 60:3 (255-273) DOI: 10.1042/EBC20160016). **Essays in Biochemistry**, 31. Oct. 2017.

KALANUR, S. S.; YOO, I. H.; EOM, K.; SEO, H. Enhancement of photoelectrochemical water splitting response of WO3 by Means of Bi doping. **Journal of Catalysis**, v. 357, p. 127–137, 2018.

KALYANASUNDARAM, K.; GRAETZEL, M. Artificial photosynthesis: Biomimetic approaches to solar energy conversion and storage. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 298–310, 2010.

KAVADIYA, S.; CHADHA, T. S.; LIU, H.; et al. Directed assembly of the thylakoid membrane on nanostructured TiO2 for a photo-electrochemical cell. **Nanoscale**, v. 8, n. 4, p. 1868–1872, 2016.

KILISZEK, M.; HARPUTLU, E.; SZALKOWSKI, M.; et al. Orientation of photosystem i on graphene through cytochrome: C 553 leads to improvement in

photocurrent generation. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 6, n. 38, p. 18615–18626, 2018.

KIM, J. H.; LEE, M.; PARK, C. B. Polydopamine as a biomimetic electron gate for artificial photosynthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 25, p. 6364–6368, 2014.

KIM, J. H.; NAM, D. H.; PARK, C. B. Nanobiocatalytic assemblies for artificial photosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, 1. Aug. 2014.

LAI, C. W. Photocatalysis and photoelectrochemical properties of tungsten trioxide nanostructured films. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LEE, J.; IM, J.; KIM, S. Mediatorless solar energy conversion by covalently bonded thylakoid monolayer on the glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 108, p. 21–27, 2016.

LEE, S. Y.; LIM, S. Y.; SEO, D.; LEE, J. Y.; CHUNG, T. D. Light-Driven Highly Selective Conversion of CO2 to Formate by Electrosynthesized Enzyme/Cofactor Thin Film Electrode. **Advanced Energy Materials**, v. 6, n. 11, 2016.

LI, JIAO; FENG, X.; FEI, J.; et al. Integrating photosystem II into a porous TiO2 nanotube network toward highly efficient photo-bioelectrochemical cells. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 4, n. 31, p. 12197–12204, 2016.

LILLEY, R. M.; FITZGERALD, M. P.; RIENITS, K. G.; WALKER, D. A. CRITERIA OF INTACTNESS AND THE PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF SPINACH CHLOROPLAST PREPARATIONS. **New Phytologist**, v. 75, n. 1, p. 1–10, 1975.

LIU, Y.; AI, K.; LU, L. Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 9, p. 5057–5115, 2014.

MERSHIN, A.; MATSUMOTO, K.; KAISER, L.; et al. Self-assembled photosystem-I biophotovoltaics on nanostructured TiO2 and ZnO. **Scientific Reports 2012 2:1**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2012.

MILTON, R. D.; WANG, T.; KNOCHE, K. L.; MINTEER, S. D. Tailoring Biointerfaces for Electrocatalysis. **Langmuir**, v. 32, n. 10, p. 2291–2301, 2016.

MUSAZADE, E.; VOLOSHIN, R.; BRADY, N.; et al. Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 35, p. 134–156, 2018.

ORT, D. R.; MERCHANT, S. S.; ALRIC, J.; et al. Redesigning photosynthesis to

sustainably meet global food and bioenergy demand. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 28, p. 8529–8536, 2015.

PANG, H.; ZHAO, G.; LIU, G.; et al. Interfacing Photosynthetic Membrane Protein with Mesoporous WO 3 Photoelectrode for Solar Water Oxidation. **Small**, v. 14, n. 19, p. 1800104, 2018.

PANKRATOV, D.; PANKRATOVA, G.; DYACHKOVA, T. P.; et al. Supercapacitive Biosolar Cell Driven by Direct Electron Transfer between Photosynthetic Membranes and CNT Networks with Enhanced Performance. **ACS Energy Letters**, v. 2, n. 11, p. 2635–2639, 2017.

PANKRATOV, D.; ZHAO, J.; NUR, M. A.; et al. The influence of surface composition of carbon nanotubes on the photobioelectrochemical activity of thylakoid bioanodes mediated by osmium-complex modified redox polymer. **Electrochimica Acta**, v. 310, p. 20–25, 2019.

PANKRATOVA, G.; PANKRATOV, D.; BARI, C. DI; et al. Three-Dimensional Graphene Matrix-Supported and Thylakoid Membrane-Based High-Performance Bioelectrochemical Solar Cell. **ACS Applied Energy Materials**, v. 1, n. 2, p. 319–323, 2018a.

PANKRATOVA, G.; PANKRATOV, D.; BARI, C. DI; et al. Three-Dimensional Graphene Matrix-Supported and Thylakoid Membrane-Based High-Performance Bioelectrochemical Solar Cell. **ACS Applied Energy Materials**, v. 1, n. 2, p. 319–323, 2018b.

RIEDEL, M.; WERSIG, J.; RUFF, A.; et al. A Z-Scheme-Inspired Photobioelectrochemical H 2 O/O 2 Cell with a 1 V Open-Circuit Voltage Combining Photosystem II and PbS Quantum Dots. **Angewandte Chemie - International Edition**, 2019.

ROLLAND, N.; FERRO, M.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; et al. Proteomics of chloroplast envelope membranes. **Photosynthesis Research**, 2003.

SALAZAR, P.; MARTÍN, M.; GONZÁLEZ-MORA, J. L. Polydopamine-modified surfaces in biosensor applications. **Polymer science: research advances, pratical applications and educational aspects**, v. 1, n. July, p. 385–396, 2007.

SANTOS, L.; SILVEIRA, C. M.; ELANGOVAN, E.; et al. Synthesis of WO3 nanoparticles for biosensing applications. **Sensors and Actuators, B:**

Chemical, v. 223, p. 186–194, 2016.

SEKAR, N.; RAMASAMY, R. P. Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews Recent advances in photosynthetic energy conversion. **"Journal of Photochemistry & Photobiology, C: Photochemistry Reviews,"** v. 22, p. 19–33, 2015.

SJOHOLM, K. H.; RASMUSSEN, M.; MINTEER, S. D. Bio-solar cells incorporating catalase for stabilization of thylakoid bioelectrodes during direct photoelectrocatalysis. **ECS Electrochemistry Letters**, v. 1, n. 5, p. 13–15, 2012.

SOKOL, K. P.; MERSCH, D.; HARTMANN, V.; et al. Rational wiring of photosystem II to hierarchical indium tin oxide electrodes using redox polymers. **Energy and Environmental Science**, v. 9, n. 12, p. 3698–3709, 2016.

SOUZA, B. C. A.; GUARALDO, T. T.; BRUGNERA, M. F.; et al. Antifungal properties of high efficient W/WO3 electrodes acting under UV-Vis and visible light and chloride medium. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2084–2093, 2017.

STONES, R.; HOSSEIN-NEJAD, H.; GRONDELLE, R. VAN; OLAYA-CASTRO, A. On the performance of a photosystem II reaction centre-based photocell. **Chemical Science**, v. 8, n. 10, p. 6871–6880, 2017.

TAKEUCHI, R.; SUZUKI, A.; SAKAI, K.; et al. Construction of photo-driven bioanodes using thylakoid membranes and multi-walled carbon nanotubes. **Bioelectrochemistry**, v. 122, p. 158–163, 2018.

TAPIA, C.; MILTON, R. D.; PANKRATOVA, G.; et al. Wiring of Photosystem I and Hydrogenase on an Electrode for Photoelectrochemical H2 Production by using Redox Polymers for Relatively Positive Onset Potential. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 1, p. 90–95, 2017.

TORQUATO, L. D. M.; PASTRIAN, F. A. C.; PERINI, J. A. L.; et al. Relation between the nature of the surface facets and the reactivity of Cu2O nanostructures anchored on TiO2NT@PDA electrodes in the photoelectrocatalytic conversion of CO2 to methanol. **Applied Catalysis B: Environmental**, 2020.

VASELBEHAGH, M.; KARKHANECHI, H.; MULYATI, S.; TAKAGI, R.; MATSUYAMA, H. Improved antifouling of anion-exchange membrane by polydopamine coating in electrodialysis process. **Desalination**, v. 332, n. 1, p.

126–133, 2014.

VIVIANI, V. R. Aula prática de Fotossíntese: Demonstração da reação de Hill em cloroplastos com dissipação de energia por fluorescência mediante desacoplamento ou inibição dos fotossistemas pelo herbicida Diuron. **Revista de Ensino de Bioquímica**, v. 14, n. 1, p. 73, 2016.

WANG, P.; ZHAO, F.; HARTMANN, V.; et al. Reassessing the rationale behind herbicide biosensors: The case of a photosystem II/redox polymer-based bioelectrodefs. **Bioelectrochemistry**, v. 136, p. 107597, 2020.

WANG, W.; WANG, Z.; ZHU, Q.; et al. Direct electron transfer from photosystem II to hematite in a hybrid photoelectrochemical cell. **Chemical Communications**, v. 51, n. 95, p. 16952–16955, 2015.

WELIWATTE, N. S.; GRATTIERI, M.; SIMOSKA, O.; RHODES, Z.; MINTEER, S. D. Unbranched Hybrid Conducting Redox Polymers for Intact Chloroplast-Based Photobioelectrocatalysis. **Langmuir**, v. 37, n. 25, p. 7821–7833, 2021.

XIONG, Y.; LI, R.; YUE, Y. MIN. Quantitative estimation of photosynthetic pigments using new spectral indices. **Journal of Forestry Research**, v. 24, n. 3, p. 477–483, 2013.

YEHEZKELI, O.; TEL-VERED, R.; WASSERMAN, J.; et al. Integrated photosystem II-based photo-bioelectrochemical cells. **Nature Communications**, v. 3, 2012.

YU, Y.; HUANG, Z.; ZHOU, Y.; et al. Facile and highly sensitive photoelectrochemical biosensing platform based on hierarchical architectured polydopamine/tungsten oxide nanocomposite film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 1–6, 2019.

ZHAO, F.; HARDT, S.; HARTMANN, V.; et al. Light-induced formation of partially reduced oxygen species limits the lifetime of photosystem 1-based biocathodes. **Nature Communications 2018 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.

ZHAO, F.; HARTMANN, V.; RUFF, A.; et al. Unravelling electron transfer processes at photosystem 2 embedded in an Os-complex modified redox polymer. **Electrochimica Acta**, v. 290, p. 451–456, 2018.

ZHAO, F.; WANG, P.; RUFF, A.; et al. A photosystem i monolayer with anisotropic electron flow enables Z-scheme like photosynthetic water splitting. **Energy and Environmental Science**, 2019.

ZHOU, X.; ZHOU, L.; ZHANG, P.; et al. Conducting Polymers–Thylakoid Hybrid Materials for Water Oxidation and Photoelectric Conversion. **Advanced Electronic Materials**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2019.