

## 20. Química

### **Monitoramento do Consumo de Oxigênio Mitocondrial: Sensor Quimiorresistor para Oxigênio Dissolvido Baseado em Nanocompósito de Azo polímero-Grafeno**

Olean-Oliveira, A. and Teixeira, M. S. F

[Olean.oliveira.a@gmail.com](mailto:Olean.oliveira.a@gmail.com); marcos.fs.teixeira@unesp.br;

Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) – Departamento de Química e Bioquímica  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

#### **Resumo**

No presente estudo, foi desenvolvido um sensor impedimétrico baseado em filme polimérico nanocompósito de grafeno com poli-Bismarck Brown Y para análise da capacidade respiratória dos complexos constituintes da cadeia transportadora de elétrons. O filme “mesclado” foi fabricado visando somar as propriedades químicas dos azopolímeros com as qualidades do grafeno. Sua eletrossíntese se deu por técnica de eletropolimerização e suas propriedades físico-químicas e morfológicas investigadas através de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Sua performance frente a molécula de oxigênio dissolvido demonstra uma diminuição dos valores de impedância real ( $Z'$ ) com o aumento da concentração de oxigênio, revelando um aumento da condutividade eletrônica conferido pela interação química entre os grupos hidrazina do filme e o oxigênio dissolvido. O sensor teve seus parâmetros otimizados, alcançando sensibilidade de  $16,9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2 \text{ L mmol}^{-1}$ , além de boa seletividade e repetibilidade. Por fim, o sensor cronimpedimétrico foi posto à prova, avaliando o consumo de oxigênio mitocondrial de tecidos de ratos fumantes, exercitados, fumantes exercitados e do grupo controle. O sensor demonstrou sucesso ao ser capaz de analisar a capacidade respiratória dos grupos de animais e demonstrar que o grupo exercitado obteve os maiores valores de respiração ROUTINE, enquanto o grupo fumante teve seus valores significativamente menores comparados ao grupo controle.

**Palavras chave:** Sensor quimiorresistor, nanocompósito, azo polímero, grafeno, capacidade respiratória mitocondrial.

#### **Introdução**

Mitocôndrias são organelas encontradas em células eucarióticas e seu

papel metabólico é crucial para o funcionamento celular. Sua função celular vai além da produção de energia (gerada na forma de Trifosfato de Adenosina -

ATP), a mitocôndria também age na termogênese, síntese de esteroides e apoptose (Shamsipur, Pashabadi, Molaabasi, & Hosseinkhani, 2017).

A regulação do metabolismo energético pela mitocôndria é feita através da produção de ATP pela oxidação de substratos orgânicos através do ciclo de Krebs. Sendo na cadeia transportadora de elétrons onde a maior parte da energia mitocondrial é produzida.

A baixa concentração de oxigênio celular, causada por uma alteração em qualquer mecanismo de transporte de oxigênio, gera a redução da produção energética levando ao estado de hipóxia e conseqüentemente a morte celular. A insuficiência de oxigênio mitocondrial é indicio de uma alteração estrutural e funcional de células, tecidos e órgãos que estão em condições patológicas (Giroud, Nicolo, Koepke, & Minter, 2013; Gnaiger, Steinlechner-Maran, Méndez, Eberl, & Margreiter, 1995; Sonam et al., 2017).

Por esse motivo, faz-se necessário maiores investigações na área do desenvolvimento de métodos e técnicas que tornem os estudos mitocondriais acessíveis, exibindo resultados confiáveis e custo acessível a laboratórios de pesquisa e clínicas laboratoriais.

Dentre as técnicas mais utilizadas na identificação e quantificação de espécies químicas nos mais diversos sistemas, os sensores eletroquímicos comumente destacam-se pela alta sensibilidade de detecção e relativo baixo

custo de construção, em comparação as outras técnicas analíticas empregadas como sensores (Wordofa, Ramnani, Tran, & Mulchandani, 2016). Dentre as classes de sensores eletroquímicos, os sensores baseados em quimioresistores são uma atraente plataforma para detecção química. O mecanismo de resposta destes sensores é controlado pela mudança da resistência elétrica baseada no *efeito de tunelamento* quântico ressonante do material sensorial em resposta a mudança do ambiente químico (Lange & Mirsky, 2011). Uma variedade de diferentes materiais de quimioresistores foram utilizadas para o desenvolvimento de plataforma sensorial, tais como semicondutores de óxido metálico (Jiang et al., 2015), polímeros condutores (dos Reis, Thomazi, del Nero, & Roman, 2010), metalopolímeros (Holliday, Stanford, & Swager, 2006), semicondutores orgânicos (Huang, Gross, Yang, Moore, & Zang, 2013), nanotubos de carbono (Ra??ola, Kalaw, & Sevilla, 2016) e nanopartículas metálicas (Raguse, Chow, Barton, & Wieczorek, 2007). Entretanto, a maioria dos sensores quimioresistores reportados na literatura são limitado para detecção para gases (Rigoni et al., 2013). Recentemente, nós estudamos um novo polímero a base de Bismarck Brown Y com potencial aplicação como plataforma sensorial em sensores quimioresistores (Olean-oliveira & Teixeira, 2018; Teixeira, Barsan, & Brett, 2016). Na caracterização por impedância eletrônica do material

polimérico relevou que a resistência de transferência de carga para potenciais negativos está principalmente associado com transferência eletrônica entre poli(azo-Bismarck Y) e o oxigênio molecular dissolvido no eletrolítico de suporte.

### Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo apresentar os promissores resultados obtidos no desenvolvimento de um sensor quimiorresistor para monitoramento do consumo de oxigênio mitocondrial.

### Materiais e Método

Todos os experimentos foram conduzidos em célula eletroquímica convencional de três eletrodos, sendo o calomelano saturado como eletrodo de referência (ECS), fio de platina como contra eletrodo e eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) como eletrodo de trabalho. Os eletrodos foram conectados a um potenciostato PalmSens3 e gerenciados pelo software PSTrace 5.4.

Anterior as modificações, o eletrodo de FTO com área geométrica delimitada de 1,0 cm<sup>2</sup> foi limpo mergulhando-o em solução alcalina de 6:1:1 H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v) e NH<sub>4</sub>OH (conc.) por 5 minutos a temperatura de 80°C. Após, foi lavado em abundância e submetido a ciclagens de potencial em um intervalo de -0,10 a +1,40 V (vs. ECS) em

0,50 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até que voltamogramas cíclicos estáveis foram obtidos. A formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO foi baseado no método proposto por Teixeira et. al. (Teixeira et al., 2016). O eletrodo de FTO foi imerso em uma solução contendo 10 mmol L<sup>-1</sup> do monômero Bismarck Brown Y (BBY) misturados a 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de suspensão de óxido de grafeno em meio a 1,0 mol L<sup>-1</sup> de HCl. Em condições otimizadas, aplicou-se 20 ciclos de potenciais em um intervalo de potencial de -0,30 a +1,00 V (vs. ECS), com velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub> atmosfera). Após, lava-se abundantemente com água deionizada e submete-se o eletrodo a aplicação de potencial negativo de -0,30 V por uma hora em eletrólito contendo KCl 0,50 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,00). Os dois outros filmes apresentados no estudo, FTO/poli(azo-BBY) e FTO/rGO, foram fabricados tomando os mesmos parâmetros.

As medidas de EIE foram realizadas através da incidência de uma perturbação senoidal de 10 mV de amplitude, aplicadas a um intervalo de frequência de 50 kHz a 0,1 Hz. As medidas de EIE foram realizadas nas soluções de KCl 0,50 mol L<sup>-1</sup> com pH = 2,00 (pH foi ajustado utilizando HCl concentrado) e solução tampão fosfato (PBS) 0,05 mol L<sup>-1</sup> com pH = 7,40 (pH ajustado com NaOH concentrado). As soluções saturadas utilizadas nos estudos, foram obtidas borbulhando-se os

respectivos gases de alta pureza  $N_2$  e  $O_2$  nas soluções por um período mínimo de 20 min.

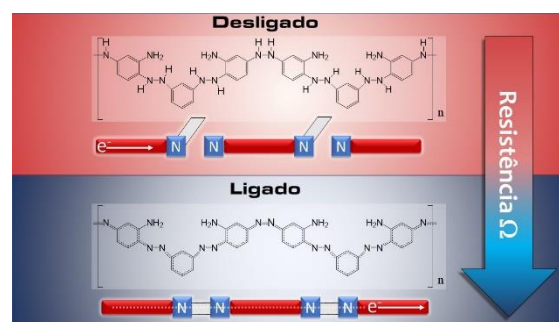
Para montagem das curvas analíticas, a solução de PBS era saturada borbulhando-se  $O_2$  por um período de 20 min, e após, foram feitas sucessivas adições de padrões de  $Na_2SO_3$  0,10 mol  $L^{-1}$ . As concentrações das adições foram calculadas baseadas nas concentrações de  $O_2$  das soluções saturadas de acordo com os valores disponíveis em (Lawrence Clever, Battino, Miyamoto, Yampolski, & Young, 2014). Também foram usados como base os valores obtidos através de um sensor de oxigênio dissolvido comercial modelo Hanna® HI9147.

Para as medidas de aplicação do sensor quimiorresistor, foi utilizado o protocolo descrito por (Kuznetsov et al., 2008; Ryan, Brophy, Lin, Hickner, & Neuffer, 2014). A extração, medição e análises dos dados dos tecidos (músculo esquelético - gastrocnêmico) foram realizados em colaboração com o Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A calibração do sensor quimiorresistor durante as medidas de consumo de oxigênio mitocondrial foram feitos tomando como base os valores de concentração de oxigênio dissolvido por borbulhar o respectivo gás por 20 minutos ( $O_2$  máximo) e após feitas as adições dos substratos eram adicionadas  $Na_2SO_3$  suficiente para a solução estar livre de oxigênio ( $O_2$  zero).

## Resultados e Discussão

O desenvolvimento do sensor quimiorresistor baseado em filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO foi planejada de forma a somar as propriedades desejadas dos azo polímeros condutores e do grafeno. Os azo polímeros condutores exibem alta seletividade ao oxigênio molecular, por esse reagir de maneira seletiva através dos sítios ativos diazo presentes em sua estrutura polimérica (Teixeira et al., 2016; X. Wang, 2017).

Além do mais, os azo polímeros condutores exibem extensas cadeias  $\pi$ -conjugadas. As quais, pequenas perturbações em pontos específicos de sua cadeia, podem refletir no comportamento eletrônico em todo o polímero (Raicopol et al., 2015; Teixeira et al., 2016; X. Wang, 2017). Essas perturbações no caso do azo polímero de Bismarck Brown Y se dá através da possibilidade de “ligar” e “desligar” o sistema  $\pi$ -conjugado da cadeia polimérica através dos sítios ativos diazo (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática das forma reduzida (desligada) e oxidada (ligada) do poli(azo-BBY)-rGO.

Fazendo uso desse mecanismo, é possível alterar as propriedades de condução eletrônica do material e consequentemente a resistência de transferência de carga do filme nanocompósito. Esse comportamento pode ser alterado através de processos químicos ou eletroquímicos (Teixeira et al., 2016). O grafeno foi introduzido ao material para conferir maior velocidade na resposta eletrônica, devido a este possuir a extensa cadeia  $\pi$ -conjugada (Mooste, Kibena-Pöldsepp, Matisen, & Tammeveski, 2017; Salavagione, Martínez, & Ellis, n.d.; Zhang, Sun, Zhu, Shen, & Jia, 2011), amplificar a resposta frente ao oxigênio, uma vez que estudos anteriores demonstram afinidade do grafeno com o oxigênio (G. Wang, Pandey, & Karna, 2017; Yu, Zheng, & Jiang, 2008), e também afim de se obter maior resistência química e mecânica (Gupta & Price, 2016).

A Figura 2 apresentam o espectro de impedância vs. frequência (BODE) para o comportamento dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO sobre eletrodo de FTO na presença de soluções saturadas com os gases  $N_2$  e  $O_2$ . Foi escolhido a impedância real ( $Z'$ ) devido a essa apresentar uma contribuição mais direta para os valores associada ao elemento de resistência (eq. 1) comparado a impedância imaginária ( $Z''$ ) (eq. 2) (Orazem & Tribollet, 2008).

$$Real Z = \frac{R}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (1)$$

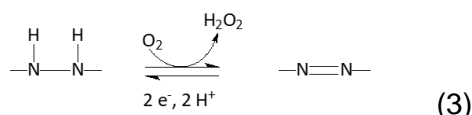
$$Img Z = \frac{\omega R \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (2)^*$$

\* Equação referente a um circuito RC paralelo  
 $\omega$  = frequência (Hz);  $\tau$  = time constante (s) ( $\tau = RC$ )

Também porque não foi verificado mudança significativa na faixa de trabalho 0,10 Hz comparada a impedância absoluta ( $|Z| = \sqrt{(Z_{real})^2 + (Z_{img})^2}$ ) (dado não apresentado aqui). Os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO apresentam diminuição dos valores de  $Z'$  quando na presença de  $O_2$  dissolvido, mas a maior diferença na resposta impedimétrica ( $\Delta Z' = 22,2 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ ) é anotada para o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO, o qual apresenta ampliação de resposta de aproximadamente 60 e 64% frente aos filmes de rGO e poli(azo-BBY) respectivamente.

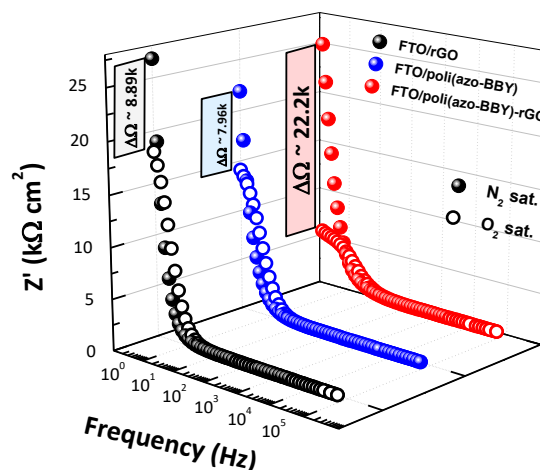
Verifica-se que a diminuição dos valores de  $Z'$  deve-se principalmente a diminuição do valor resistência de transferência de carga referente as camadas de rGO/poli(azo-BBY) ( $R_{ct}$ ) com o aumento da concentração de oxigênio (Ohsaka, Watanabe, Kitamura, Oyama, & Tokuda, 1991; Olean-oliveira & Teixeira, 2018). A diminuição da  $R_{ct}$  resulta da reação entre o oxigênio molecular e o grupo hidrazina presente no polímero (Forti, Nunes, Lanza, & Bertazzoli, 2007; Teixeira et al., 2016). Ou seja, havendo a reação química do oxigênio com os sítios

ativos do filme, há o “ligamento” do sistema  $\pi$ -conjugado, aumentando a condutividade eletrônica e consequentemente diminuindo o valor de resistência de transferência entre a rede  $\pi$ -conjugado do filme e do grafeno (eq. 3) (Inzelt, 2012).



Estudos anteriores demonstraram que em soluções com baixas concentrações de íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  há o comportamento de aumento de  $R^*_{ct}$  relacionado a interface solução/rGO com o aumento da concentração de oxigênio. O que não ocorre em solução ácida de KCl pH 2.0 (Olean-oliveira & Teixeira, 2018). Isso pode ser atribuído à micro-oxidação do grafeno por oxigênio molecular (Yu et al., 2008). Padey e colaboradores (G. Wang et al., 2017) descrevem que o oxigênio molecular poderia adsorver quimicamente no grafeno defeituoso e o processo de oxidação conduzia a formação de poços no grafeno. Esse comportamento pode ser visto acompanhando-se também os valores de  $\alpha$  do  $\text{CPE}_{film}$ , o qual diminui com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido, revelando uma maior irregularidade na estrutura do filme (Córdoba-Torres, Mesquita, & Nogueira, 2015). Maiores detalhes desse fenômeno estão sendo estudados e não são o foco

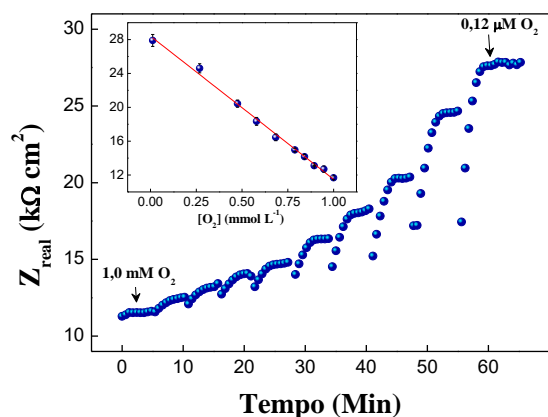
do presente trabalho. Contudo, a formação desses poços de grafeno não afeta o desempenho do sensor.



**Figura 2.** Plano complexo de BODE para a resposta impedimétrica dos filmes de rGO (●), poli(azo-BBY) (●) e poli(azo-BBY)-rGO (●) aplicado potencial de  $-0,30$  V (vs. ECS) em solução de PBS saturada com o gás  $\text{N}_2$  (●) e  $\text{O}_2$  (○).

Obtendo os valores otimizados de frequência e potencial de redução, foi possível utilizar a técnica de cronimpedância para monitorar as variações nos valores de impedância em função da concentração de oxigênio dissolvido, em tempo real. Após sucessivos ciclos de borbulhamento dos gases  $\text{N}_2$  e  $\text{O}_2$  até suas respectivas saturações (0,04% e 99,98% de  $\text{O}_2$ , respectivamente), foi verificada uma boa dinamicidade na resposta do sensor quimiorresistor frente ao oxigênio dissolvido juntamente a uma boa reversibilidade, uma vez que o sensor apresenta 4,1 % de variação média entre os ciclos de borbulhamento. Verificada a dinamicidade da resposta do sensor

impedimétrico, foram realizadas sucessivas adições de padrão de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (figura 3). O sulfito de sódio consome o oxigênio dissolvido em solução, possibilitando o cálculo da concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido (Olean-oliveira & Teixeira, 2018).



**Figura 3.** Resposta cronopédica do sensor quimiorresistor de poli(azo-BBY)-rGO frente a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em PBS  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Frequência fixa de  $0,10 \text{ Hz}$  e potencial aplicado de  $-0,30 \text{ V}$  (vs. ECS). *Insert:* Curva de calibração do sensor calculada através da medida de 10 sensores diferentes.  $T = 25^\circ\text{C}$ .

Utilizando a cronopédica, acompanha-se uma rápida resposta do sensor as mudanças na concentração de oxigênio dissolvido. Seus valores de resposta em  $Z'$  são estáveis em aproximadamente um minuto. Esse tempo está totalmente de acordo com o propósito do trabalho de aplicação do sensor quimiorresistor em sistemas biológicos, uma vez que as medidas semelhantes levam de poucos a alguns minutos, em média, para estabilizar o sinal após cada estímulo (Kuznetsov et al., 2008). Ainda na Figura 3, no *insert*, exibe-se a curva de calibração a partir dos valores da cronopédica. O sensor quimiorresistor

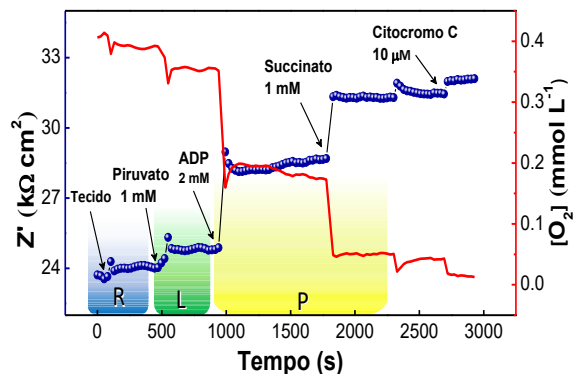
exibiu um intervalo linear de resposta de  $1,2 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo representado pela equação 4.

$$Z' \text{ (k}\Omega \text{ cm}^2) = 28,40 \pm 0,06 - 16,9 \pm 0,003 [\text{O}_2 \text{ (mmol L}^{-1})] \quad (n = 10; R^2 = 0,9989) \quad (4)$$

As análises protocoladas para o estudo da mitocôndria conta com a adição de diversos substratos e inibidores, com o objetivo de estimular a resposta de cada um dos complexos constituintes da cadeia transportadora de elétrons (Kuznetsov et al., 2008; Makrecka-Kuka, Krumschnabel, & Gnaiger, 2015). Para avaliar o sensor quimiorresistor quanto a seletividade frente a esses substratos, foi realizada a medida de cronopédica de  $\text{O}_2$  dissolvido ( $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ ) frente a alguns dos substratos utilizados em protocolos para as medidas de oximetria para avaliação da respiração mitocondrial. Em média, todas as substâncias testadas apresentaram valores de variação de sinal baixo (Variação  $< 7\%$ ), sendo a maior interferência anotada para o succinato. Esse resultado revela uma boa seletividade do sensor quimiorresistor poli(azo-BBY)-rGO. Tomando possível a utilização do sensor chemiresistor em contato direto com o meio de análise sem a necessidade de uma membrana permeadora.

Foram realizadas medidas frente a amostras de tecidos retirados do músculo esquelético (gastrocnêmico) de 4 diferentes grupos de ratos: controle (C),

fumantes (F), fumantes exercitados (FE) e exercitados (E). Os animais foram submetidos aos estímulos por um período de 4 meses.



**Figura 4.** Resposta cronopédimetria (—●—) do sensor quimiorresistor de poly(azo-BBY)-rGO na análise de um tecido (gastroquímico) do grupo **controle** respondendo ao estímulo de diferentes substratos em solução de respiração mitocondrial (MiR05). A concentração de oxigênio dissolvido (—; left Y-axis) foi calculado a partir da curva de calibração obtida através dos valores de  $O_2max$  e  $O_2zero$ . Temp. 37°C.

A avaliação dos tecidos foram realizadas de acordo com protocolos específicos para medidas de oximetria descritos na literatura (Kuznetsov et al., 2008). A respiração mitocondrial, pode ser avaliada, de forma geral, de acordo com o tipo de respiração. São três principais tipos de respiração: i) respiração ROUTINE (R), que é relacionada a demanda de oxigênio celular. Sua avaliação ocorre no primeiro momento do experimento, onde não há a adição do tecido a ser analisado na célula eletroquímica e não há a adição de substratos em excesso; ii) Respiração LEAK (L), sendo um componente dissipativo, produzindo principalmente calor. Essa respiração é relacionada a não produção de trabalho bioquímico e é

avaliada a partir da adição de substratos redutores; iii) Por fim, tem-se a respiração OXPHOS (P) que é a capacidade respiratória mitocondrial em regime de concentrações saturadas de ADP, fosfato inorgânico, oxigênio e substrato redutor (Makrecka-Kuka et al., 2015).

**Tabela 1.**

Valores da taxa de respiração dos grupos controle (C), exercício (E), fumante (F) e fumante exercício (FE) em  $\mu mol g_{tecido}^{-1} L^{-1} s^{-1}$ . R = ROUTINE, L = LEAK e P = OXPHOS. Erros calculados para a média de 3 animais.

Grupo	R	L	P
Controle	17,2 ± 2,1	25,4 ± 1,0	132,2 ± 3,9
Exercitado	74,2 ± 5,7	25,7 ± 2,1	165,3 ± 4,1
Fumante	10,0 ± 2,3	28,3 ± 1,9	143,0 ± 4,4
Fum./Exerc.	19,3 ± 3,1	27,8 ± 1,8	104,0 ± 6,2

A Figura 4 apresenta a resposta do sensor quimiorresistor de poli(azo-BBY)-rGO no monitoramento do consumo de oxigênio mitocondrial realizado para um tecido do grupo controle em solução de respiração mitocondrial (MiR05 (Fontana-Ayoub, Fasching, & Gnaiger, 2014)), estimulado com a adição de substratos. Os resultados coletados foram analisados segundo (Makrecka-Kuka et al., 2015) e apresentados na Tabela 1. Os resultados demonstram uma influência direta do fumo e do exercício resistivo na taxa de consumo de oxigênio mitocondrial. Os animais do grupo fumante apresentaram uma diminuição no valor da respiração R e aumento da energia dissipativa L. O grupo exercício apresenta um alto valor de R e P frente aos demais grupos, mas sem grandes variações dos valores de L. O grupo fumante exercitado apresentou o



menor valor de taxa respiratória P e valores intermediários de R e L.

## Conclusão

A plataforma sensorial quimiorresistora baseada no filme nanocompósito de poli(azoBBY)-rGO apresenta uma melhor resposta eletrônica frente aos filmes de rGO e poli-BBY. Sua capacidade de variação entre as formas oxidadas e reduzidas permitem o “ligamento” e o “desligamento” da rede do sistema  $\pi$ -conjugado do nanocompósito, alterando em mais de 10 vezes a variação dos valores de resistência de transferência eletrônica do material. Essa propriedade somada a resposta seletiva ao oxigênio molecular permitem a aplicação deste nanocompósito como material sensível em plataformas sensoriais para oxigênio dissolvido.

Através de técnica de cronoimpedancia foi possível a construção de um sensor quimiorresistor para o monitoramento de oxigênio em tempo real de sistemas biológicos.

O sensor quimiorresistor demonstrou bom valor de sensibilidade e boa seletividade para o oxigênio frente aos substratos utilizados nos protocolos de análise. Além do mais, apresenta boa repetibilidade e reprodutividade. Sendo assim, o sensor quimiorresistor baseado em filme nanoestruturado de poli(azoBBY)-rGO demonstrou ser capaz de monitorar o consumo de oxigênio mitocondrial de tecidos de ratos

submetidos a diferentes estímulos, corroborando para a elucidação dos estudos voltados a fisiologia do exercício. Mostrando-se um promissor material para a produção de um dispositivo sensor para monitoramento de atividades biológicas.

## Bibliografia

- Córdoba-Torres, P., Mesquita, T. J., & Nogueira, R. P. (2015). Relationship between the origin of constant-phase element behavior in electrochemical impedance spectroscopy and electrode surface structure. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(8), 4136–4147.  
<https://doi.org/10.1021/jp512063f>
- dos Reis, M. A. L., Thomazi, F., del Nero, J., & Roman, L. S. (2010). Development of a chemiresistor sensor based on polymers-dye blend for detection of ethanol vapor. *Sensors*, 10(4), 2812–2820.  
<https://doi.org/10.3390/s100402812>
- Fontana-Ayoub, Fasching, M., & Gnaiger, E. (2014). Selected media and chemicals for respirometry with mitochondrial preparations. *Mitochondrial Physiology Network*, 02(17), 1–9.
- Forti, J. C., Nunes, J. A., Lanza, M. R. V, & Bertazzoli, R. (2007). Azobenzene-modified oxygen-fed graphite/PTFE electrodes for hydrogen peroxide synthesis. *Journal of Applied Electrochemistry*, 37(4), 527–532.

<https://doi.org/10.1007/s10800-006-9285-x>

- Giroud, F., Nicolo, T. A., Koepke, S. J., & Minter, S. D. (2013). Understanding the mechanism of direct electrochemistry of mitochondria-modified electrodes from yeast, potato and bovine sources at carbon paper electrodes. *Electrochimica Acta*, 110, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.02.087>
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., & Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27(6), 583–596. <https://doi.org/10.1007/BF02111656>
- Gupta, S., & Price, C. (2016). Investigating graphene/conducting polymer hybrid layered composites as pseudocapacitors: Interplay of heterogeneous electron transfer, electric double layers and mechanical stability. *Composites Part B: Engineering*, 105, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.08.035>
- Holliday, B. J., Stanford, T. B., & Swager, T. M. (2006). Chemoresistive gas-phase nitric oxide sensing with cobalt-containing conducting metallopolymer. *Chemistry of Materials*, 18(24), 5649–5651. <https://doi.org/10.1021/cm0620077>
- Huang, H., Gross, D. E., Yang, X., Moore, J. S., & Zang, L. (2013). One-step surface doping of organic nanofibers to achieve high dark conductivity and chemiresistor sensing of amines. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(16), 7704–7708. <https://doi.org/10.1021/am402420g>
- Inzelt, G. (2012). *Conducting Polymers*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27621-7>
- Jiang, Z., Jiang, T., Wang, J., Wang, Z., Xu, X., Wang, Z., ... Wang, C. (2015). Ethanol chemiresistor with enhanced discriminative ability from acetone based on Sr-doped SnO<sub>2</sub> nanofibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 437, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.09.056>
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>
- Lange, U., & Mirsky, V. M. (2011). Chemiresistors based on conducting polymers: A review on measurement techniques. *Analytica Chimica Acta*, 687(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.030>
- Lawrence Clever, H., Battino, R., Miyamoto, H., Yampolski, Y., & Young, C. L. (2014). IUPAC-NIST

- Solubility Data Series. 103. Oxygen and Ozone in Water, Aqueous Solutions, and Organic Liquids (Supplement to Solubility Data Series Volume 7). *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 43(3). <https://doi.org/10.1063/1.4883876>
- Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., & Gnaiger, E. (2015). High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. *Biomolecules*, 5(3), 1319–1338. <https://doi.org/10.3390/biom5031319>
- Mooste, M., Kibena-Pöldsepp, E., Matisen, L., & Tammeveski, K. (2017). Oxygen Reduction on Anthraquinone Diazonium Compound Derivatized Multi-walled Carbon Nanotube and Graphene Based Electrodes. *Electroanalysis*, 29(2), 548–558. <https://doi.org/10.1002/elan.201600451>
- Ohsaka, T., Watanabe, T., Kitamura, F., Oyama, N., & Tokuda, K. (1991). Electrocatalysis of O<sub>2</sub> reduction at poly(o-phenylenediamine)- and poly(o-aminophenol)-coated glassy carbon electrodes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), 1072. <https://doi.org/10.1039/c39910001072>
- Olean-oliveira, A., & Teixeira, M. F. S. (2018). Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on  $\pi$ -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 271(March), 353–357. <https://doi.org/S0925400518310372>
- Orazem, M. E., & Tribollet, B. (2008). Methods for Representing Impedance. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, 307–331. <https://doi.org/10.1002/9780470381588.ch16>
- Ra??ola, R. A. G., Kalaw, J. M., & Sevilla, F. B. (2016). Surface Adsorbed Reduced Graphene Oxide on Nylon-6 via Vacuum-Assisted Self-Assembly for Chemiresistor Sensing of Trimethylamine. *IEEE Sensors Journal*, 16(7), 1880–1886. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2015.2512612>
- Raguse, B., Chow, E., Barton, C. S., & Wieczorek, L. (2007). Gold nanoparticle chemiresistor sensors: Direct sensing of organics in aqueous electrolyte solution. *Analytical Chemistry*, 79(19), 7333–7339. <https://doi.org/10.1021/ac070887i>
- Raicopol, M., Andronescu, C., Atasiei, R., Hanganu, A., Manea, A. M., Rau, I., ... Pilan, L. (2015). Synthesis of conducting azopolymers by electrochemical grafting of a diazonium salt at polypyrrole electrodes. *Synthetic Metals*, 206,

- 84–91.  
<https://doi.org/10.1016/J.SYNTHMET.2015.05.006>
- Rigoni, F., Tognolini, S., Borghetti, P., Drera, G., Pagliara, S., Goldoni, A., & Sangaletti, L. (2013). Enhancing the sensitivity of chemiresistor gas sensors based on pristine carbon nanotubes to detect low-ppb ammonia concentrations in the environment. *The Analyst*, *138*(24), 7392.  
<https://doi.org/10.1039/c3an01209c>
- Ryan, T. E., Brophy, P., Lin, C.-T., Hickner, R. C., & Neuffer, P. D. (2014). Assessment of *in vivo* skeletal muscle mitochondrial respiratory capacity in humans by near-infrared spectroscopy: a comparison with *in situ* measurements. *The Journal of Physiology*, *592*(15), 3231–3241.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.274456>
- Salavagione, H. J., Martínez, G., & Ellis, G. (n.d.). Recent Advances in the Covalent Modification of Graphene With Polymers. *Macromolecular Rapid Communications*, 1771–1789.  
<https://doi.org/10.1002/marc.201100527>
- Shamsipur, M., Pashabadi, A., Molaabasi, F., & Hosseinkhani, S. (2017). Impedimetric monitoring of apoptosis using cytochrome-apptamer bioconjugated silver nanocluster. *Biosensors and Bioelectronics*, *90*, 195–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.050>
- Sonam, K., Bindu, P. S., Srinivas Bharath, M. M., Govindaraj, P., Gayathri, N., Arvinda, H. R., ... Taly, A. B. (2017). Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders in children: Phenotypic, genotypic and biochemical correlations in 85 patients from South India. *Mitochondrion*, *32*, 42–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.11.002>
- Teixeira, M. F. S., Barsan, M. M., & Brett, C. M. A. (2016). Molecular engineering of a  $\pi$ -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. *RSC Adv.*, *6*(103), 101318–101322.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA20335C>
- Wang, G., Pandey, R., & Karna, S. P. (2017). Physics and chemistry of oxidation of two-dimensional nanomaterials by molecular oxygen. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *7*(1).  
<https://doi.org/10.1002/wcms.1280>
- Wang, X. (2017). *Azo Polymers\_Synthesis, Functions and Applications*.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-53424-3>
- Wordofa, D. N., Ramnani, P., Tran, T.-T., & Mulchandani, A. (2016). An oligonucleotide-functionalized carbon nanotube chemiresistor for sensitive

detection of mercury in saliva. *The Analyst*, 141(9), 2756–2760.  
<https://doi.org/10.1039/C6AN00018E>

Yu, S. S., Zheng, W. T., & Jiang, Q. (2008). Oxidation of graphene nanoribbon by molecular oxygen. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 7(5), 628–635.  
<https://doi.org/10.1109/TNANO.2008.2002267>

Zhang, Y., Sun, X., Zhu, L., Shen, H., & Jia, N. (2011). Electrochemical sensing based on graphene oxide/Prussian blue hybrid film modified electrode. *Electrochimica Acta*, 56(3), 1239–1245.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.11.011>

### **Agradecimento**

Os autores agradecem o Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis)

### **Financiamento**

Os autores agradecem a FAPESP (2016/09017-1) e a CAPES-Brasil